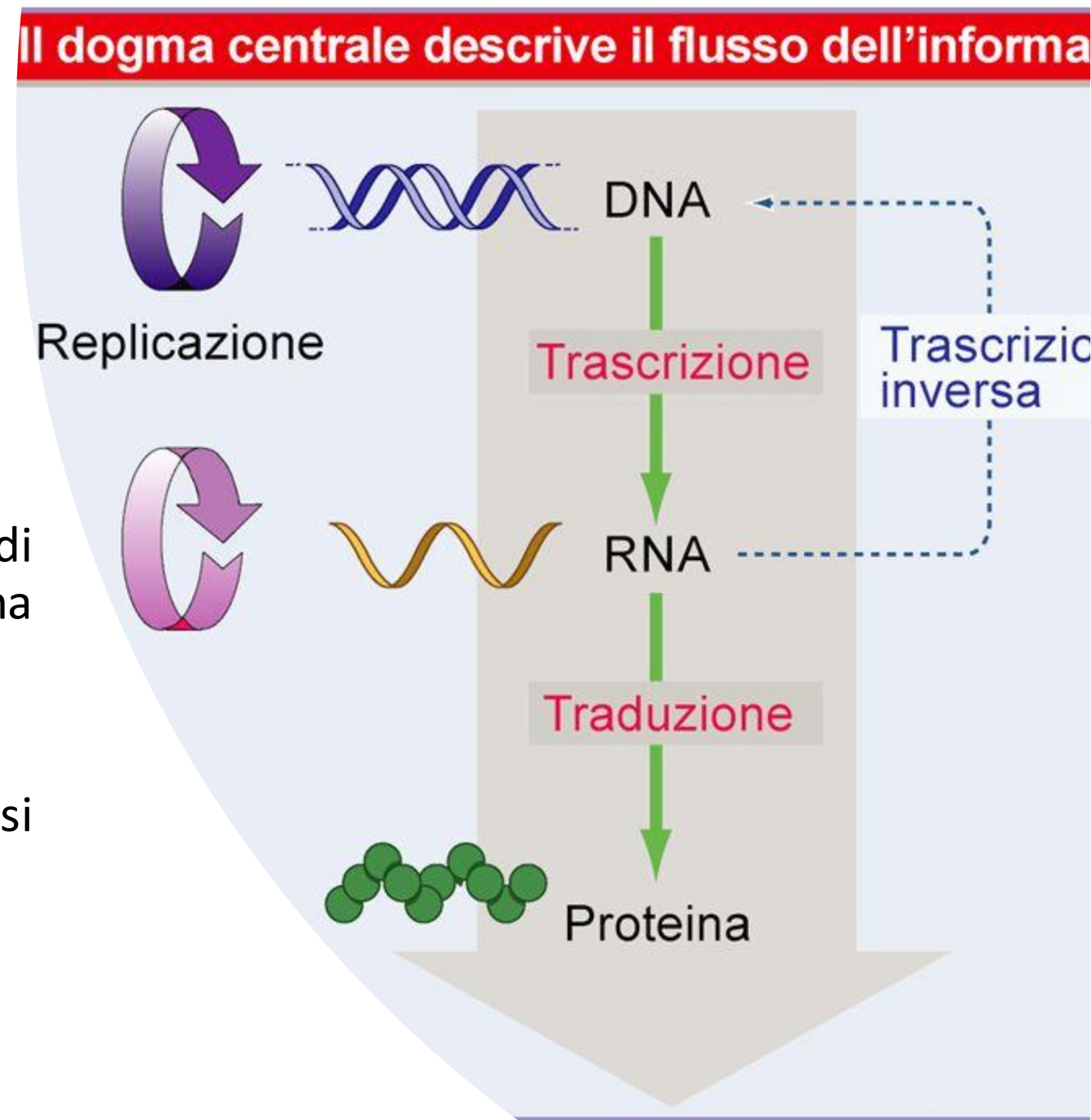


Traduzione

Consiste nella sintesi di proteine a partire di una molecola di mRNA da parte del ribosoma e altre componenti ausiliari.

- Negli eucarioti avviene nel citoplasma
- Nei procarioti avviene in modo quasi simultaneo alla trascrizione



Apparato di traduzione

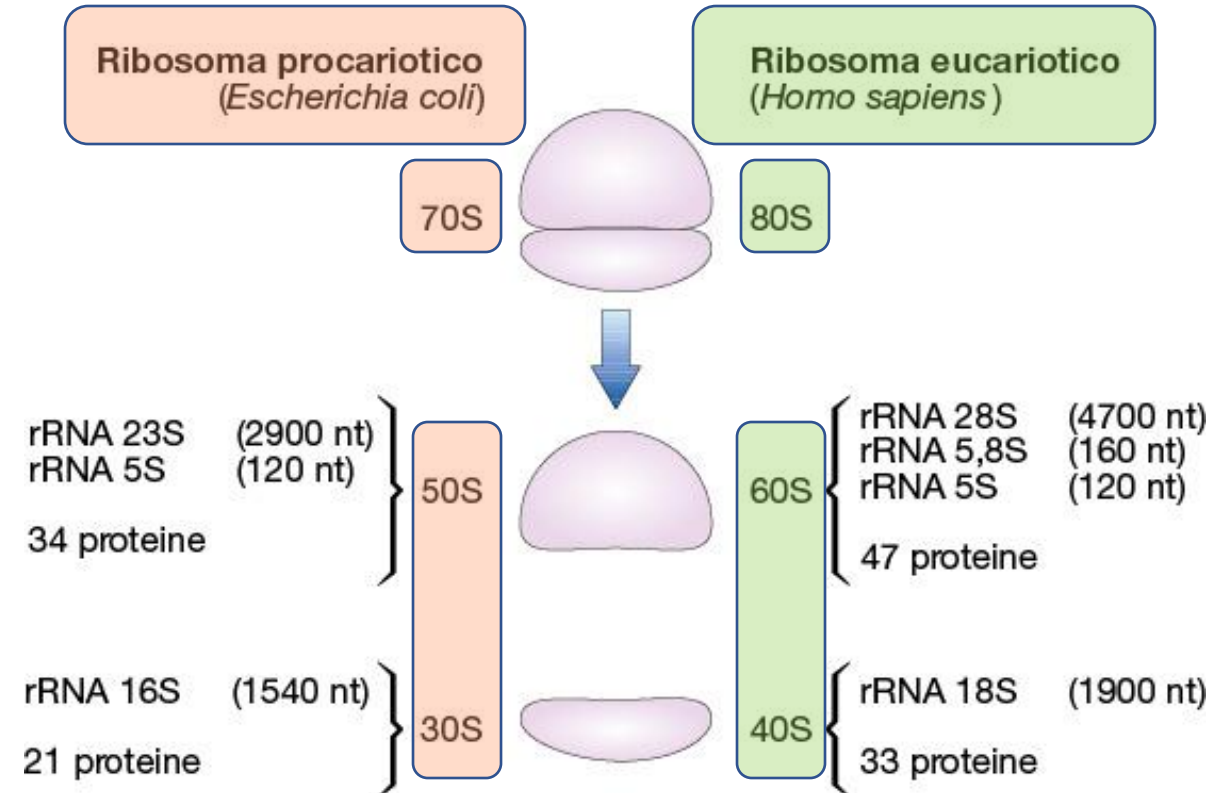
mRNA, tRNA e rRNA

Fattori specifici per
ciascuna delle fasi di
Inizio, allungamento
e terminazione

Energia in forma di
ATP o GTP

Ribosoma

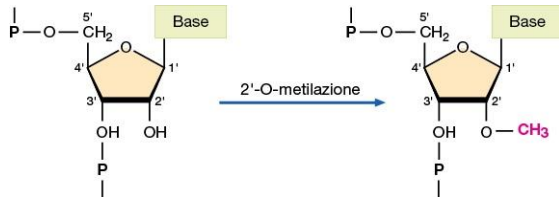
- Sono i responsabili di **decodificare** l'informazione contenuta nel mRNA per la sintesi proteica
- La loro struttura è **molto conservata**
- Sono composti da **rRNA** e da **proteine (rp o r-proteine)**. I due componenti si assemblano dando luogo a 2 subunità ribosomiali: **subunità maggiore** e **subunità minore**
- In procarioti ed eucarioti esistono delle piccole differenze nella composizione che portano a diverso coefficiente di sedimentazione per ogni subunità
- Gli eucarioti possiedono anche i **ribosomi specifici degli organelli**, che assomigliano ai 70S dei procarioti.



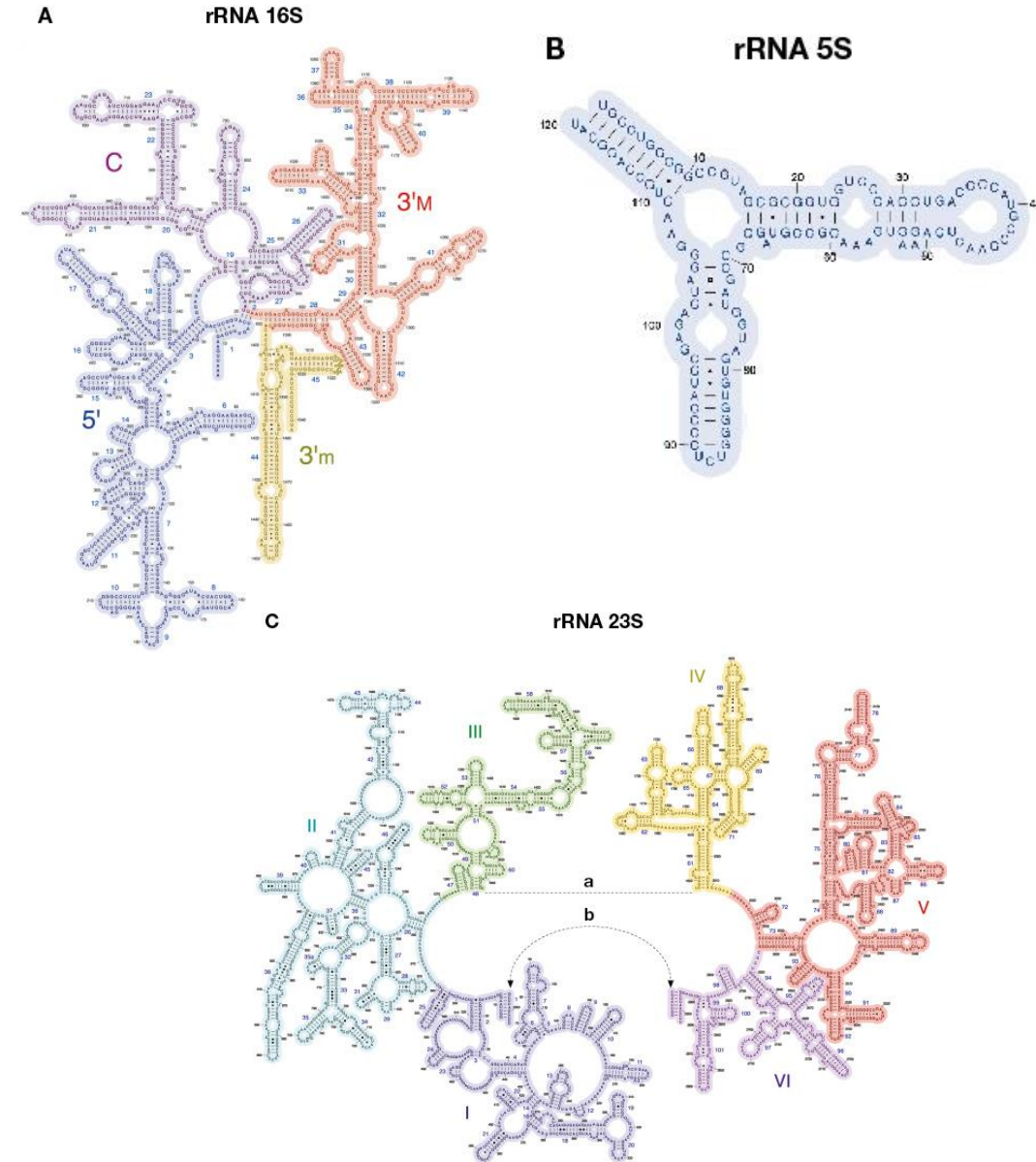
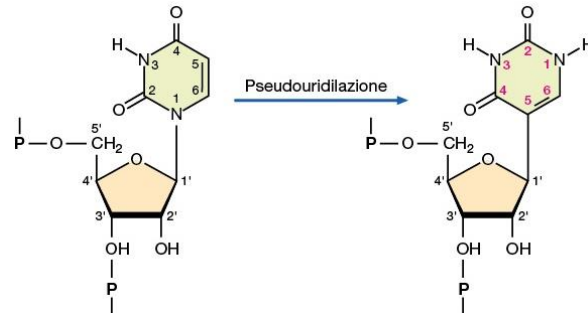
Ribosoma: rRNA

- Gli rRNA sono stati i **primi RNA ad essere isolati** grazie alla loro **abbondanza (80% del totale presente nella cellula)** e **stabilità**.
- Ha una **struttura secondaria a doppia elica** causata dall'appaiamento di **sequenze complementari all'interno della stessa molecola**.
- La sua struttura secondaria si vede ancora rappresentata nella struttura terziaria del ribosoma, supportando la **correlazione sequenza-struttura-funzione** e il **ruolo principale del rRNA per la funzione del ribosoma**.
- Le **modificazioni principali del rRNA** (come visto precedentemente) sono:

