

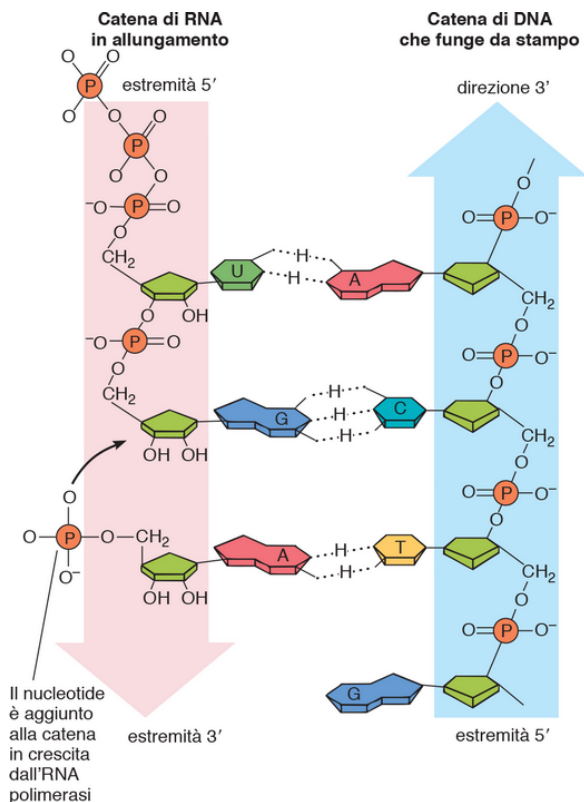


FIGURA 13-8 Una visione molecolare della trascrizione

I nucleosidi trifosfati entranti si appaiano per complementarità con le basi del filamento di DNA che funge da stampo (a destra). L'RNA polimerasi taglia due gruppi fosfato (non mostrato) da ciascun nucleotide e lega il gruppo fosfato rimasto all'estremità 3' della catena di RNA in allungamento mediante un legame covalente. Così l'RNA, come il DNA, viene sintetizzato in direzione $5' \rightarrow 3'$.

La sintesi dell'RNA messaggero include inizio, allungamento e terminazione

Sia nei procarioti che negli eucarioti, la sequenza di DNA alla quale l'RNA polimerasi, e le proteine ad essa associate, inizialmente si lega è definita promotore. Poiché il promotore non è trascritto, l'RNA polimerasi per iniziare la trascrizione della regione codificante per la proteina si deve spostare oltre il promotore. Geni differenti tra loro possono avere promotori leggermente diversi, permettendo così alla cellula di decidere quali geni in un determinato momento devono essere trascritti. Normalmente, i promotori batterici sono lunghi circa 40 basi e sono localizzati sul DNA appena a monte del punto di inizio della trascrizione. Quando la RNA polimerasi ha riconosciuto il corretto promotore, srotola la doppia elica ed **inizia** la trascrizione (FIG. 13-9). Al contrario della sintesi del DNA, la sintesi dell'RNA non richiede un primer. La reazione richiede però, oltre all'RNA polimerasi, alcune proteine che verranno

discusse nel Capitolo 14.

Come mostrato nella Figura 13-8, il primo nucleotide all'estremità 5' della molecola di mRNA in corso di sintesi trattiene il gruppo trifosfato, mentre nella fase di **allungamento** (FIG. 13-8) due fosfati vengono rimossi con una reazione esoergonica da ogni nucleotide successivamente incorporato all'estremità 3'; il fosfato rimasto entra a far parte dello scheletro zucchero-fosfato (come nella replicazione del DNA). L'ultimo nucleotide incorporato mostra un ossidrilico 3' libero.

L'allungamento dell'RNA prosegue fino a che l'RNA polimerasi riconosce un segnale di **terminazione**, che consiste in una serie di specifiche sequenze di basi sul DNA stampo. Questo segnale determina il distacco dell'enzima sia dal DNA stampo che dall'RNA neosintetizzato. La terminazione della trascrizione avviene con meccanismi diversi nei procarioti e negli eucarioti. Nei procarioti, la trascrizione termina alla fine della sequenza di terminazione. Quando la RNA polimerasi arriva su tale segnale, rilascia sia il DNA stampo che il nuovo filamento di RNA. Nelle cellule eucariotiche, l'RNA polimerasi aggiunge nucleotidi alla molecola di mRNA anche dopo aver oltrepassato il segnale di terminazione. Infatti l'estremità 3' dell'mRNA si separa dalla RNA polimerasi circa 10-35 nucleotidi a valle della sequenza di terminazione.

PUNTO CHIAVE L'mRNA è sintetizzato in direzione $5' \rightarrow 3'$ via via che il filamento stampo della molecola di DNA viene letto in direzione. $3' \rightarrow 5'$

FIGURA 13-9 Una visione d'insieme della trascrizione: inizio, allungamento e terminazione

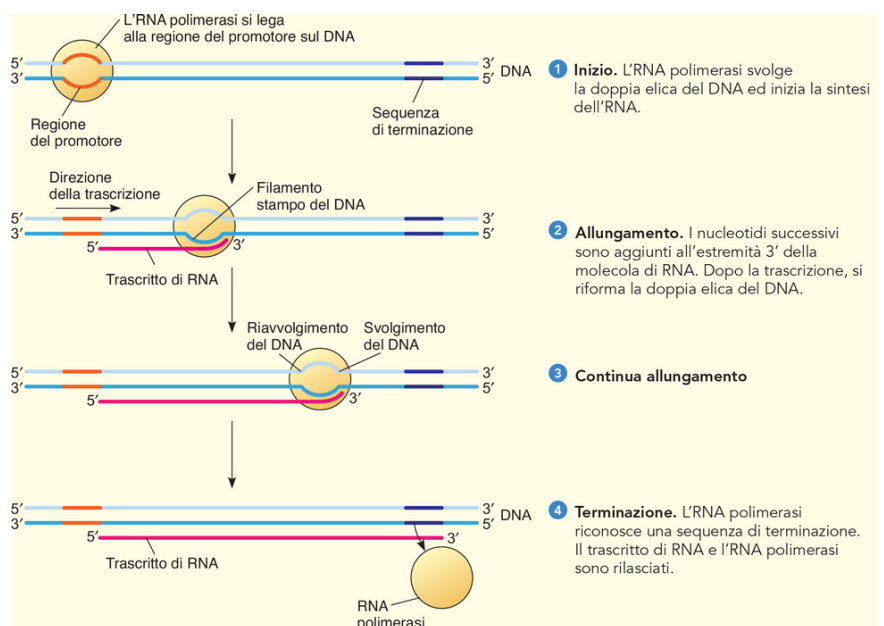
Solo uno dei due filamenti di una regione codificante del DNA viene trascritto. Ad esempio, consideriamo un segmento di DNA che contiene la seguente sequenza di basi nel filamento stampo:

3' — TAACGGTCT — 5'

Se il filamento complementare di DNA

5' — ATTGCCAGA — 3'

venisse trascritto, sarebbe prodotto un messaggio specificante per una proteina completamente diversa (e



in genere non funzionale). Tuttavia, il fatto che solo un filamento venga trascritto non significa che lo stesso filamento funga da stampo per tutta la lunghezza della molecola di DNA di un cromosoma. Un determinato filamento può fungere da filamento trascritto per alcuni geni e da filamento non trascritto per altri (FIG. 13-10).