Metilazione del 2'-O del ribosio

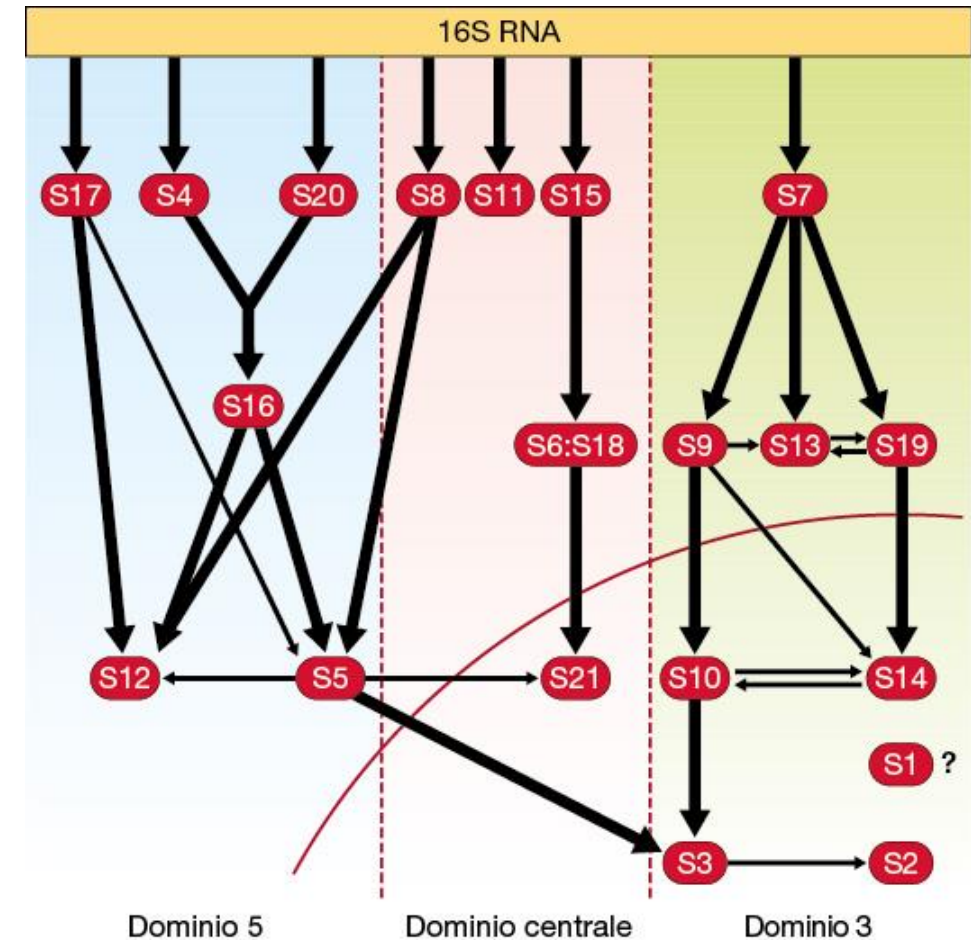


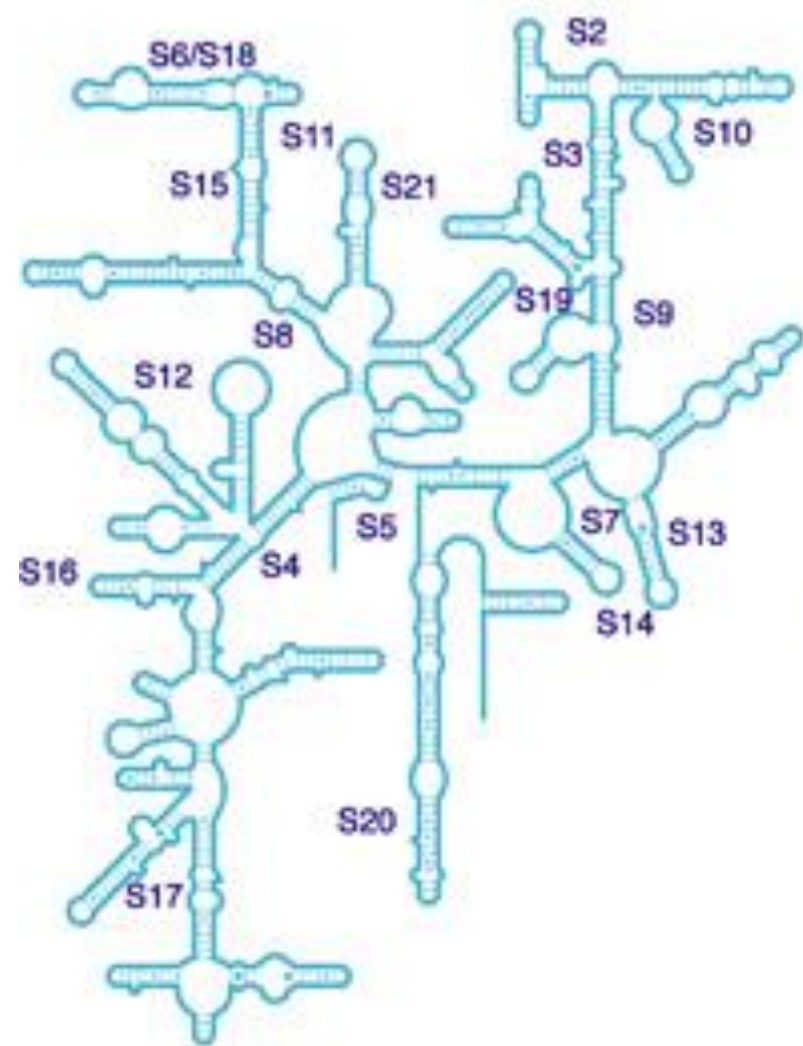
Pseudouridilazione



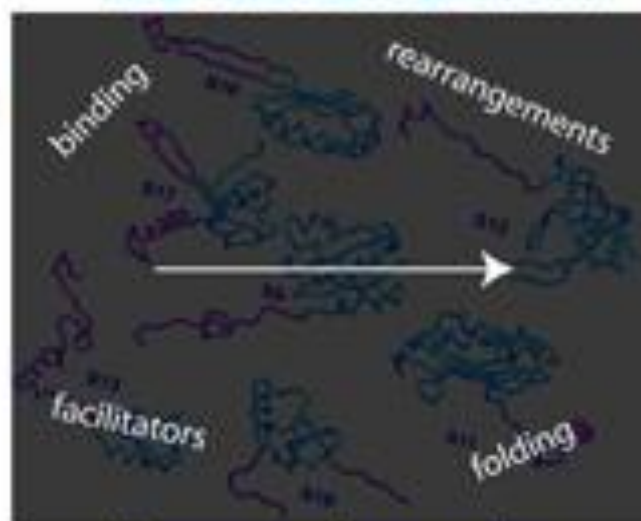
Ribosoma: r-proteine

- Proteine **molto conservate**, generalmente di carattere basico.
- **rpS1-rpS2....** Per la subunità minore del ribosoma (*ribosomal protein small*)
- **rpL1-rpL2...** per la subunità maggiore (*ribosomal protein large*)
- Esperimenti trattando subunità ribosomiali batteriche con concentrazioni saline crescenti hanno indicato che il **disassemblaggio** delle proteine del ribosoma avviene in modo **sequenziale** in moduli o gruppi di proteine. Lo stesso ordine nel quale avviene il riasssemblaggio invertendo il trattamento
- **L'ordine di assemblaggio** è importante per l'ottenimento di un ribosoma funzionale





16S ribosomal RNA

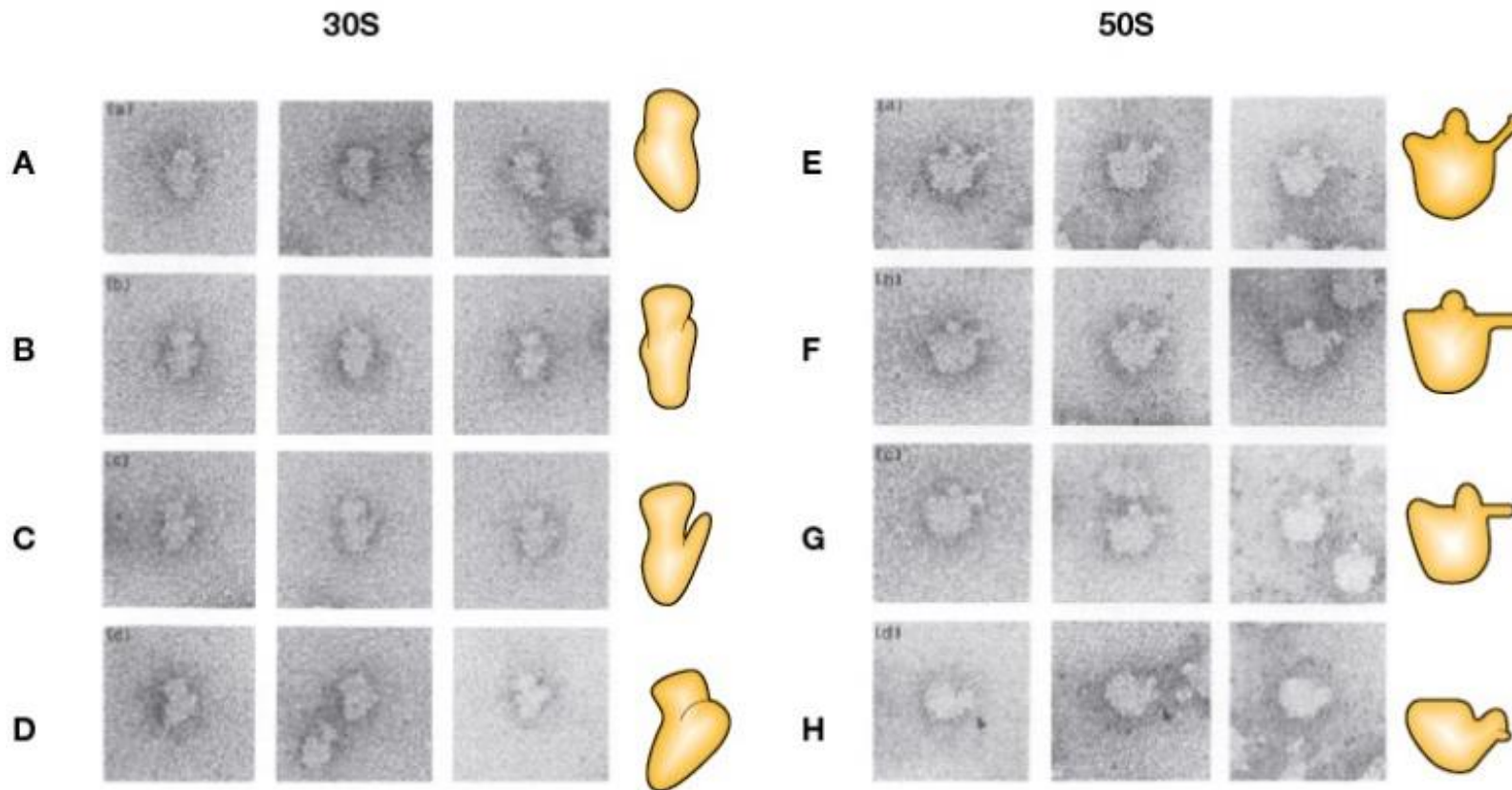


ribosomal proteins



Struttura tridimensionale del Ribosoma

- La struttura del ribosoma è stata completata dopo anni di studi e grazie alla combinazione di diverse tecniche: microscopia elettronica, biochimica e diffrazione dei raggi X di cristalli di subunità ribosomiali.

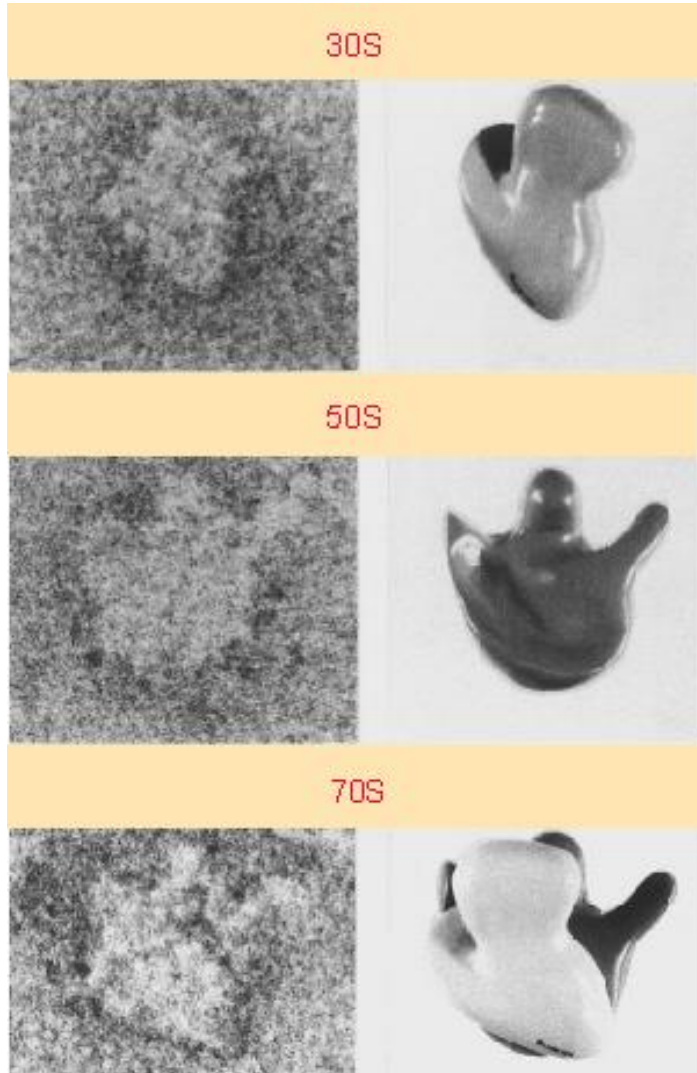


Questi studi furono affrontati inizialmente usando **preparazioni ribosomiali di organismi estremofili**, capaci di crescere in condizioni estreme e per questo con dei ribosomi più resistenti ai diversi trattamenti necessari per lo studio.