L'RNA messaggero contiene sequenze di basi che non codificano direttamente la proteina

L'RNA messaggero completo contiene più sequenze nucleotidiche di quelle che codificano la proteina in questione. Un tipico mRNA batterico è mostrato in FIGURA 13-11 . (Le caratteristiche peculiari dell'mRNA e della trascrizione negli eucarioti sono discusse più avanti nel capitolo). Sia nei procarioti che negli eucarioti, l'RNA polimerasi inizia la trascrizione di un gene a monte della sequenza codificante. Come risultato, l'RNA messaggero possiede, alla sua estremità 5', una sequenza leader non codificante. Tale sequenza contiene segnali di riconoscimento per il legame con il ribosoma che consentono al ribosoma di posizionarsi correttamente per iniziare la traduzione del messaggio. La sequenza leader è seguita dal codone di inizio , che indica l'inizio della sequenza codificante che contiene gli effettivi messaggi per il polipeptide. A differenza delle cellule eucariotiche, nelle cellule batteriche uno o più polipeptidi possono essere codificati da una singola molecola di mRNA (vedi Capitolo 14). Alla fine di ciascuna sequenza codificante, vi è uno speciale codone di stop o di terminazione. I codoni di stop – UAA, UGA e UAG – sono presenti sia nei procarioti che negli eucarioti. Questi sono seguiti da sequenze non codificanti dette sequenze trailing al 3', che possono variare in lunghezza.

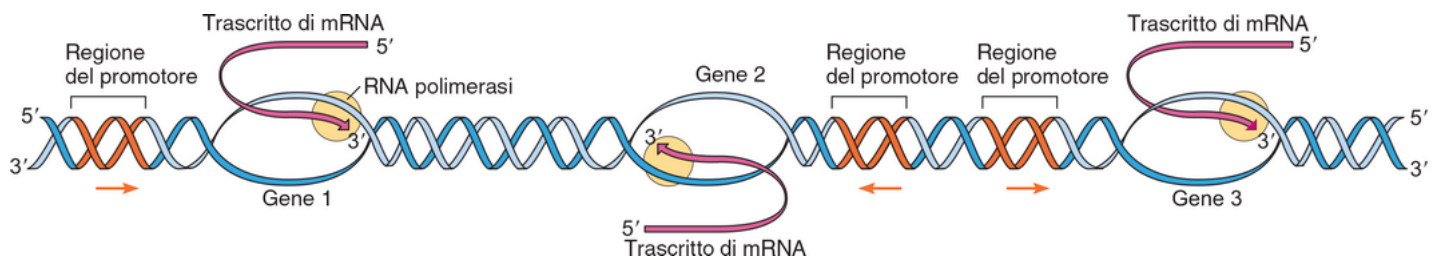


FIGURA 13-10

Il filamento stampo per un gene può essere il filamento non stampo per un altro gene

Solo uno dei due filamenti è trascritto per un dato gene, ma il filamento opposto può essere trascritto per un gene vicino. Ciascun trascritto inizia dal suo promotore (in arancione). La freccia arancione associata a ciascun promotore indica la direzione della trascrizione.

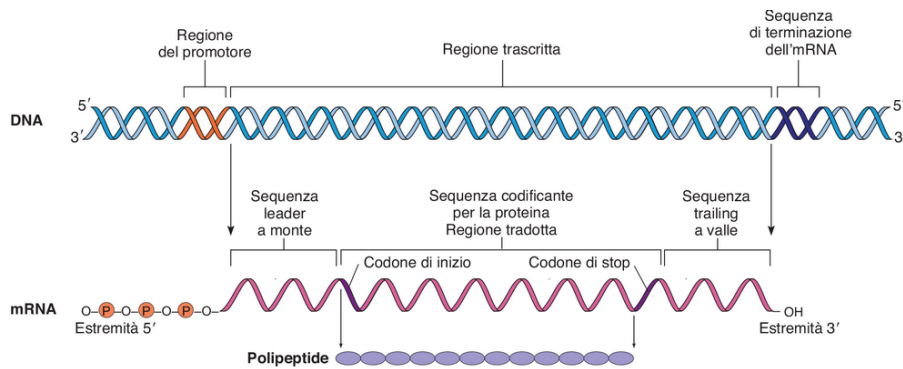
Gli mRNA eucariotici sono modificati dopo la trascrizione e prima della traduzione

Ci sono molte altre differenze tra l'mRNA eucariotico e procariotico. Gli mRNA batterici sono utilizzati immediatamente dopo la trascrizione senza ulteriori modificazioni. Negli eucarioti, invece, il trascritto originale, detto mRNA precursore o pre-mRNA , deve essere modificato mentre è ancora nel nucleo. Questa attività di **maturazione e modificazione post-trascrizionale** è necessaria per produrre un mRNA maturo idoneo ad essere trasportato nel citoplasma e tradotto.

Negli eucarioti il processo di modificazione del messaggio inizia durante la trascrizione, quando l'mRNA è lungo circa 20-30 nucleotidi. Innanzitutto, enzimi specifici aggiungono un cappuccio (5' cap) all'estremità 5' della catena di mRNA (FIG. 13-12). Il cap è costituito da un nucleotide insolito, la 7-metilguanosa, che è legato al trascritto di mRNA attraverso tre gruppi fosfato. I ribosomi eucariotici non possono legarsi ad un RNA messaggero privo del cappuccio.

Si ritiene che l'aggiunta del cap protegga l'mRNA dalla degradazione da parte di alcuni enzimi e che ciò possa essere parzialmente responsabile del fatto che gli mRNA eucariotici sono molto più stabili di quelli procariotici. Infatti, negli eucarioti, gli mRNA hanno una vita media che varia fra i 30 minuti e le 24 ore; in genere, la vita media di una molecola di mRNA in cellule di mammifero è di circa 10 ore, ben più lunga rispetto ai 2 minuti di quella in cellule batteriche.

Una seconda modifica al messaggero eucariotico, nota come poliadenilazione, si verifica all'estremità 3' della molecola (FIG. 13-12); vicino all'estremità 3' di ciascun RNA messaggero completo si trova una sequenza di basi che serve da segnale per l'aggiunta di una "coda" di molte adenine, nota col termine di coda di poli-A (**poliadenilata**). Entro un minuto dalla sintesi del trascritto, enzimi specifici riconoscono nel nucleo questo segnale di poliadenilazione e tagliano la molecola di mRNA nel sito corrispondente. A ciò segue l'aggiunta, grazie ad ulteriori enzimi, di un filamento di 100-250 nucleotidi di adenina all'estremità 3'. Sembra che la poliadenilazione abbia diverse funzioni: aiuta ad esportare l'mRNA dal nucleo, protegge alcuni mRNA dalla degradazione nel citoplasma (più lunga è la coda di poli-A, più a lungo la molecola resta nel citosol) e favorisce un efficiente inizio della traduzione aiutando i ribosomi a riconoscere l'mRNA



di inizio, che segue la sequenza leader, e finisce con un codone di terminazione vicino al 3' della molecola. Sequenze "trailing" a valle, che variano in lunghezza, seguono le sequenze che codificano per la proteina.