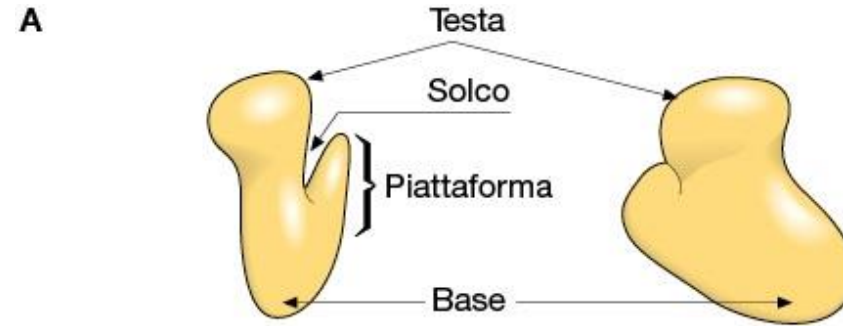
L'analisi di centinaia d'immagini ha permesso la creazione di modelli tridimensionali delle 2 subunità del ribosoma: 30S e 50S

Struttura tridimensionale del Ribosoma

(proposta alla fine degli anni 70, rielaborata negli anni 90 e completata nel 2000)



A



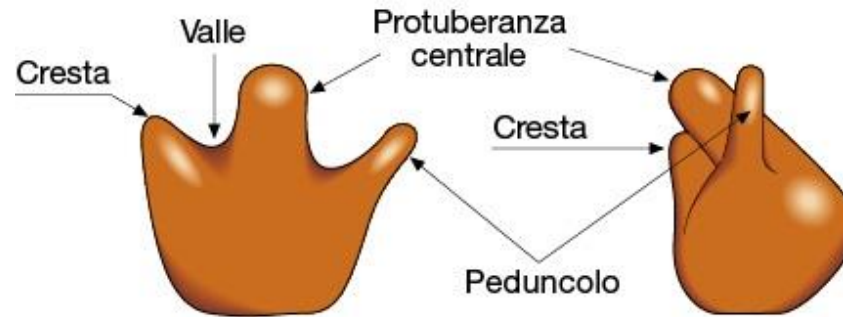
30S

Subunità minore:

Si osserva una base (o corpo) e una testa. Dalla base protrude una piattaforma separata dalla testa da un solco

rRNA 16S (1540 nt)

21 proteine



50S

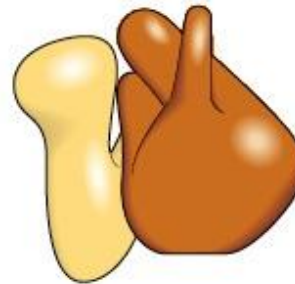
Subunità maggiore:

Esiste una protuberanza centrale fiancheggiata da una cresta e un peduncolo

rRNA 23S (2900 nt)

rRNA 5S (120 nt)

34 proteine



70S

Struttura tridimensionale del Ribosoma

(proposta alla fine degli anni 70, rielaborata negli anni 90 e completata nel 2000)

A) struttura secondaria dell'rRNA

B) struttura tridimensionale dell'rRNA

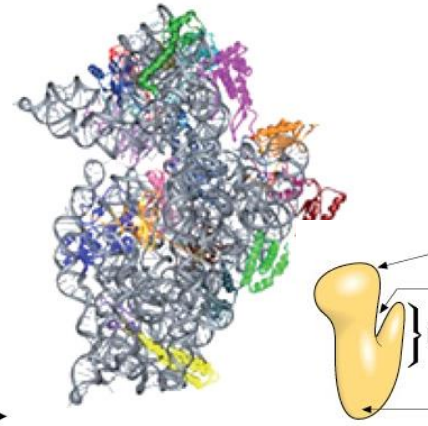
C) struttura della subunità ribosomale



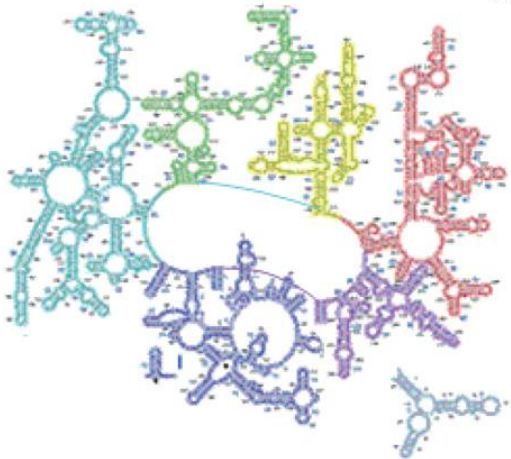
rRNA 16S



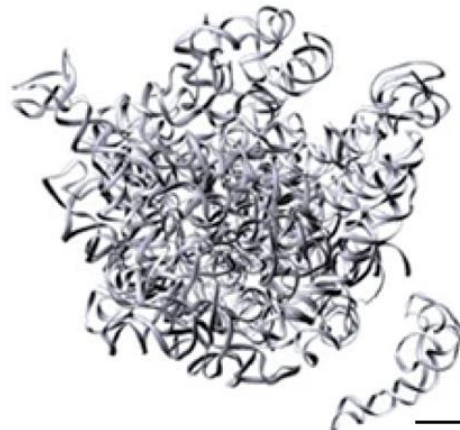
+21 r-proteine



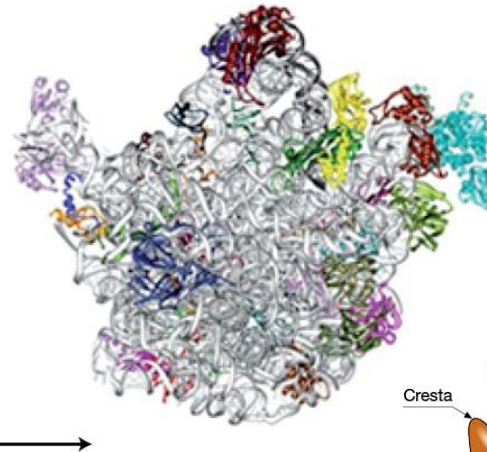
subunità 30S



rRNA 23S+5S



+34 r-proteine



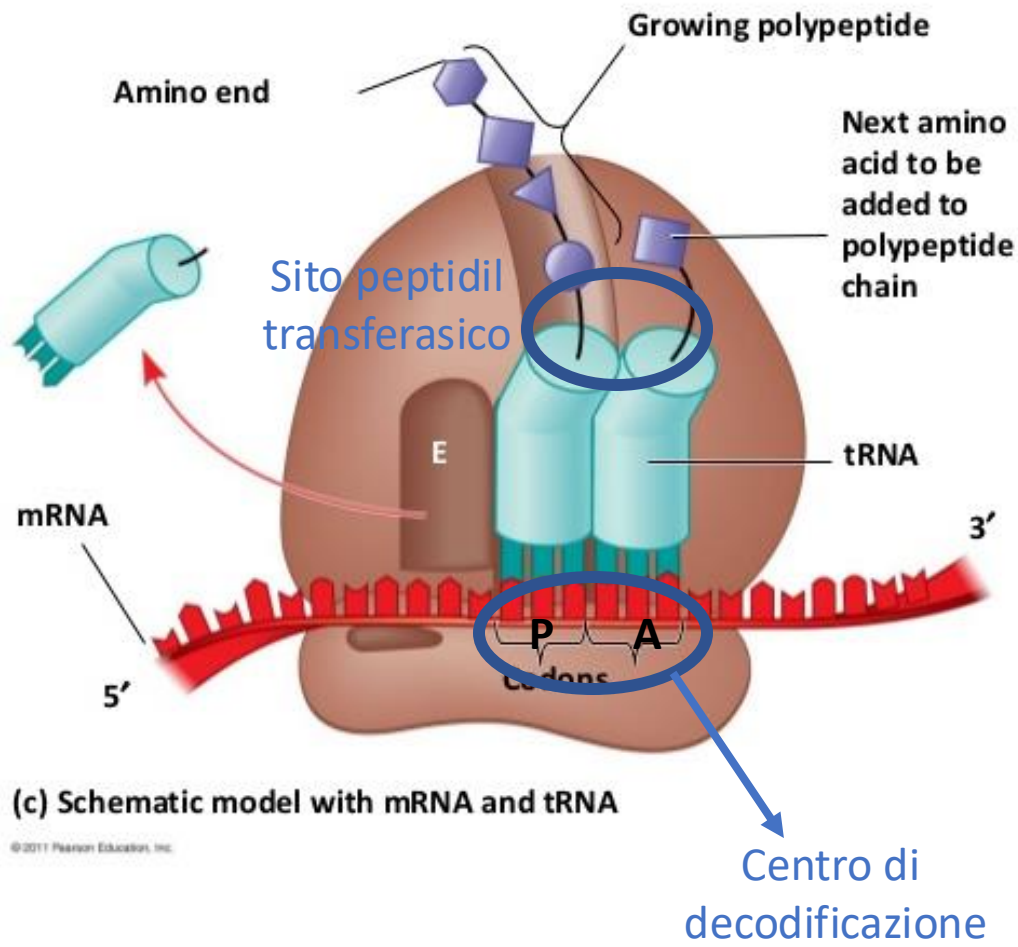
subunità 50S

La **somiglianza strutturale** tra gli rRNA e le subunità del ribosoma indica il ruolo principale del rRNA nella conformazione del ribosoma.

Le **r-proteine** si assemblano direttamente sul rRNA o attraverso altre r-proteine sulla **superficie esterna del ribosoma**.

Struttura tridimensionale del Ribosoma

Figure 17.17c



Il ribosoma ha **3 siti di legame per il tRNA**:

Sito A (Amminoacilico o Accettore): lega il tRNA amminoacilato

Sito P (Peptidilico): lega il tRNA che è già entrato con la catena peptidica nascente che si trova già in P

Sito E (Exit): lega il tRNA scarico per essere rilasciato

I **siti A e P** si trovano occupando **2 emisiti** nella subunità maggiore e minore:

- un sito di decodificazione sulla subunità minore dove si appaiano i codoni del mRNA con i tRNA
- Un sito responsabile della formazione dei legami peptidici o sito peptidil transferasico, che si trova sulla subunità maggiore.

La **subunità 30S** presenta **2 piccoli canali di entrata e uscita** dove scorre l'mRNA, e cui larghezza non permette la formazione di strutture secondarie del RNA

La **subunità 50S** ha un **canale di uscita per il peptide nascente**

L'rRNA è il catalizzatore della sintesi proteica

- La scoperta dei primi ribozimi evidenziò la **capacità del RNA di catalizzare reazioni chimiche**, aprendo la possibilità di un suo ruolo principale nel processo di traduzione:
 - L'rRNA 30S da solo senza r-proteine è in grado di catalizzare la formazione di legami peptidici (bassa efficienza)

Le reazioni di decodificazione e peptidil transferasi avvengono nei siti A e P che sono costituiti dai rRNA, mentre le r-proteine si trovano in zone esterne del ribosoma.

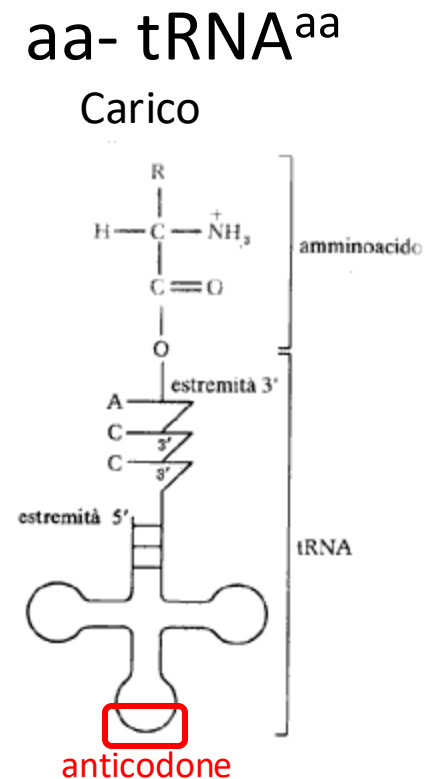
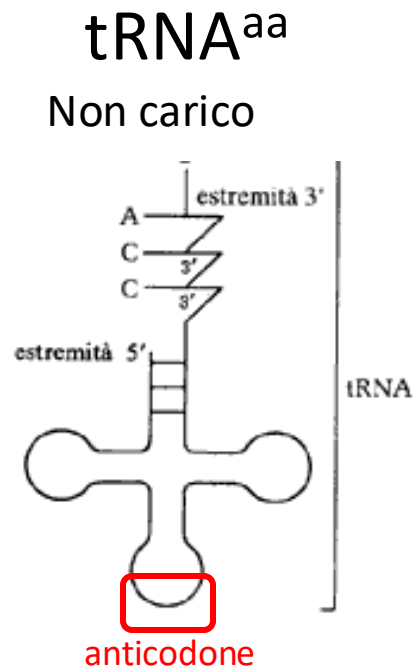
Ruolo delle r-proteine?

Contribuiscono alla **corretta configurazione del rRNA** che porta alla efficiente e accurata sintesi proteica.

Le r-proteine sono **indispensabili** per il processo di traduzione e vita della cellula

Sintesi proteica: tRNA e ribosoma

- Esiste **almeno un tRNA per ogni amminoacido**, e sono costituiti da una sequenza lunga **79-93 nt**
- I tRNA prendono diverse nomenclature a seconda che siano carichi o meno con l'amminoacido corrispondente:



Sintesi proteica: tRNA e ribosoma

Tutti i tRNA hanno una **struttura secondaria a trifoglio** mediata dalla interazione tra basi complementari in regioni diverse nella sequenza nucleotidica. Come conseguenza si formano delle forcine o braccia:

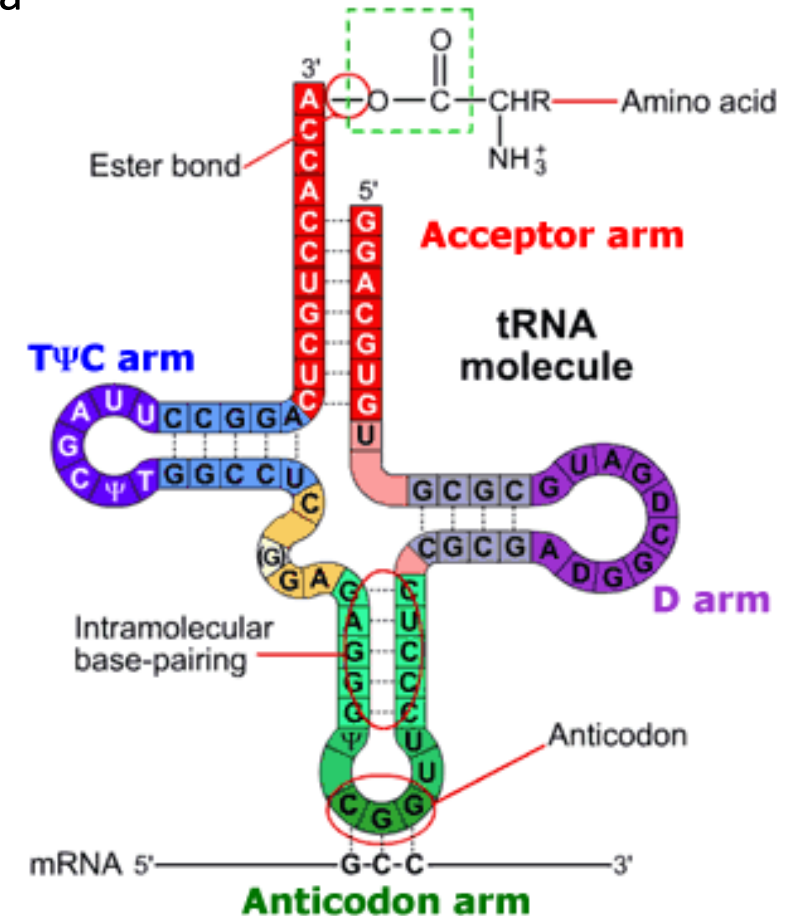
Braccio ACCETTORE: appaia le 2 estremità della molecola e lega l'amminoacido all'estremità 3' con sequenza CCA