PUNTO CHIAVE Negli eucarioti, dopo la trascrizione, il pre-mRNA subisce estese modificazioni per produrre l'mRNA maturo funzionale.

FIGURA 13-12
Modificazioni post-trascrizionali dell'RNA messaggero eucariotico

Dai geni eucariotici vengono trascritte sequenze non codificanti e codificanti

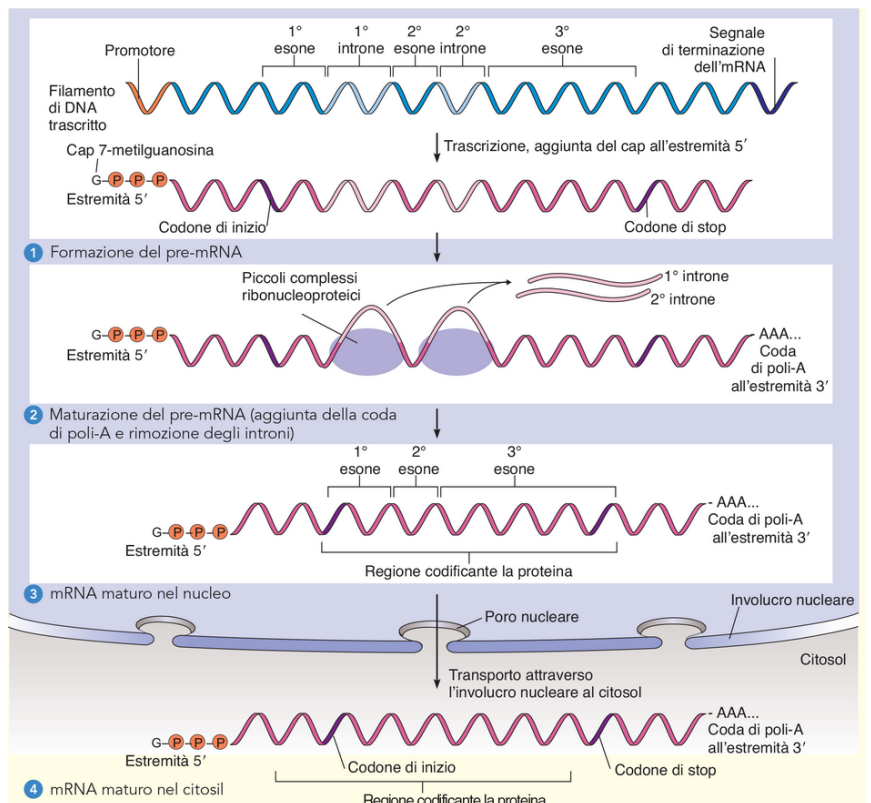
Una delle maggiori sorprese nella storia della biologia molecolare è stata la scoperta che la maggior parte dei geni eucariotici ha sequenze codificanti interrotte. In altre parole, troviamo lunghe sequenze di basi all'interno delle regioni codificanti del gene, che non codificano per aminoacidi della proteina finale. Tali regioni non codificanti all'interno del gene sono chiamate introni (sequenze in terposte), per contrapporle agli esoni (sequenze es presse) che sono parti della sequenza codificante la proteina.

Un gene eucariotico tipico può avere molti esoni ed introni, anche se il numero è abbastanza variabile. Il gene della β -globina umana, per esempio, che dà origine ad un componente dell'emoglobina, contiene 2 introni e 3 esoni; il gene dell'albumina umana contiene 14 introni e 15 esoni; il gene della titina umana, la più grande proteina conosciuta, presente nelle cellule muscolari, contiene 233 introni e 234 esoni. In molti casi, la lunghezza di tutti gli introni insieme è maggiore di quella delle sequenze degli esoni; il gene dell'ovoalbumina, per esempio, contiene circa 7700 paia di basi, mentre le sequenze degli esoni, riunite insieme, sono lunghe solamente 1859 paia di basi. Quando un gene contenente introni è trascritto, l'intero gene viene copiato in una lunga molecola di RNA chiamata mRNA precursore o pre-mRNA, che contiene sia gli esoni che gli introni. (Nota che i termini esoni e introni si riferiscono alle sequenze di nucleotidi corrispondenti sia nel DNA che nell'RNA). Perché il pre-mRNA diventi un RNA messaggero funzionale, è necessario non solo che venga munito del cappuccio e della coda di poli-A, ma anche che siano rimossi gli introni e chesiano uniti insieme gli esoni (splicing) per formare un messaggio continuo che codifica la proteina.

Lo splicing può avvenire con modalità differse, a seconda del tipo di RNA. In molti casi, esso prevede l'associazione di piccoli complessi di ribonucleoproteine nucleari (snRNP, si pronuncia "snurp") a formare una grossa particella ribonucleoproteica detta spliceosoma. Lo spliceosoma, le cui dimensioni sono simili a quelle dei ribosomi, catalizza le reazioni che portano alla rimozione degli introni dal pre-mRNA. In altri casi, l'RNA all'interno dell'introne si comporta come un ribozima (RNA catalitico), tagliando se stesso senza l'intervento di uno spliceosoma o di enzimi proteici. Le modificazioni post-trascrizionali negli eucarioti possono essere riassunte come segue:

pre-mRNA contenente introni ed esoni $\rightarrow$ inserimento di un cappuccio all'estremità 5' del pre-mRNA $\rightarrow$ aggiunta di una coda di poli-A all'estremità 3' $\rightarrow$ rimozione degli introni e unione degli esoni (splicing) $\rightarrow$ mRNA maturo trasportato nel citosol

FIGURA 13-11 L'mRNA batterico
La figura confronta un mRNA batterico con la regione del DNA da cui è stato trascritto. L'RNA polimerasi riconosce, ma non trascrive, le sequenze che sul DNA costituiscono il promotore. L'inizio della sintesi dell'RNA avviene 5-8 basi a valle del promotore. I siti di riconoscimento del ribosoma sono situati sulla sequenza leader al 5' dell'mRNA. La sequenza che codifica per la proteina comincia con il codone



In seguito alla maturazione del pre-mRNA, l'mRNA maturo è trasportato attraverso un poro nucleare nel citosol per essere tradotto dai ribosomi.

Verifica

- Quali sono le analogie tra DNA polimerasi ed RNA polimerasi? E le differenze?
- Un dato filamento di DNA stampo possiede la seguente sequenza nucleotidica: 3'—TACTGCATAATGATT—5'
- Qual è la sequenza di codoni nell'mRNA trascritto da tale filamento? Qual è la sequenza nucleotidica del filamento complementare di DNA non trascritto?