Braccio TΨC: caratterizzato dalla presenza di una T e una pseudouridina

Braccio D: caratterizzato dalla presenza di una diidrouridina

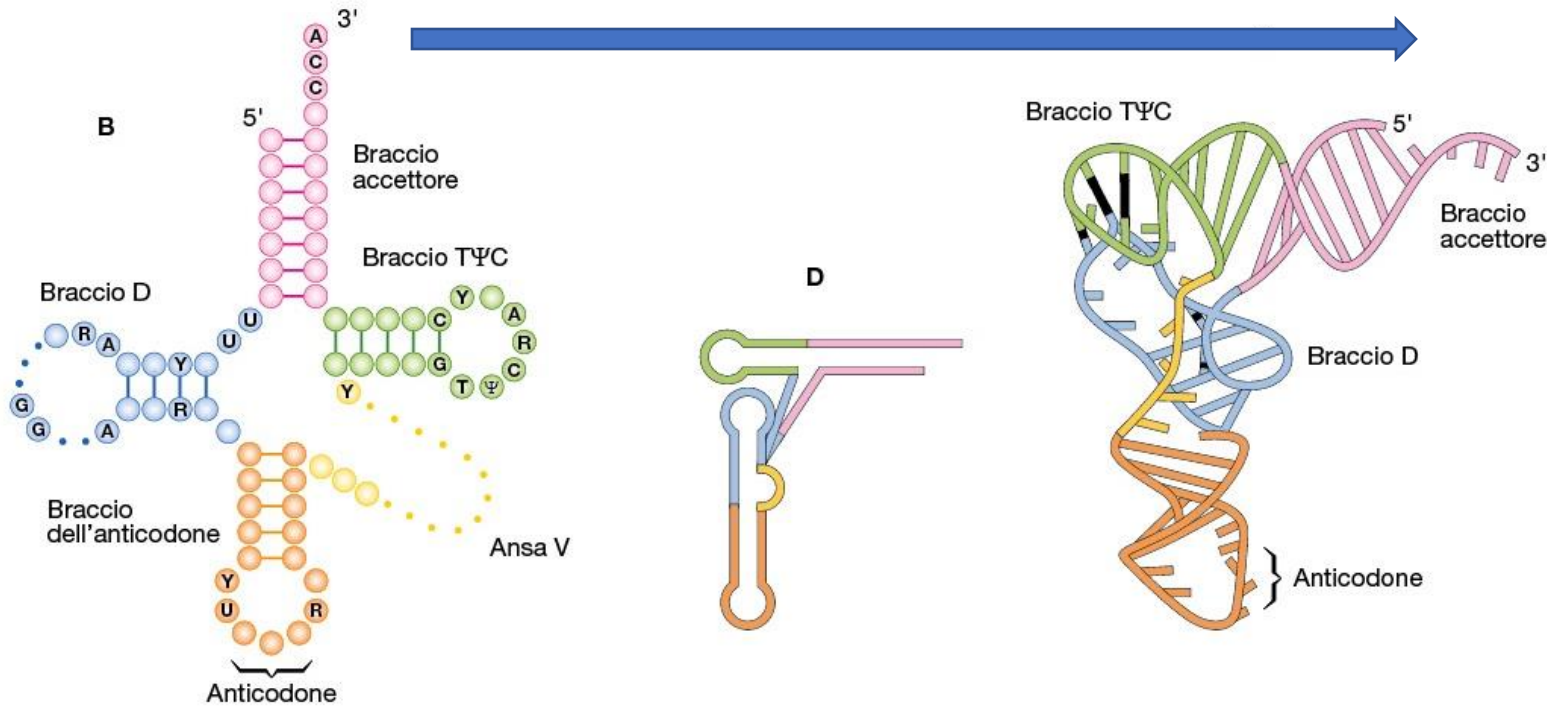
Braccio dell'anticodone: contiene la tripletta di nucleotidi che riconosce il codone sull'mRNA. E' sempre fiancheggiato da una purina al 3' e un uracile al 5'

Braccio variabile o ansa V: lunghezza variabile 3-21 basi



Sintesi proteica: tRNA e ribosoma

Tende a formare una doppia elica assumendo una struttura tridimensionale a L



I tRNA non hanno affinità specifica per gli amminoacidi che caricano.

La specificità dipende in gran parte della amminoacil-tRNA sintetasi che carica l'aa.

Creano delle interazioni specifiche codone-anticodone

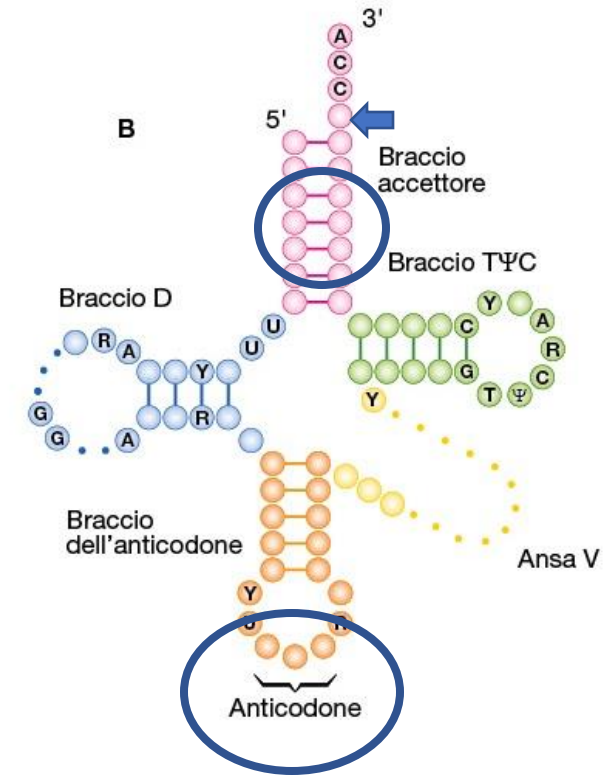
Caricamento aa sul tRNA: *amminoacil-tRNA sintetasi*

Esistono **20 diverse enzimi amminoacil-tRNA sintetasi**, una per ogni aa.

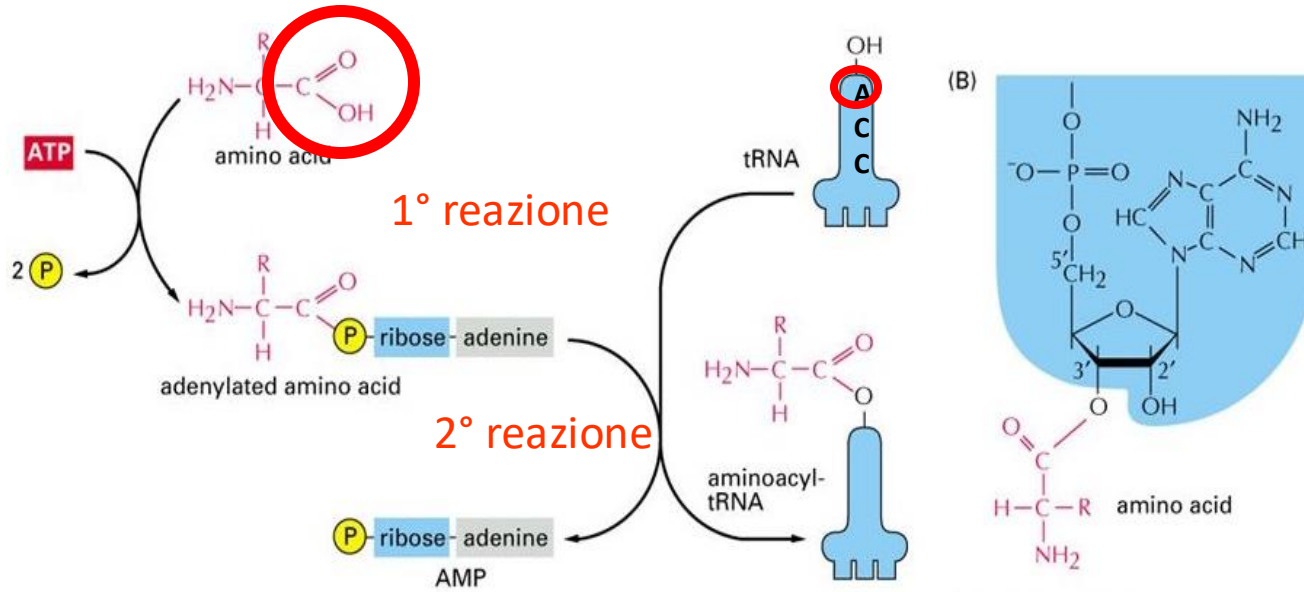
Le amminoacil-tRNA sintetasi riconoscono tutti gli tRNA su cui l'aa specifico che riconoscono può essere caricato (**tRNA isoaccettori**).

Il **riconoscimento del tRNA isoaccettore** è mediato dal riconoscimento di **1-5 basi distribuite sul tRNA**, che in genere sono distribuite 1 nel anticodone, 1 nello stello accettore e la base adiacente al CCA

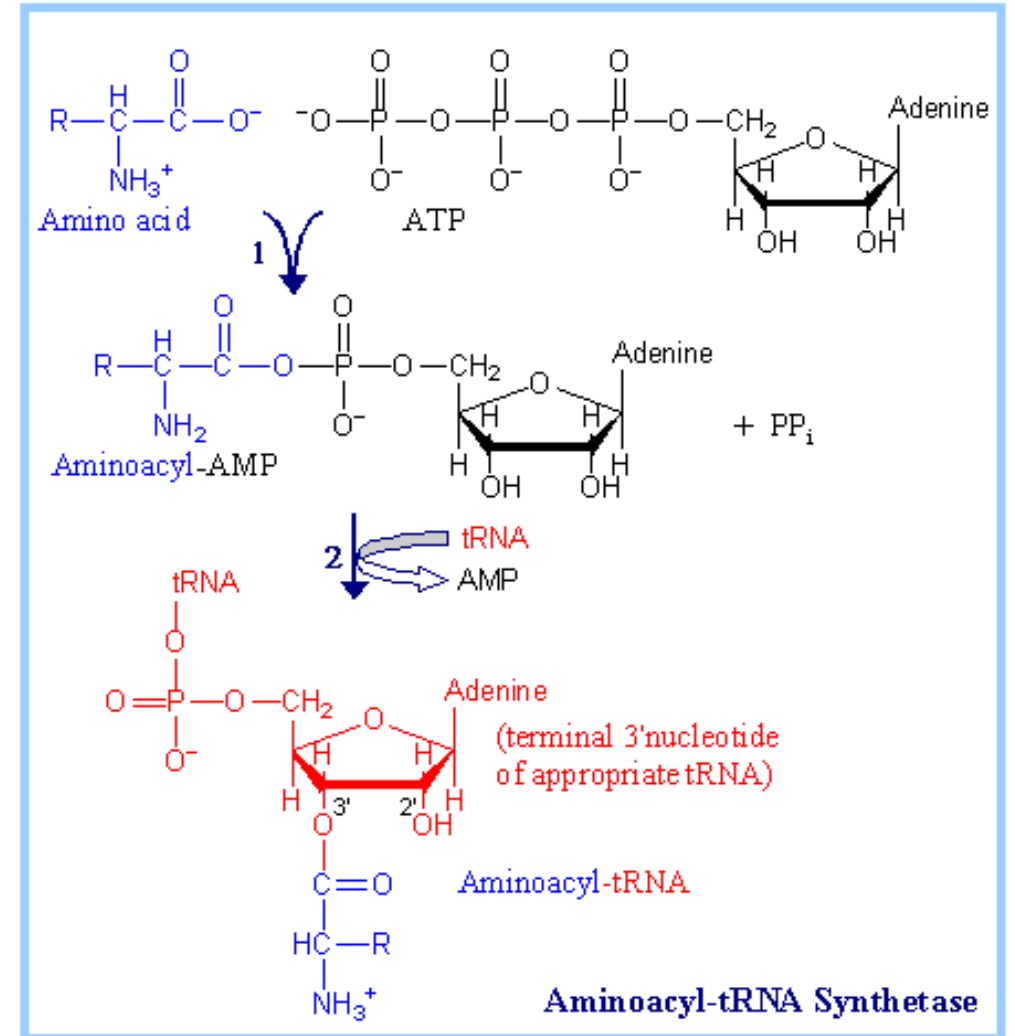
La **specificità e accuratezza della traduzione** dipende in gran parte della amminoacil-tRNA sintetasi che media il riconoscimento dell'aa e del tRNA.



Caricamento aa sul tRNA: *amminoacil-tRNA sintetasi*

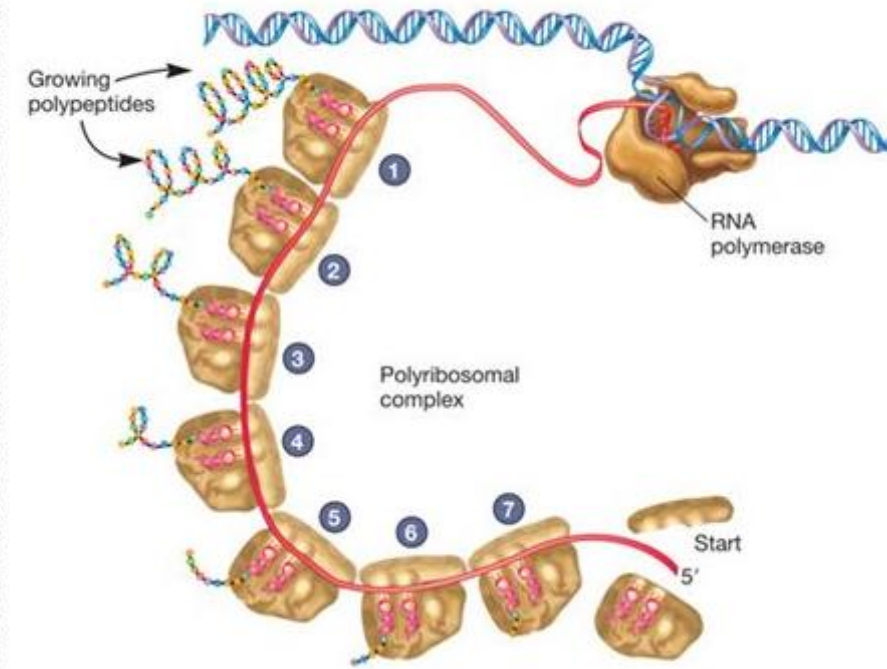
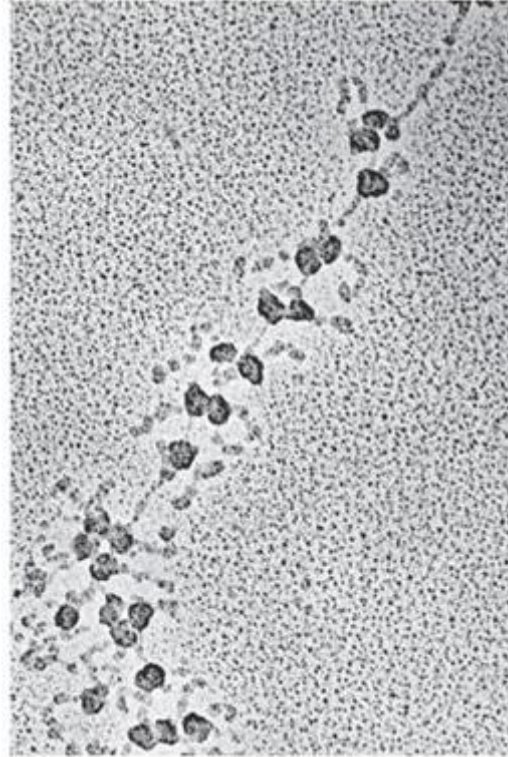