13.4 LA TRADUZIONE

OBIETTIVO DI APPRENDIMENTO

8. Identificare le caratteristiche dei tRNA importanti per decodificare l'informazione genetica e convertirla nel "linguaggio delle proteine".
9. Spiegare il funzionamento dei ribosomi nella sintesi dei polipepti.
10. Schematizzare i processi di inizio, allungamento e terminazione nella sintesi polipeptidica.

La traduzione rappresenta un ulteriore livello di complessità nel processo di trasferimento dell'informazione genetica, perché comporta la conversione del codice a quattro basi azotate dell'acido nucleico nell'alfabeto a 20 aminoacidi dei polipeptidi. La traduzione implica il lavoro coordinato di più di 100 diversi tipi di macromolecole, quali le proteine e gli RNA dei ribosomi, l'mRNA e gli aminoacidi legati ai tRNA.

Le proteine sono costituite da aminoacidi legati insieme da **legami peptidici** (la formazione del legame peptidico è illustrata in Fig. 3-18); questo legame avviene tra il gruppo amminico e il gruppo carbossilico di due aminoacidi adiacenti. La formazione del legame peptidico è soltanto un aspetto del processo di traduzione, poiché gli aminoacidi devono essere legati insieme nella corretta successione stabilita dalla sequenza dei codoni presenti nell'mRNA.

Un aminoacido deve essere legato al suo specifico tRNA prima di essere incorporato in un polipeptide

Come è possibile allineare gli aminoacidi nella corretta sequenza per poterli poi unire? Francis Crick si accorse del problema e suggerì la necessità dell'intervento di una molecola che fungesse da "adattatore" nella sintesi proteica e quindi da ponte tra l'mRNA e la proteina. Gli adattatori di Crick risultarono essere le molecole di RNA transfer (tRNA). Il DNA contiene particolari geni per gli RNA transfer che, una volta trascritti, danno origine ai tRNA. Ciascun tipo di molecola di tRNA si lega ad uno specifico aminoacido. Particolari enzimi, chiamati aminoacil-tRNA sintetasi, legano, con un legame covalente, gli aminoacidi alle rispettive molecole di tRNA utilizzando l'ATP come fonte di energia (FIG. 13-13). I complessi che ne risultano, chiamati aminoacil-tRNA, sono in grado di legarsi alle sequenze codificanti dell'RNA messaggero così da allineare gli aminoacidi nel giusto ordine e formare la catena polipeptidica.

I tRNA sono catene polinucleotidiche di circa 70-80 nucleotidi. Ciascuno di essi possiede un certo numero di sequenze di basi uniche, insieme a sequenze comuni a tutti. Sebbene le molecole di tRNA siano notevolmente più piccole dell'mRNA o dell'RNA ribosomiale, presentano una struttura molto complessa. Ogni molecola di tRNA deve avere diverse proprietà specifiche: (1) deve possedere un anticodone, cioè una specifica sequenza che possa legarsi al codone complementare presente sull'mRNA; (2) deve essere riconosciuta da una specifica aminoacil-tRNA sintetasi che leghi il corretto aminoacido; (3) deve possedere una regione che funga da sito di attacco per l'aminoacido specificato dall'anticodone (il sito è ruotato di 180° rispetto all'anticodone); (4) deve essere riconosciuta dai ribosomi.

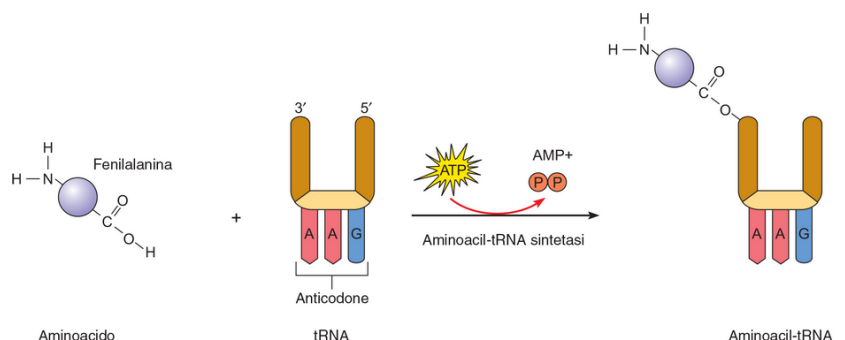


FIGURA 13-13 *Legame di uno specifico aminoacido al tRNA appropriato*
Gli aminoacidi sono legati covalentemente alle loro rispettive molecole di tRNA dalle aminoacil-tRNA sintetasi, che utilizzano ATP come fonte di energia.

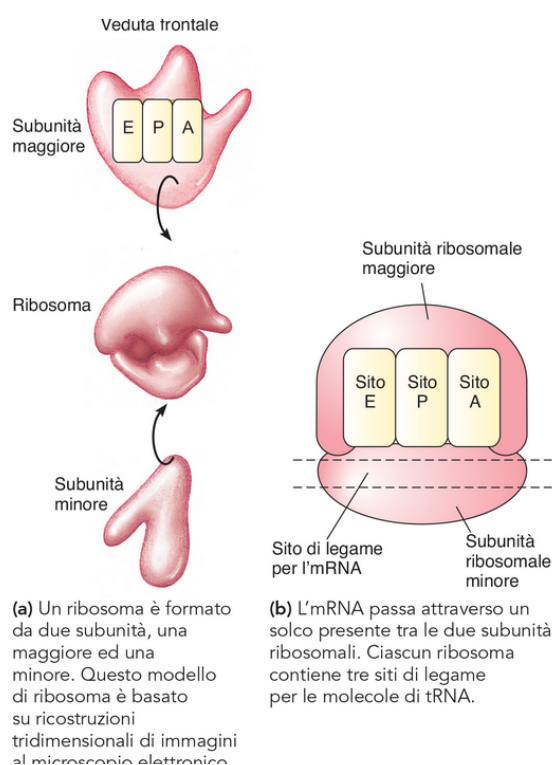
All'interno di ciascuna molecola di tRNA, l'appaiamento fra basi complementari causa la formazione di tratti a doppio filamento con formazione di tre o più anse di nucleotidi non appaiati, una delle quali contiene la tripletta dell'anticodone. Il sito di legame con l'aminoacido è all'estremità 3' della molecola. Il gruppo carbossilico dell'aminoacido si lega covalentemente al gruppo ossidrilico presente in posizione 3' del nucleotide terminale, lasciando il gruppo amminico libero di partecipare alla formazione di un legame peptidico. Il modo di ripiegarsi del filamento comporta che la distanza tra l'anticodone e l'aminoacido in tutti i tRNA esaminati sia costante, portando ad un preciso posizionamento degli aminoacidi durante la traduzione.

I ribosomi mettono in contatto tra loro tutti i componenti dell'apparato di traduzione

L'importanza dei ribosomi e della sintesi proteica nel metabolismo cellulare è ben evidente in una cellula di *E. coli* a rapido accrescimento, la quale contiene circa 15.000 ribosomi, equivalenti ad un terzo della massa totale della cellula. Sebbene i ribosomi non siano identici nei procarioti e negli eucarioti, essi funzionano essenzialmente allo stesso modo e sono costituiti da due subunità composte da proteine (circa il 40% in peso) ed RNA ribosomale (circa 60% in peso). diversamente da mRNA e tRNA, l'rRNA non trasferisce informazioni specifiche, ma ha funzioni catalitiche. Al contrario, le proteine ribosomali non sembrano mostrare attività catalitica, ma contribuiscono alla strutturazione complessiva del ribosoma.

Ciascuna subunità ribosomale può essere isolata integra in laboratorio e successivamente separata nei suoi costituenti: proteine ed RNA. Per esempio, si è trovato che nei batteri la subunità minore contiene 21 proteine ed una molecola di RNA ribosomale, mentre la subunità maggiore contiene 34 proteine e due molecole di RNA ribosomale. In certe condizioni sperimentali, è poi possibile riassemblare le singole subunità nella loro forma funzionale aggiungendo ogni componente nel corretto ordine. In questo modo, e con sofisticati studi di microscopia elettronica, è stato possibile determinare la struttura tridimensionale del ribosoma (FIG. 13-14a) e come esso si assembli nella cellula. La subunità maggiore contiene una depressione sulla sua superficie sulla quale si adatta la subunità minore. Le molecole di RNA messaggero si inseriscono in una scanalatura che si forma fra le superfici di contatto delle due subunità.

Il ribosoma presenta quattro siti di legame, uno per l'mRNA e tre per i tRNA. Così, la struttura del ribosoma permette di mantenere nel corretto orientamento non solo lo stampo di mRNA, ma anche le molecole di aminoacil-tRNA e la catena polipeptidica in corso di sintesi. In questo modo, il codice genetico può essere letto correttamente, permettendo la formazione del successivo legame peptidico. Le molecole di RNA di trasferimento si attaccano a tre depressioni presenti sul ribosoma: i siti di legame A, P ed E (FIG. 13-14b). Il sito P , o sito peptidilico, è così chiamato perché è occupato dal tRNA che porta la catena polipeptidica crescente. Il sito A è detto anche sito aminoacilico perché ad esso si lega l'aminoacil-tRNA che porta l'aminoacido successivo da inserire nella sequenza. Il sito E , o sito di uscita, è il punto in cui i tRNA che hanno fornito i loro aminoacidi alla catena polipeptidica in crescita lasciano il ribosoma.



← FIGURA 13-14 *Struttura del ribosoma*

La traduzione comincia con la formazione di un complesso di inizio

Il processo di sintesi proteica presenta tre fasi distinte: inizio, cicli ripetuti di allungamento e terminazione. L'inizio della sintesi proteica è essenzialmente uguale in tutti gli organismi.

Descriveremo prima il processo di inizio nei procarioti e poi discuteremo brevemente alcune differenze tra il processo procariotico e quello eucariotico.

L'inizio della traduzione richiede l'intervento di proteine chiamate fattori di inizio, che si attaccano alla subunità ribosomale minore. Nei procarioti, tre diversi fattori di inizio si attaccano alla subunità minore, che in seguito lega la molecola di mRNA in corrispondenza della regione del codone di inizio AUG (FIG. 13-15). Una sequenza leader a monte (verso l'estremità 5') dell'AUG aiuta il ribosoma ad identificare la sequenza AUG che indica l'inizio della regione codificante dell'mRNA.

Il tRNA che porta il primo aminoacido del polipeptide è il tRNA iniziatore, che lega l'aminoacido metionina; di conseguenza, il primo aminoacido di una nuova catena polipeptidica è la metionina. (Abbastanza spesso, la metionina viene in seguito

Negli eucarioti, l'inizio della traduzione differisce per tre aspetti. Primo, la metionina legata al tRNA iniziatore non è modificata. Secondo, il codone di inizio sull'mRNA non viene identificato grazie ad una sequenza leader, ma esso si trova all'interno di una breve sequenza (del tipo ACC AUG G) che indica il sito di inizio della traduzione (la tripletta AUG sottolineata). Terzo, il complesso di inizio negli eucarioti, che contiene presumibilmente dieci fattori proteici, è più complesso di quello procariotico.

La fase di inizio nei batteri coinvolge un ribosoma, un mRNA, un tRNA iniziatore, a cui è legata una formilmetionina (fMet), e diversi fattori di inizio proteici.

The diagram illustrates the three steps of translation initiation in a eukaryotic cell, showing the assembly of the initiation complex on an mRNA strand.

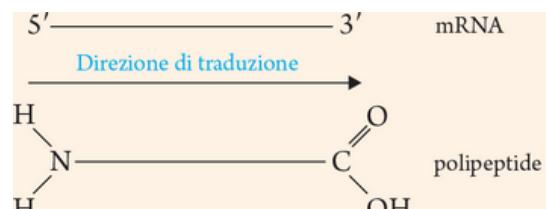
1 La subunità ribosomale minore si lega all'mRNA in corrispondenza del codone di inizio AUG. La sequenza leader a monte dell'AUG aiuta il ribosoma ad identificare la sequenza AUG.

2 Il tRNA iniziatore si lega al codone di inizio, ed uno dei fattori di inizio viene rilasciato.

3 Quando la subunità ribosomale maggiore si lega alla subunità minore e i rimanenti fattori di inizio sono rilasciati, il complesso di inizio è completo.

La FIGURA 13-16 mostra i quattro passaggi di un ciclo di allungamento, ossia la fase della traduzione in cui gli aminoacidi sono aggiunti uno ad uno al polipeptide in crescita. L'allungamento è essenzialmente uguale nei procarioti e negli eucarioti. L'aminoacil- tRNA specifico riconosce il codone nel sito A e vi si lega tramite uno specifico appaiamento di basi tra il suo anticodone e il codone complementare sull'mRNA. La fase di legame richiede diverse proteine chiamate fattori di allungamento. È richiesta anche energia, che in questo caso è fornita dalla guanosina trifosfato (GTP), una molecola di trasferimento dell'energia simile all'ATP.