L'amminoacil-tRNA sintetasi crea un **legame ad alta energia** tra il **gruppo carbossilico** del aa e il **gruppo idrossilico 2' o 3'** della adenosina nella estremità 3' del tRNA



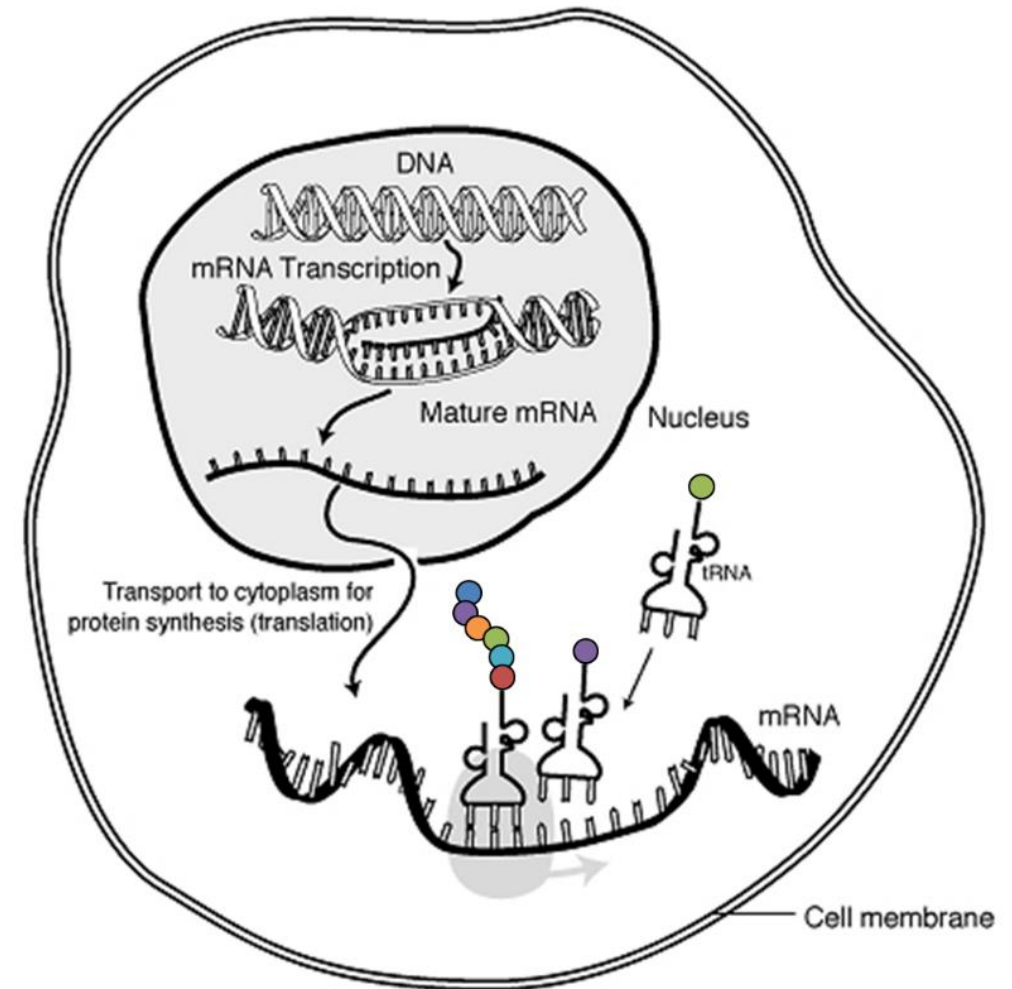
Sintesi proteica: mRNA e ribosoma

- **L'mRNA** è stato **l'ultimo RNA isolato** a causa della bassa quantità (2-5%) e poca stabilità (2 min di vita media)
- In **procarioti**, la **trascrizione e traduzione sono processi simultanei**, caratteristica che porta ad non ottenere quasi mai delle molecole di mRNA intere.
- Mano a mano che la **trascrizione procede in direzione 5'→3'**, i ribosomi si assemblano e leggono il trascritto nella stessa direzione.



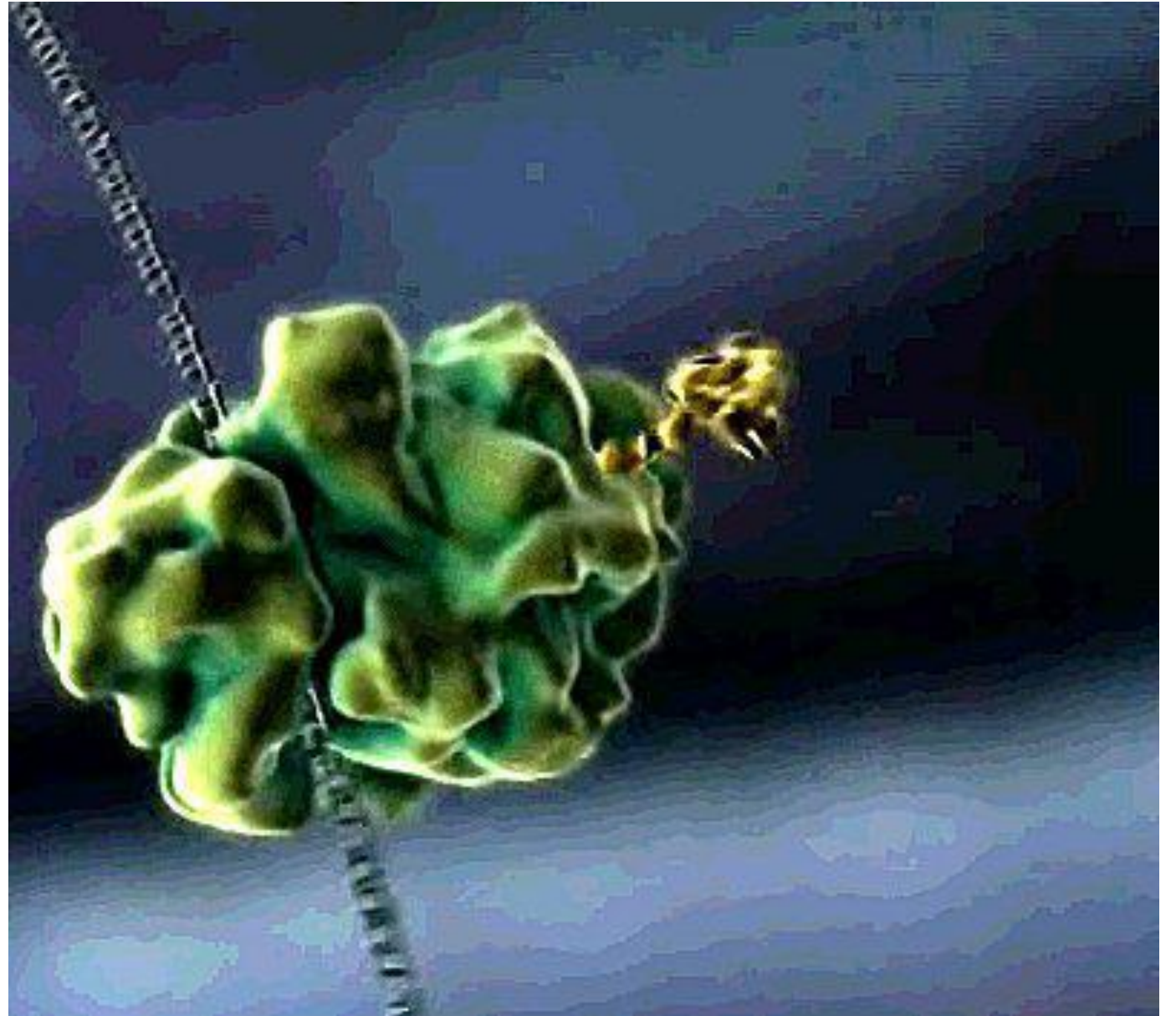
Sintesi proteica: mRNA e ribosoma

- Negli **eucarioti** la traduzione avviene nel **citoplasma**, dove il mRNA maturo viene trasportato dal nucleo prima di legare i ribosomi.
- Avviene sempre in **direzione 5'->3'**



Meccanismo della sintesi proteica

- Inizio
- Allungamento
- Terminazione



Meccanismo della sintesi proteica

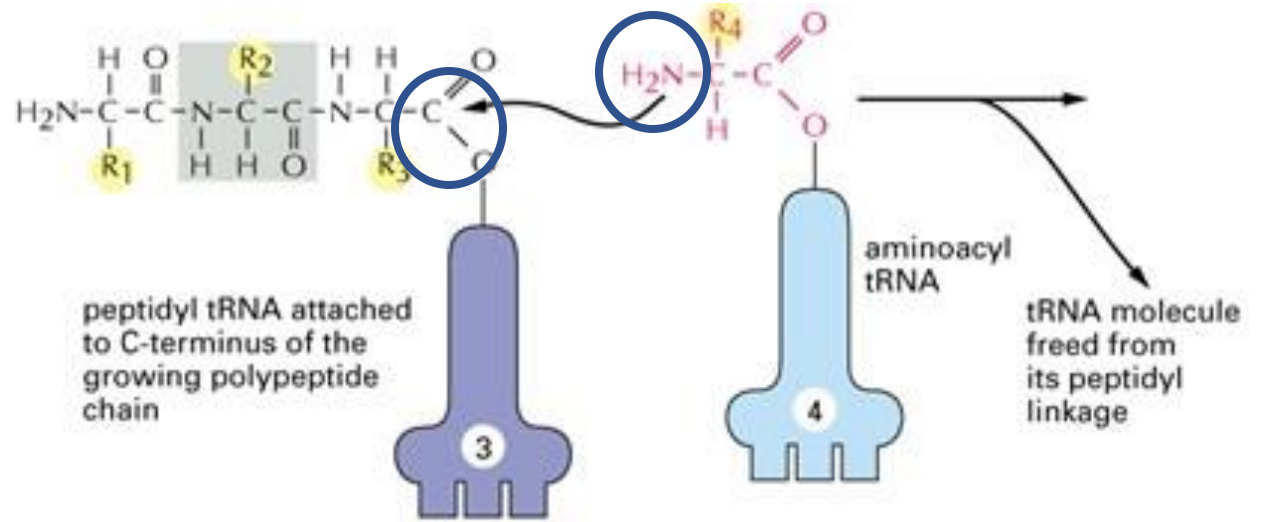
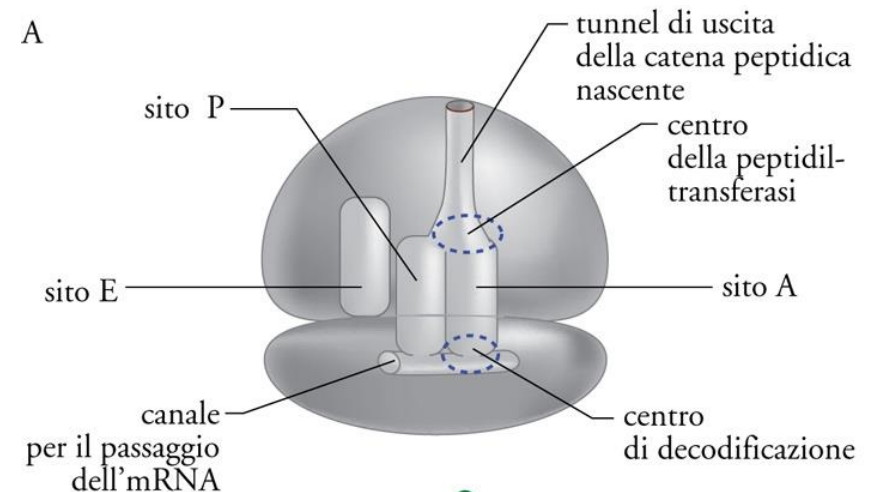


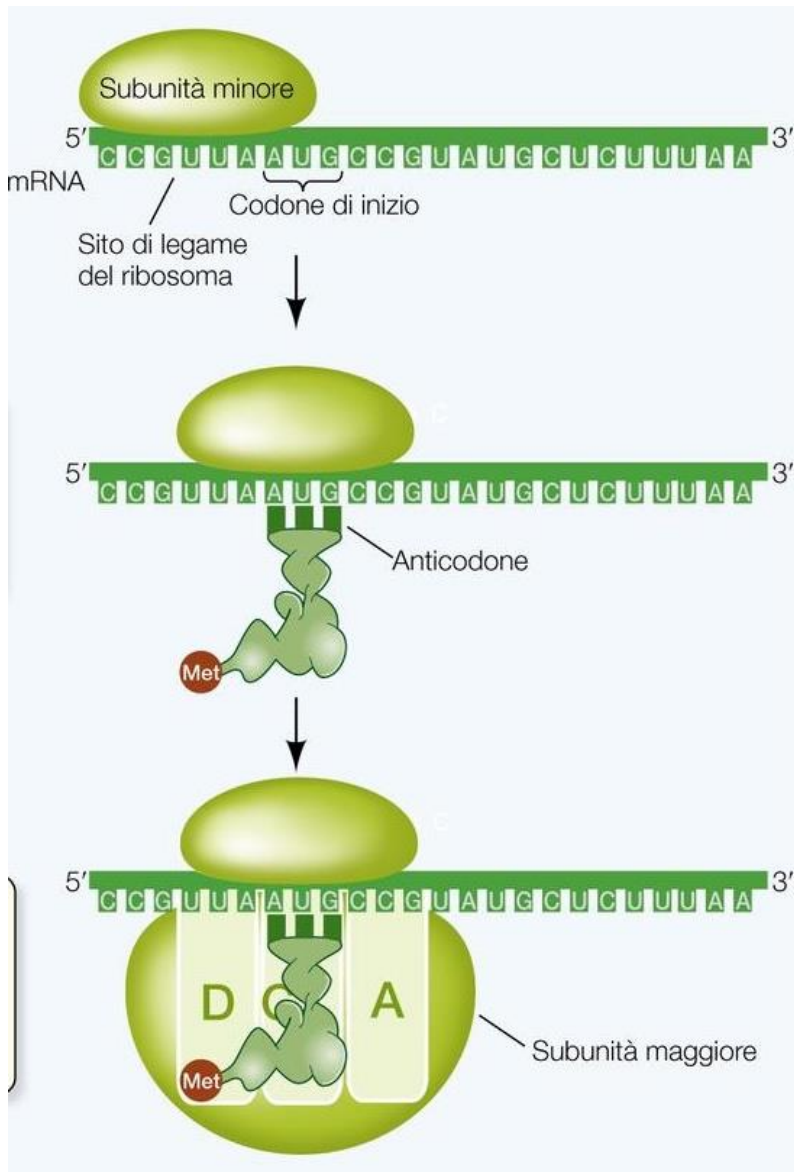
Figure 6-61 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Evento fondamentale: **formazione del legame peptidico** tra il **gruppo amminico di un nuovo aa** ed il **gruppo carbossilico della catena peptidica nascente** mediante una reazione **peptidil transferasica** nel sito catalitico