Si ricordi dal Capitolo 3 che le catene polipeptidiche hanno una precisa polarità; l'aminoacido ad una estremità del polipeptide ha il gruppo amminico libero (estremità amminica) e l'aminoacido all'altra estremità presenta il gruppo carbossilico libero (estremità carbossilica). La sintesi proteica procede sempre dall'estremità amminica all'estremità carbossilica della catena polipeptidica in crescita:



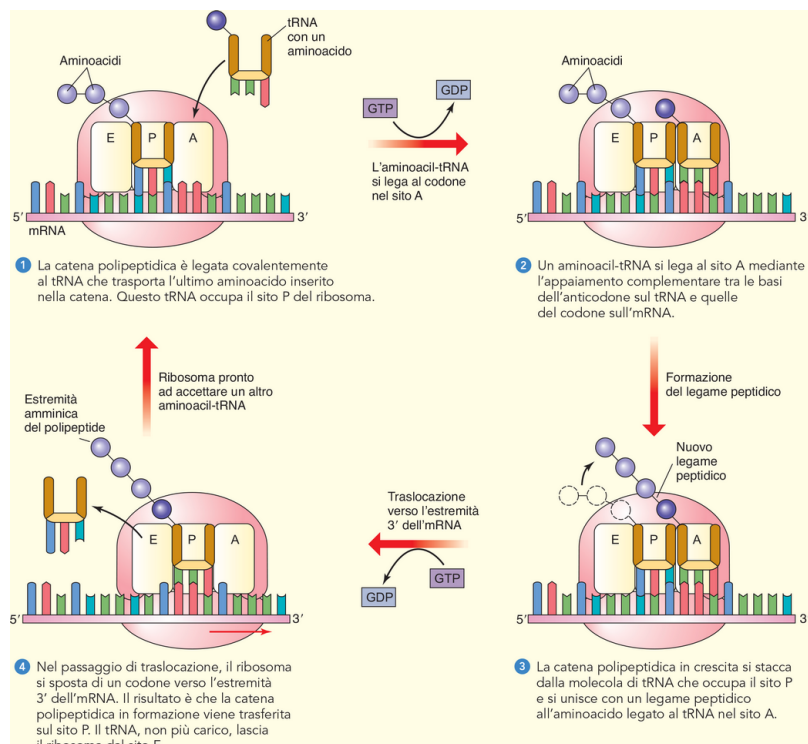
PUNTO CHIAVE Ad ogni ripetizione del ciclo di allungamento viene aggiunto un aminoacido alla catena polipeptidica in crescita.

FIGURA 13-16

Un ciclo di allungamento nella traduzione
Il processo illustrato in figura inizia dopo che si è già formata una corta catena di aminoacidi.

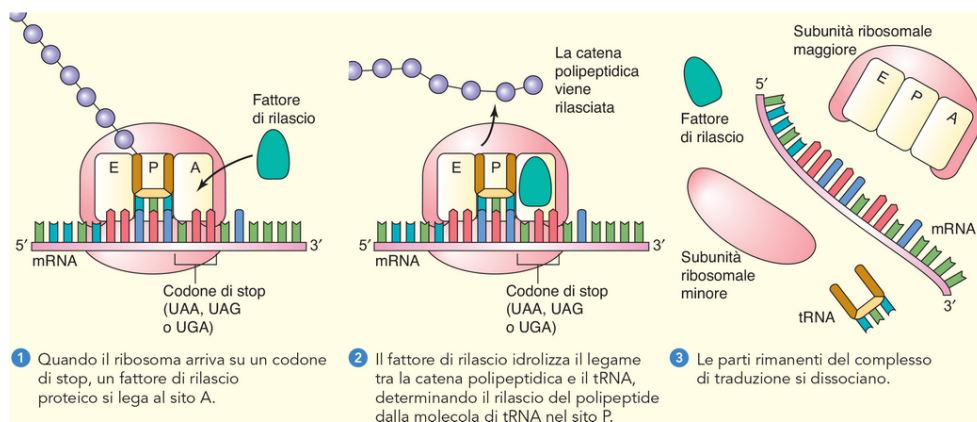
Nella fase di allungamento, nota anche come traslocazione, il ribosoma scorre sull'mRNA avanzando di un singolo codone. Di conseguenza, il codone dell'mRNA che specifica per l'aminoacido successivo si trova posizionato nel sito A, non più occupato in seguito all'avanzamento del ribosoma. Il processo di traslocazione richiede energia, che è di nuovo fornita dal GTP. Il tRNA non carico, ovvero il tRNA privo dell'aminoacido, si sposta dal sito P al sito E; da qui lascia il ribosoma ed entra a far parte del pool citosolico dei tRNA.

Poiché la traslocazione comporta il movimento del ribosoma lungo la molecola di mRNA in direzione 3', la traduzione procede sempre in direzione 5' → 3'. La formazione di ciascun legame peptidico richiede solamente una frazione di secondo; quindi, attraverso cicli di allungamento ripetuti, una proteina della lunghezza media di circa 360 aminoacidi è sintetizzata in 18 secondi in un batterio e in poco più di un minuto in una cellula eucariotica.



Uno dei tre codoni di stop segnala la terminazione della traduzione

Nella terminazione, la fase finale della traduzione, la sintesi della catena polipeptidica è terminata da un fattore di rilascio, una proteina che riconosce il codone di stop alla fine della sequenza codificante. (Nessuna molecola di tRNA si lega ad un codone di stop, cosicché esso è disponibile per il legame con il fattore di rilascio). Quando il sito A si lega al fattore di rilascio, il legame tra il tRNA nel sito P e l'ultimo aminoacido della catena polipeptidica si rompe (FIG. 13-17). Questa reazione di idrolisi libera il polipeptide neosintetizzato ed inoltre separa i componenti del complesso di traduzione: la molecola di mRNA, il fattore di rilascio, la molecola di tRNA presente nel sito P e le subunità ribosomali maggiore e minore. Le due subunità ribosomali possono essere utilizzate per costituire un nuovo complesso di inizio con un'altra molecola di mRNA. Ogni mRNA è tradotto un numero limitato di volte prima di essere distrutto.



PUNTO CHIAVE Un segnale di stop determina la terminazione della sintesi del polipeptide, poiché non esiste alcuna molecola di tRNA con un anticodone complementare ad un codone di stop.

FIGURA 13-17
La terminazione della traduzione

Proteine specializzate associate ai ribosomi, dette chaperoni molecolari, assistono le catene polipeptidiche appena sintetizzate nel processo di ripiegamento nella loro conformazione tridimensionale attiva (vedi Capitolo 3). La conformazione finale della catena polipeptidica è dettata dalla sua sequenza aminoacidica. Tuttavia, senza l'aiuto degli chaperoni molecolari, le interazioni tra le varie regioni della catena aminoacidica potrebbero impedire la realizzazione del corretto processo di ripiegamento.

Verifica

- Da cosa sono costituiti i ribosomi? I ribosomi portano l'informazione per specificare la sequenza aminoacidica delle proteine?
- Come descrivereste le fasi di inizio, di allungamento e di terminazione della sintesi proteica?
- Un dato filamento di mRNA presenta la seguente sequenza nucleotidica: 5'-AUG-ACG-UAA-AAC-UUU-3'
- Qual è l'anticodone per ciascun codone? Qual è la sequenza aminoacidica del polipeptide? (Servitevi della Fig. 13-5 per rispondere alla domanda).

13.5 LE VARIAZIONI DELL'ESPRESSIONE GENICA

OBIETTIVO DI APPRENDIMENTO

11. Descrivere un poliribosoma nella cellula batterica
12. Illustrare brevemente cosa si intende per "RNA interference".
13. Descrivere i retrovirus e l'enzima trascrittasi inversa.

Anche se i meccanismi di base della trascrizione e della traduzione sono simili in tutti gli organismi, esistono alcune differenze significative tra i procarioti e gli eucarioti (FIG. 13-18). Alcune di queste sono la conseguenza di differenze nella struttura delle cellule. Mentre gli mRNA batterici sono tradotti appena trascritti dal DNA (in quanto i batteri sono privi di nucleo), lo stesso non vale per gli RNA eucariotici. Infatti, i cromosomi eucariotici sono confinati nel nucleo della cellula e la sintesi proteica avviene nel citosol, quindi l'mRNA deve essere trasportato attraverso l'involucro nucleare nel citoplasma prima di poter essere tradotto.

La trascrizione e la traduzione sono accoppiate nei procarioti

In *E. coli* e in altri batteri, la traduzione inizia subito dopo la trascrizione ed allo stesso mRNA si attaccano diversi ribosomi (FIG. 13-19). L'estremità della molecola di mRNA che viene sintetizzata per prima durante la trascrizione è anche la prima ad essere tradotta in proteina. I ribosomi possono legarsi all'estremità 5' di un mRNA in fase di sintesi e iniziare la traduzione molto prima che il messaggio sia completato. Fino a 15 ribosomi possono essere legati a una singola molecola di mRNA. Le molecole di RNA messaggero legate ad aggregati di ribosomi sono definite poliribosomi o **polisomi**. Ci possono essere poliribosomi anche nelle cellule eucariotiche, ma non mentre la trascrizione è ancora in corso.

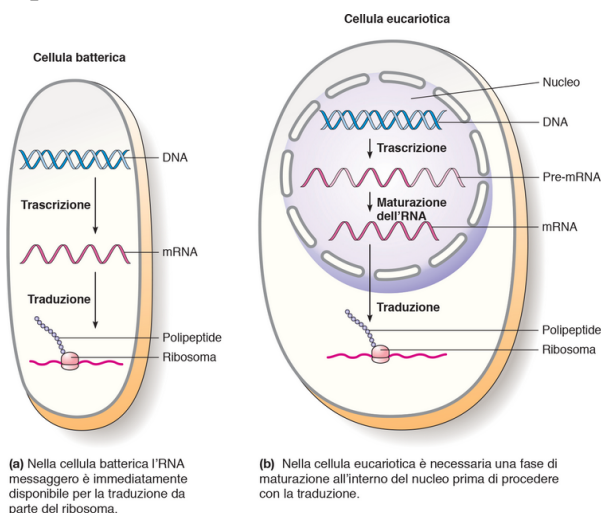


FIGURA 13-18

Il flusso dell'informazione genetica nei procarioti e negli eucarioti

Anche se un discreto numero di catene polipeptidiche può essere attivamente sintetizzato da un singolo RNA messaggero, la vita media (cioè il tempo necessario affinché sia degradata circa la metà delle molecole) delle molecole di mRNA nelle cellule batteriche è solamente di due minuti. Di norma, la degradazione della molecola di mRNA inizia all'estremità 5' prima che sia completata la sintesi del primo polipeptide. Una volta che le sequenze per il riconoscimento del ribosoma sono degradate, nessun altro ribosoma può attaccarsi all'mRNA per iniziare una nuova sintesi proteica.

L'evoluzione della struttura dei geni eucariotici è dibattuta

La ragione della complessità strutturale dei geni eucariotici è materia di acceso dibattito tra i biologi molecolari. Per quale motivo nella maggior parte dei geni nucleari degli eucarioti si trovano gli introni, mentre essi non sono presenti nei geni dei procarioti, dei mitocondri e dei cloroplasti? Come si è evoluto questo importante meccanismo genetico che comporta l'esistenza di sequenze codificanti interrotte ("split genes")? Per quale motivo, infine, è sopravvissuto? Sembra incredibile che il 75% del trascritto originale di un gene nucleare eucariotico debba essere **rimosso** per dare origine ad un messaggio operativo.

Nei primi anni '80 Walter Gilbert, dell'Università di Harvard, ipotizzò che gli esoni fossero sequenze nucleotidiche codificanti differenti domini proteici, regioni di struttura terziaria di una proteina che possono avere specifiche funzioni. Ad esempio, il sito attivo di un enzima può comprendere un dominio, mentre un altro dominio può permettere all'enzima di legarsi ad una particolare struttura cellulare, ed un

altro dominio ancora può essere un sito implicato nella regolazione allosterica (vedi Capitolo 7). L'analisi delle sequenze del DNA dei geni eucariotici e quella delle sequenze degli aminoacidi delle proteine corrispondenti ha messo in evidenza che molti esoni sono troppo corti per codificare un intero dominio proteico; tuttavia, un insieme di esoni può codificare un dominio.

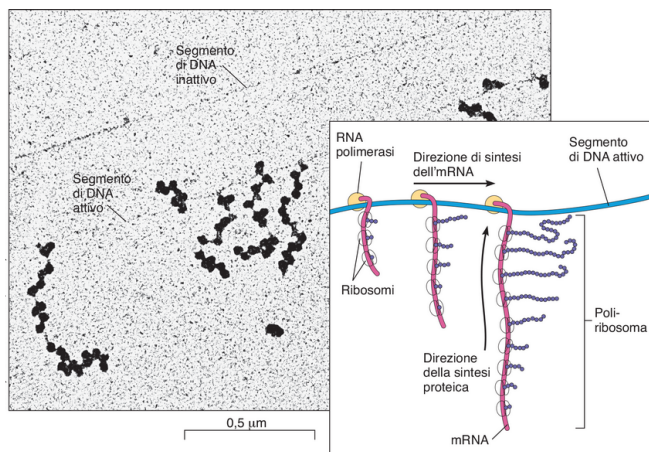
Gilbert ipotizzò, inoltre, che nuove proteine con differenti funzioni potessero comparire rapidamente allorquando, attraverso la ricombinazione genetica, si venivano a produrre nuove combinazioni di esoni. Questa ipotesi è nota come evoluzione per rimescolamento degli esoni (*evolution by exon shuffling*). Per esempio, il recettore proteico delle lipoproteine a bassa densità (LDL), una proteina che si trova sulla superficie delle cellule umane e che permette il trasporto del colesterolo dentro le cellule (vedi Capitolo 5), possiede un certo numero di domini che sono paragonabili a quelli di molte altre proteine aventi funzioni totalmente differenti. Però, molti altri geni e le proteine corrispondenti non presentano il fenomeno del rimescolamento degli esoni.

In seguito alla scoperta degli introni in alcuni geni di archeobatteri e batteri, alcuni biologi hanno ipotizzato che gli introni siano vestigia dell'antico antenato di tutti gli organismi attuali. Nel corso di miliardi di anni di evoluzione, gli organismi procariotici, che sono unicellulari, sarebbero stati sottoposti ad una pressione selettiva volta allo snellimento dei loro gruppi di geni, che avrebbe portato alla perdita della maggior parte dei loro introni.

Indipendentemente da come abbiano avuto origine i geni interrotti, l'escissione degli introni costituisce una delle numerose vie attraverso le quali gli eucarioti attuali controllano l'espressione dei loro geni (vedi Capitolo 14). Questa opportunità di controllo, insieme alla maggiore stabilità degli RNA degli eucarioti rispetto a quelli dei procarioti, può bilanciare il costo energetico del mantenimento di una grande quantità di DNA non codificante.