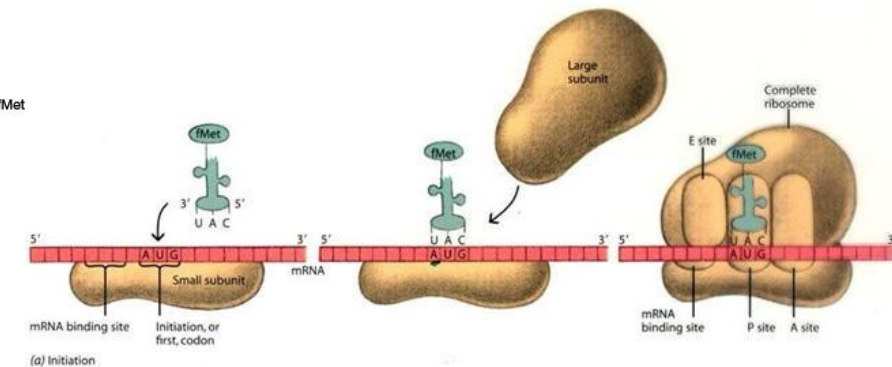
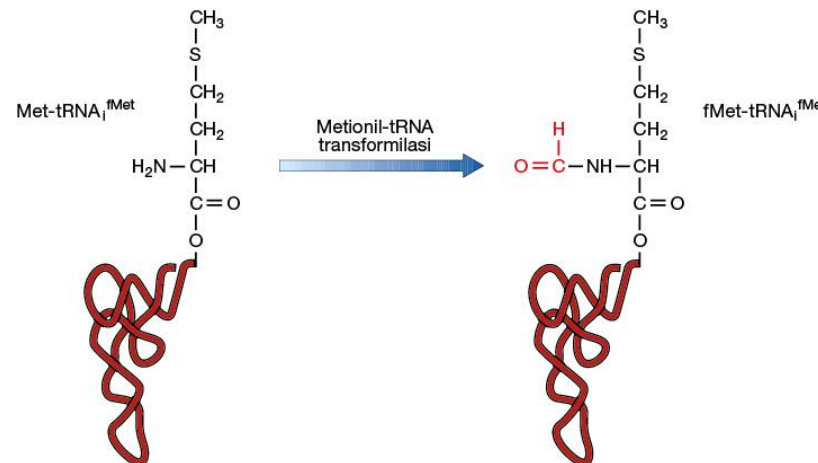


Fase di INIZIO

Complesso di inizio: Procarioti

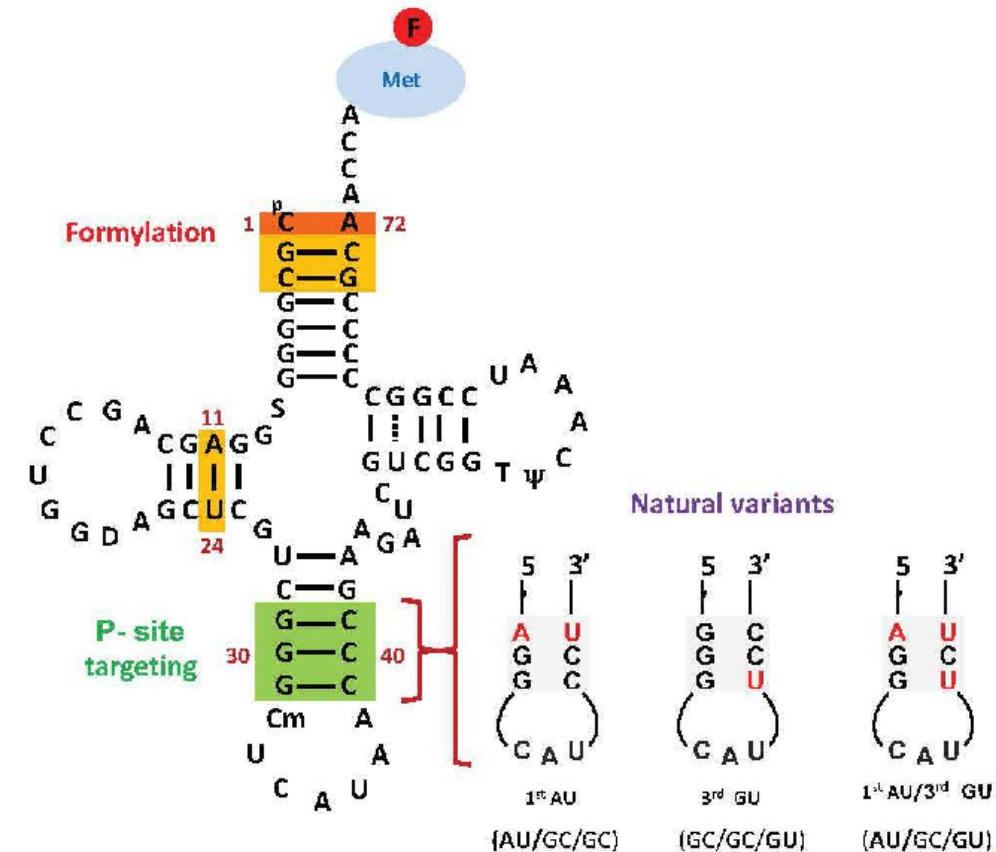


- La subunità minore è la prima che si lega al mRNA.
- La **sintesi proteica inizia** generalmente dal **codone AUG** che riconosce il **Met-tRNA** e comincia la sintesi proteica dalla estremità proteica **N-terminale**.
- Una volta caricata sul tRNA, la Met d'inizio è **modificata chimicamente con un gruppo formilico** mediante l'enzima **metionil-tRNA transformilasi**: **fMet-tRNA_i^{fMet}**
- La **formilazione blocca il gruppo amminico** che è fondamentale per la creazione del **legame peptidico** con l'aa precedente impedendo che venga utilizzata durante l'allungamento.
- Il fMet-tRNA_i^{fMet} entra direttamente nel **emisito (30S) del sito P**, non nel sito A come accade con tutti gli altri aminoacil-tRNA
- Co-esistono dei Met-tRNAs che potranno essere inseriti in posizione interna della catena polipeptidica

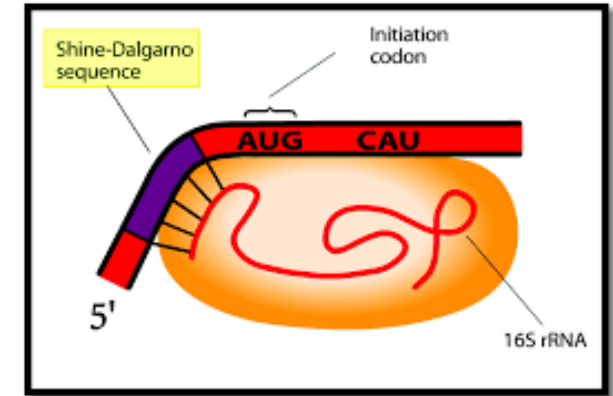
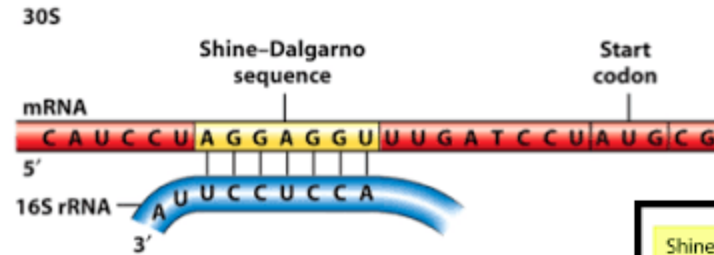
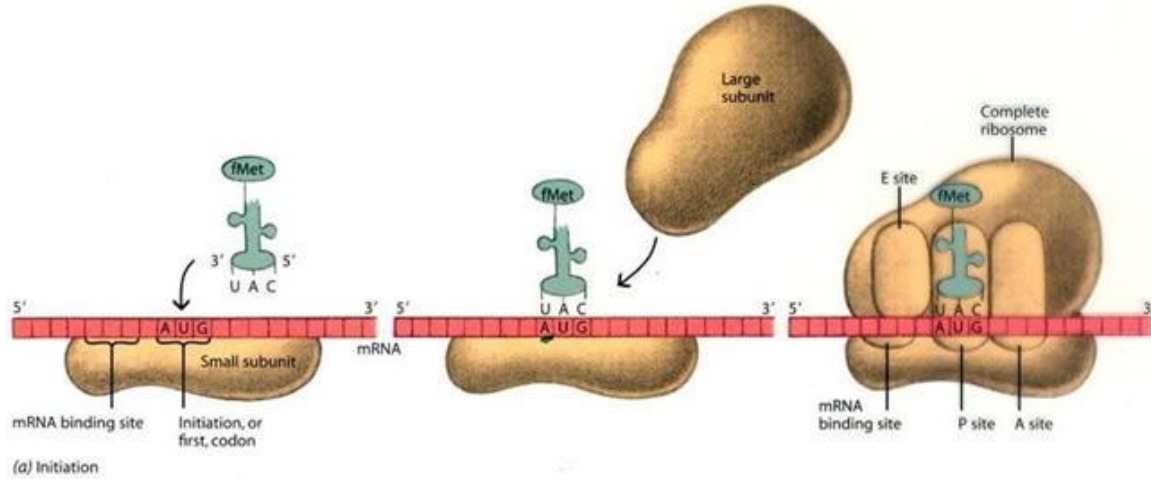


Initiator tRNAs

- Structural features of initiator tRNAs ensure that they are recognized by translation initiation factors and discriminated against by translation elongation factors.
- The important determinants of **initiator tRNA** in bacteria are the absence of a Watson–Crick base pair between positions 1 and 72 in the acceptor stem and the presence of three conserved consecutive G:C base pairs in the anticodon stem.
- The methionine of bacterial initiator tRNA is formylated by methionyl tRNA transformylase, which mainly recognizes the absence of the 1:72 Watson–Crick base pair.



Riconoscimento del codone di inizio AUG



- **Sette nucleotidi a monte dell'AUG di inizio** è presente una sequenza molto conservata chiamata **sequenza di Shine-Dalgarno: AGGAGG**.
- Questa sequenza è **riconosciuta dai ribosomi** in quanto la sequenza è **complementare all'estremità 3' rRNA 16S** (parte della subunità minore 30S), essendo così **importante per l'assemblaggio del complesso d'inizio nella posizione corretta**.
- I siti per le Met interne non presentano la sequenza Shine-Dalgarno *a monte*.

Complesso di inizio: Procarioti

- Fattori d'inizio

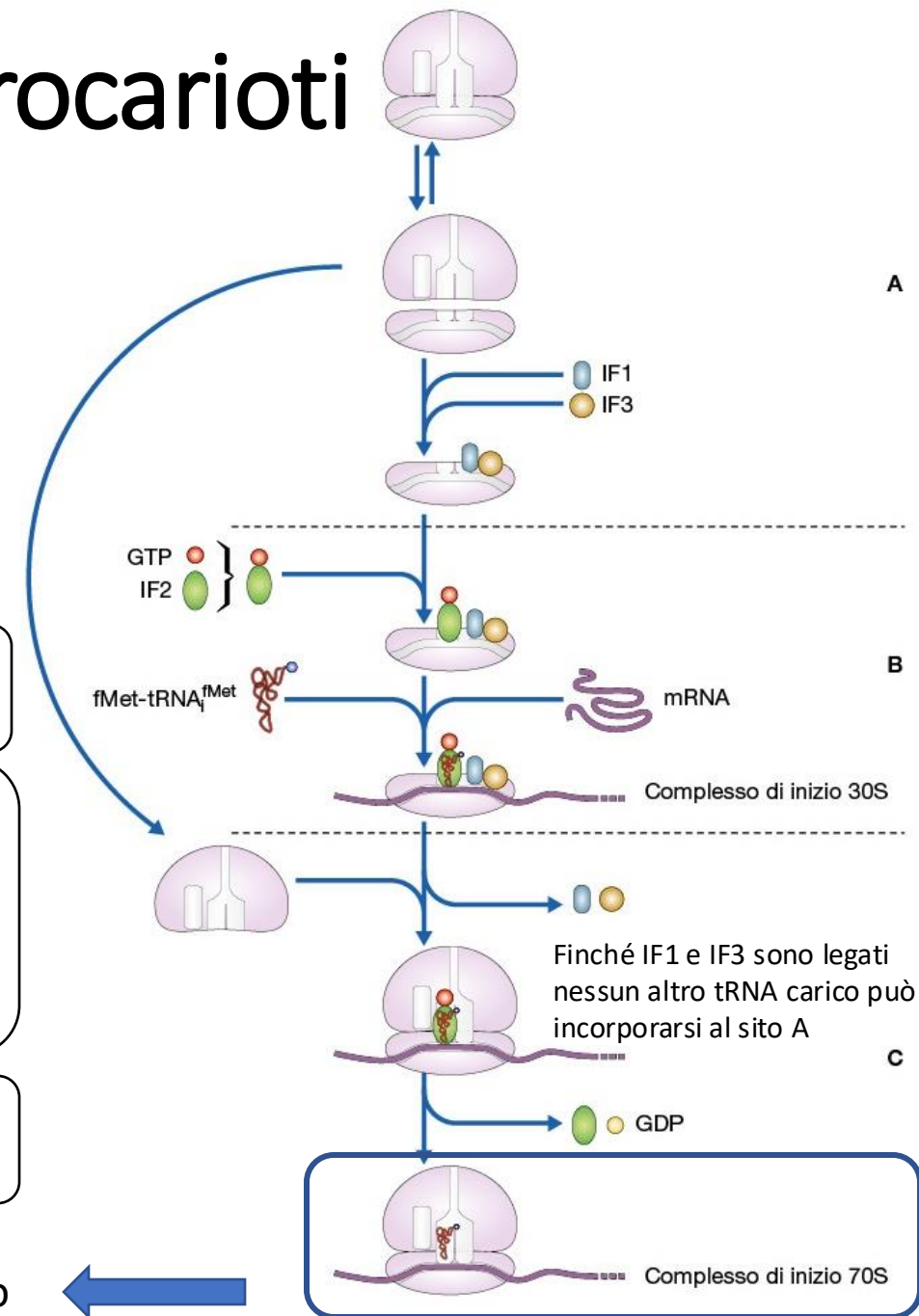
- IF1** (blue square) • Necessari per la formazione del complesso d'inizio interagendo con la subunità **30S**, l'**mRNA** e un **fMet-tRNA_i^{fMet}**
- IF3** (yellow circle)
- IF2** (green oval)

- IF1** • Implicato nella dissociazione del ribosoma nelle 2 subunità
- Si lega al 30S nella regione che formerà il sito A

- IF3** • Implicato nella dissociazione del ribosoma nelle 2 subunità
- Rimane legato alla 30S e permette, in un secondo momento, che si leghi in modo specifico al sito di inizio sull'**mRNA** e il posizionamento del **fMet-tRNA_i^{fMet}** nel emisito P mediato da IF2

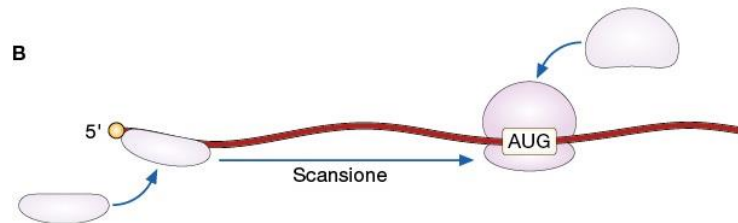
- IF2** • GTPasi che interagisce con la 30S e promuove il legame al sito P della **fMet-tRNA_i^{fMet}**

Questo complesso è pronto per la fase d'allungamento

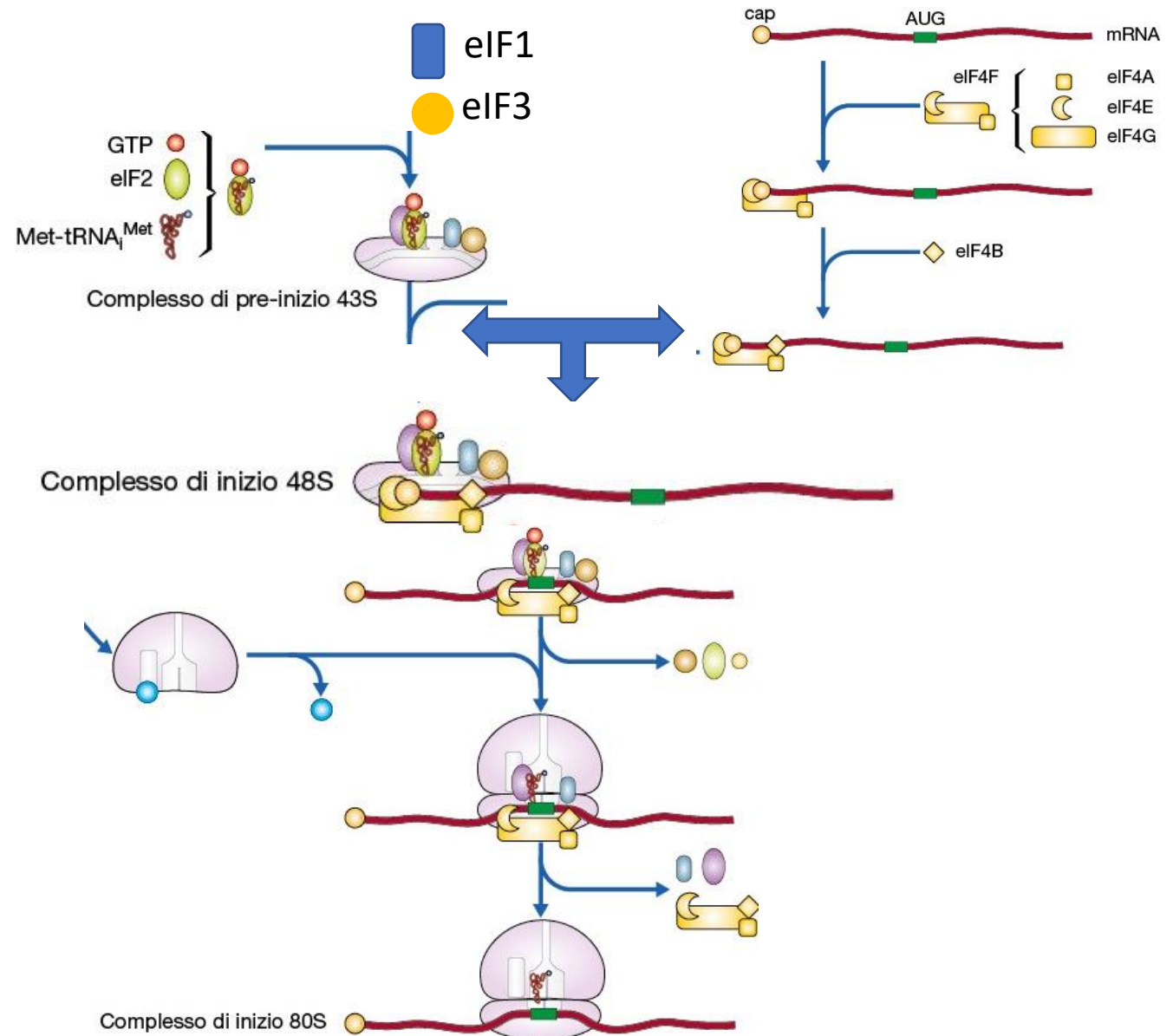


Complesso di inizio : Eucarioti

- Il complesso **pre-inizio 43S** negli eucarioti è composto sempre della **subunità 30S, mRNA e tRNA**
- La **Met d'inizio non è formilata** però esiste un **tRNA per l'inizio ($\text{tRNA}_i^{\text{Met}}$)** e un altro per la fase di allungamento (tRNA^{Met})
- Il 30S interagisce con l'estremità 5' del mRNA e da lì **scansiona sopra il 5'UTR verso il 3'** finché trova il codone d'inizio AUG

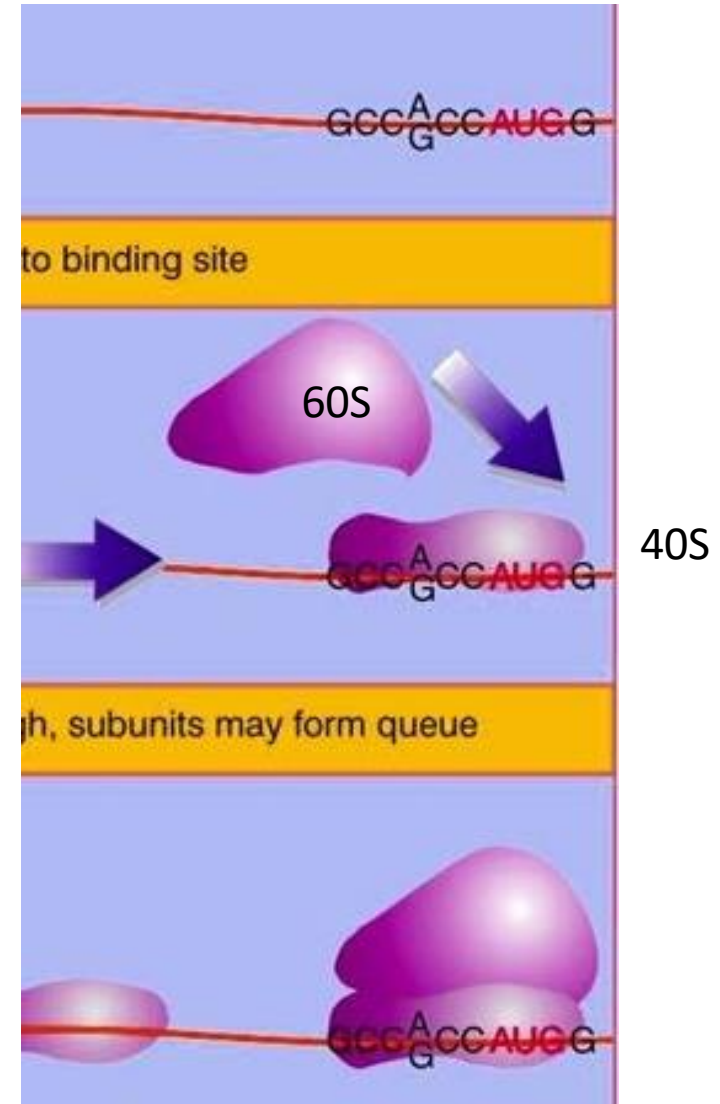
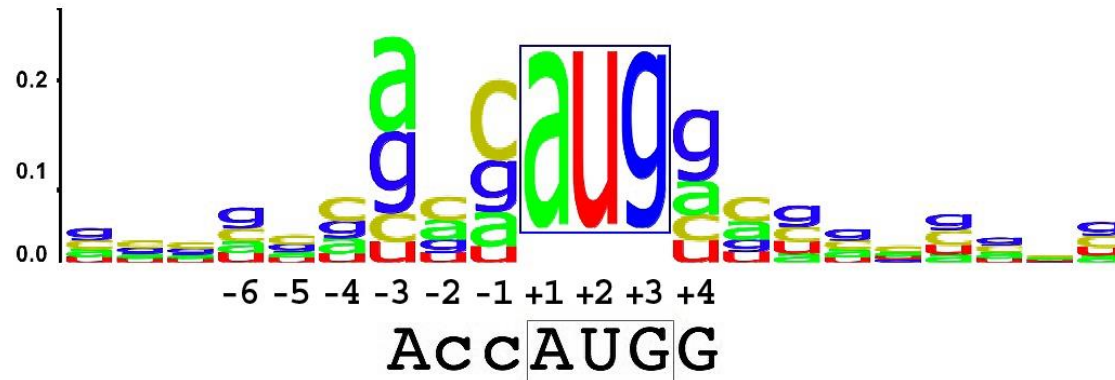


- Negli eucarioti intervengono molti fattori di inizio (**eIF: *eukaryotic Initiation Factor***), alcuni dei quali composti per numerose subunità raggiungendo 30 polipeptidi necessari per l'inizio della traduzione



Riconoscimento del codone di inizio AUG

- Negli eucarioti è stata identificata una sequenza consenso chiamata **Sequenza di Kozak** : **RNNAUGG** (R è una purina) che determina l'inizio della traduzione.

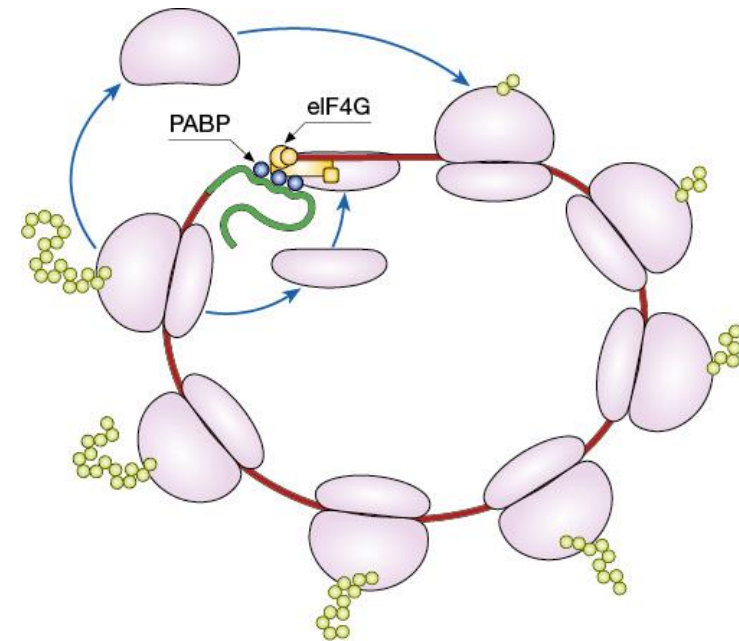
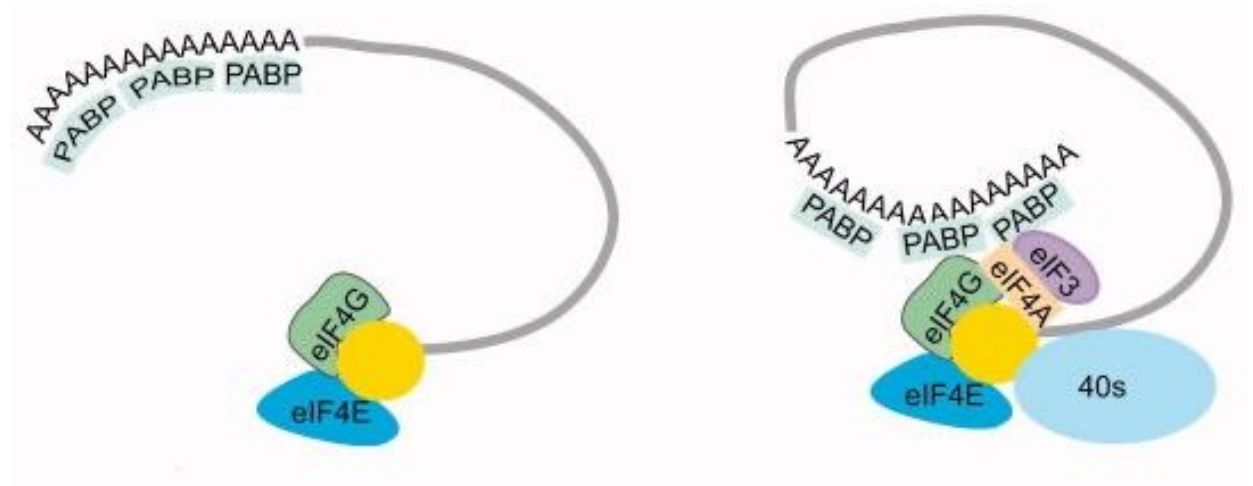


Eucarioti: Circularizzazione del mRNA

Durante l'inizio la **proteina PABP** (Poly(A)-binding protein) si associa in diverse copie alla **coda poliA alla estremità 3'** del mRNA.

PABP si lega al fattore eiF4G (parte del eiF4F) dello stesso mRNA assumendo una **configurazione circolare**.

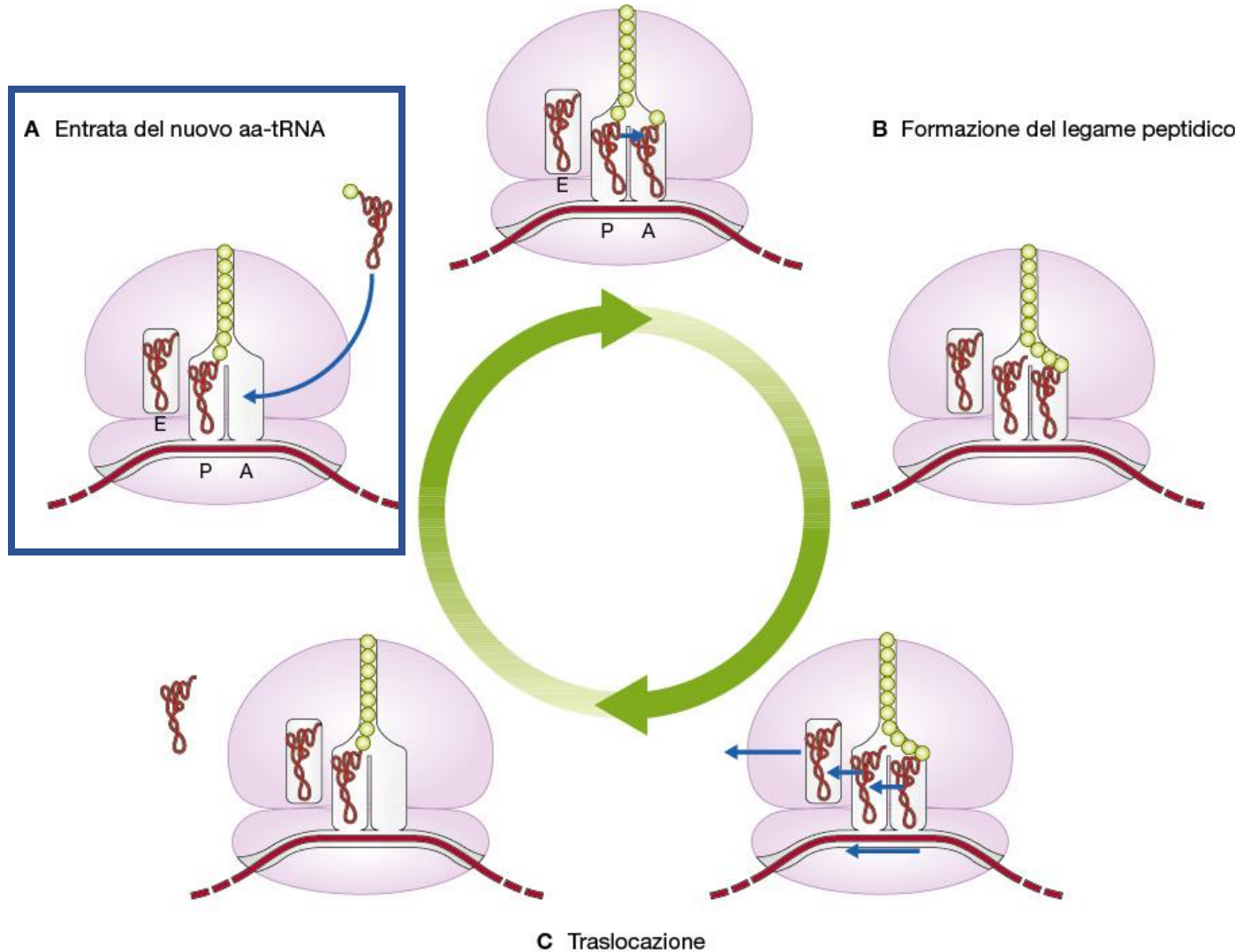
Questa conformazione permette che i ribosomi liberati nella estremità 3' possano re-assemblarsi immediatamente sulla 5' per re-iniziare la traduzione. Inoltre dà stabilità al mRNA e aumenta l'efficienza di traduzione.



Fase di ALLUNGAMENTO

Cicli di allungamento

(molto simile in procarioti ed eucarioti)



3 steps

1. **Entrata** nel **sito A** del ribosoma di un **tRNA carico**.
2. **Trasferimento** del primo aa della catena peptidica nascente **dal tRNA nel sito P** sul nuovo aa che si trova sul **sito A** formando un **legame peptidico**
3. **Traslocazione** di tutto l'insieme **dal sito A al sito P**, così che l'mRNA esponga il nuovo codone sul sito A.

Fattori proteici

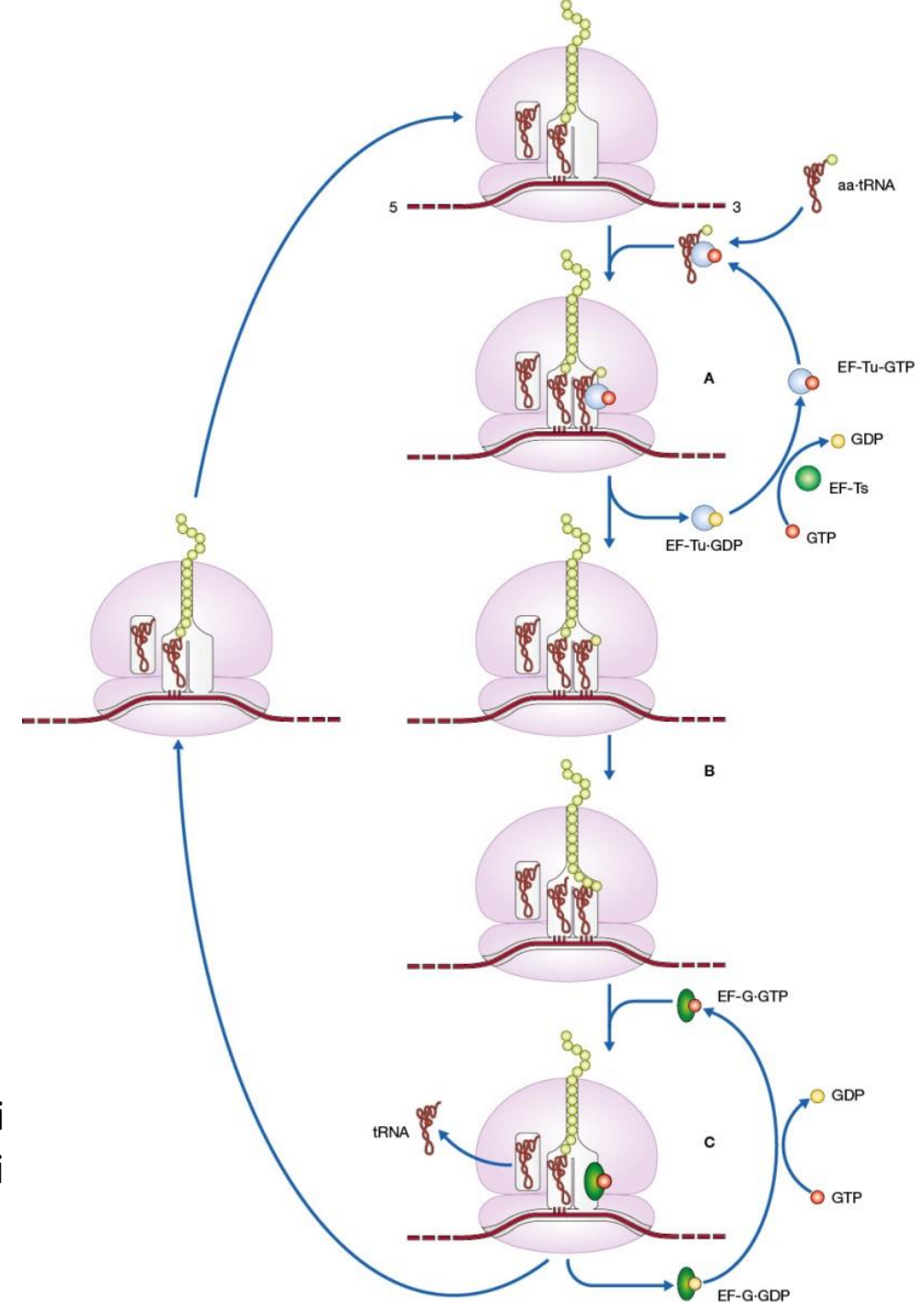
- Procarioti :

- *Elongation Factors (EF)*

- **EF-Tu:** Insieme al GTP lega un aa-tRNA e lo porta al sito A vuoto. Se l'appaiamento è corretto avviene l'idrolisi di GTP, formando il complesso **EF-Tu-GDP**
 - **EF-Ts:** Reattiva il complesso EF-Tu-GDP a EF-Tu-GTP
 - **EF-G:** Legato al GTP trasloca tutto l'insieme(peptidil-tRNA/mRNA) dal sito A al sito P.

- *GTP*

L'energia proveniente dal GTP serve a indurre i cambiamenti conformazionali e movimenti molecolari necessari per la traduzione



Fattori proteici

- Eucarioti

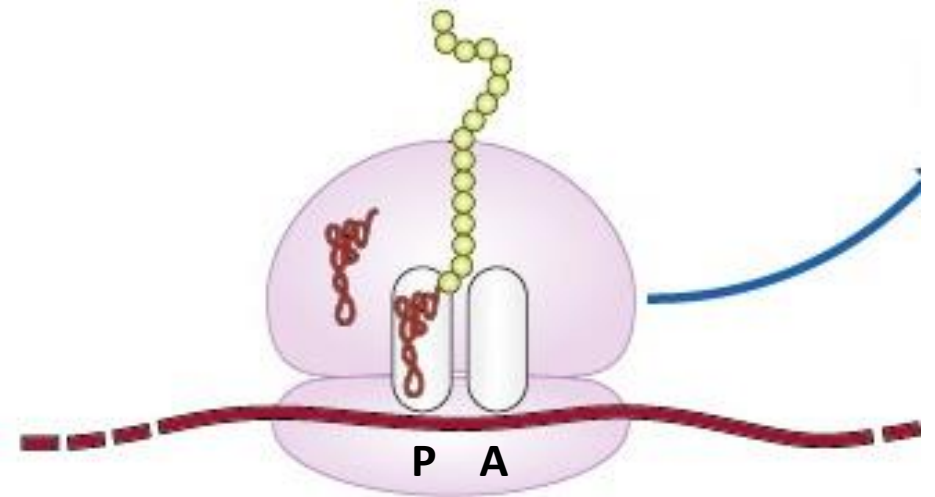
- *Eukaryotic Elongation Factors (eEF)*

- eEF1A: omologo di EF-Tu
- eEF1B: omologo di EF-Ts
- eEF2: omologo di EF-G

- *GTP*

L'energia proveniente dal GTP serve a indurre i cambiamenti conformazionali e movimenti molecolari necessari per la traduzione

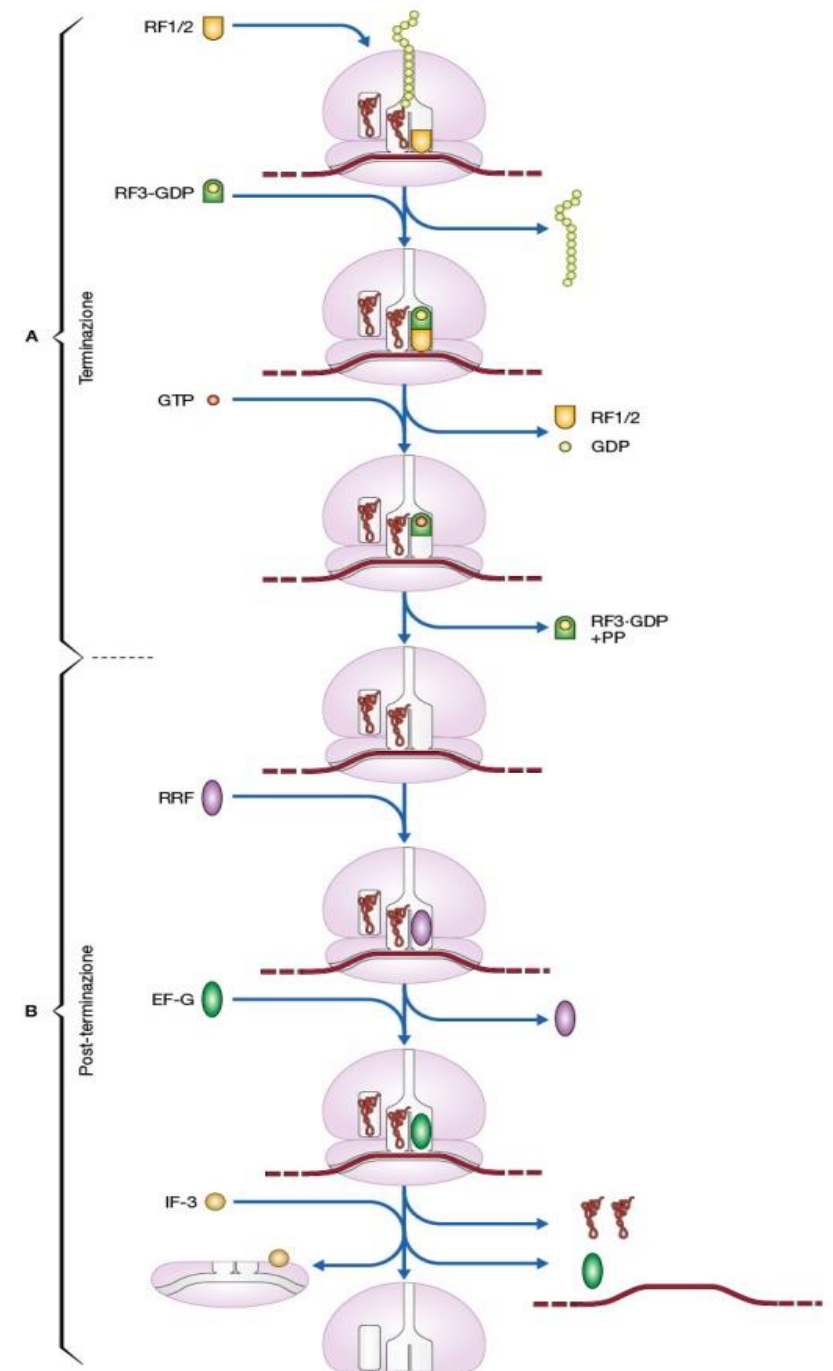
Negli eucarioti non sembra esserci il sito di uscita E per il tRNA scarico.



Fase di TERMINAZIONE

Terminazione

- I cicli di allungamento si ripetono finché un **codone di STOP** entra nel **sito A**. Non esistono anticodoni tRNA complementari ai codoni STOP e al suo posto sono riconosciuti dei **fattori proteici di terminazione RF** (*Release Factors*)
 - La terminazione avviene in **2 fasi**:
 1. **Rilascio** della catena peptidica dal ultimo tRNA
 2. **Dissociazione dei componenti**: mRNA, tRNA e ribosoma: Post-terminazione
1. Dopo l'entrata del codone di stop nel sito A il fattore **RF1** (riconosce **UAA** e **UAG**) o **RF2** (riconosce **UGA** e **UAA**) entra inducendo l'idrolisi del polipeptide dal tRNA. Poi, il fattore **RF3-GDP** entra e interagisce con RF1 o RF2. Lo scambio di **GTP** con **GDP** induce il **rilascio di RF1 (o2)** e dopo anche del **RF3-GDP**.
 2. Il **fattore RRF** (**Ribosome Recycling factor**) entra nel **sito A** disassemblando il complesso ribosoma, mRNA, tRNA dopo che è spazzato da **EF-G**. Anche il fattore **IF3** contribuisce impedendo l'interazione della 30S con la subunità 50S





That's all Folks!

FINE!!!!