Vari tipi di RNA eucariotici hanno un ruolo nell'espressione genica

Oltre ad mRNA, rRNA e tRNA, le cellule eucariotiche contengono vari altri tipi di RNA, che costituiscono una parte essenziale del macchinario di sintesi proteica (TABELLA 13-1). Piccoli RNA nucleari (snRNA) si legano a specifiche proteine per formare un complesso di piccole ribonucleoproteine nucleari (snRNP), che a sua volta si combina con altre snRNP per formare uno spliceosoma. Si ricordi dal paragrafo precedente che lo spliceosoma catalizza la rimozione degli introni.



(a) Fotografia al microscopio elettronico a trasmissione di due filamenti di DNA di *E. coli*, uno inattivo e l'altro in fase di attiva trascrizione. La sintesi proteica comincia prima che sia completata la sintesi dell'mRNA.

(b) Una sequenza (da sinistra a destra) di trascrizione e traduzione accoppiate. Si noti che ogni molecola di mRNA è tradotta contemporaneamente da diversi ribosomi.

FIGURA 13-19

Trascrizione e traduzione accoppiate nei batteri

Alcuni polipeptidi entrano nel reticolo endoplasmatico (RE) nel corso della loro sintesi. Un RNA della particella di riconoscimento del segnale (SRP RNA), in combinazione con alcune proteine, dirige il complesso ribosoma-mRNA-polipeptide al RE rugoso poco dopo l'inizio della traduzione. La traduzione continua in seguito al legame del complesso ad una proteina integrale della membrana del RE, e la proteina neosintetizzata è quindi indirizzata verso la sua destinazione all'interno della cellula o all'esterno (ad esempio, in forma di secreto).

Uno speciale gruppo di molecole di RNA, note come piccoli RNA nucleolari (snoRNA), processa le molecole di pre-

rRNA all'interno del nucleolo durante la formazione delle subunità ribosomali. I piccoli RNA nucleolari si legano a regioni complementari presenti sul pre-rRNA ed individuano siti di taglio o di metilazione. Una molecola di pre-rRNA è più grande dell'insieme delle tre molecole di rRNA da essa prodotte. Nelle cellule di mammifero, circa il 48% della molecola di pre-rRNA è rimossa durante le fasi di taglio. Alle regioni del pre-rRNA che devono essere preservate nel corso della maturazione potrebbero essere aggiunti dei gruppi metilici.

La scoperta che l'RNA ha la capacità di regolare l'espressione genica ha portato grosse novità nel campo della biologia, sia perché tale fenomeno, noto come RNA interference (RNAi), è stato riscontrato in numerosi organismi, sia perché rappresenta uno strumento medico e di ricerca con grandi potenzialità (vedi Capitoli 15 e 17). Nell'RNAi, alcune piccole molecole di RNA interferiscono con l'espressione dei geni o con i loro trascritti. L'RNA interference coinvolge i piccoli RNA interferenti (siRNA), i microRNA ed alcuni altri tipi di corte sequenze di RNA. I piccoli RNA interferenti (siRNA) sono molecole a doppio

filamento della lunghezza di 20-25 nucleotidi che giocano un ruolo importante nel controllo del danno derivato da trasposoni (illustrati più avanti nel capitolo) e da infezioni virali; essi inoltre regolano l'espressione genica di sequenze codificanti proteine.

TABELLA 13-1 Alcuni tipi di RNA presenti nelle cellule eucariotiche

Tipo di RNA	Funzione
RNA messaggero (mRNA)	Specifica la sequenza aminoacidica di una proteina
RNA transfer (tRNA)	Si lega ad uno specifico aminoacido e funge da adattatore molecolare quando gli aminoacidi vengono incorporati nella catena polipeptidica in crescita
RNA ribosomale (rRNA)	Ha un ruolo sia strutturale che catalitico (ribozima) nel ribosoma
Piccolo RNA nucleare (snRNA)	È coinvolto nella rimozione degli introni e nella regolazione della trascrizione; fa parte delle particelle che compongono lo spliceosoma
RNA della particella di riconoscimento del segnale (SRP RNA)	Aiuta a dirigere il complesso ribosoma-mRNA-poliptide verso il RE rugoso poco dopo l'inizio della traduzione
Piccolo RNA nucleolare (snoRNA)	Processa il pre-rRNA nel nucleolo durante la formazione delle subunità ribosomali
Piccolo RNA interferente (siRNA)	Controlla l'espressione genica mediante la soppressione selettiva dei geni
MicroRNA (miRNA)	Controlla l'espressione dei geni coinvolti nella crescita e nello sviluppo attraverso l'inibizione della traduzione di determinati mRNA

I microRNA (miRNA) sono molecole di RNA a singolo filamento lunghe circa 20-25 nucleotidi che inibiscono la traduzione di mRNA coinvolti nella crescita e nello sviluppo (FIG. 13-20). I microRNA sono trascritti da geni e poi accorciati, prima della loro combinazione con proteine per formare un complesso che inibisce l'espressione delle molecole di mRNA. Nel genoma umano sono stati identificati più di 200 diversi geni per miRNA, ma non si conoscono ancora i meccanismi attraverso i quali essi sarebbero in grado di regolare l'espressione genica mediante

degradazione dell'mRNA o inibizione della traduzione. I biologi ritengono che i miRNA possano giocare un ruolo fondamentale nella prevenzione del cancro: cellule neoplastiche presentano infatti livelli di miRNA inferiori rispetto a cellule sane. Alterazioni nella funzione dei miRNA sono state inoltre ipotizzate in patologie cardiache e nel Parkinson.

La definizione di gene si è evoluta con l'acquisizione di sempre maggiori conoscenze sui geni

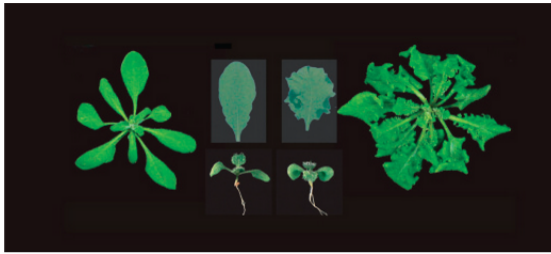
All'inizio di questo capitolo, abbiamo visto le ipotesi e le prove sperimentali che hanno portato a comprendere la natura del gene. Per un po' di tempo, è stato utile definire il gene come una "sequenza di nucleotidi che codifica una catena polipeptidica". Tuttavia, col procedere delle ricerche sul genoma umano, i biologi hanno chiarito che solo circa il 2% del nostro genoma codifica per polipeptidi nonostante l'80% di esso sia in grado di dare prodotti di espressione; numerosi sono infatti i geni la cui trascrizione porta alla produzione di vari tipi di molecole di RNA (vedi Tabella 13-1). Ulteriori studi hanno inoltre dimostrato che nelle cellule eucariotiche un singolo gene può essere in grado di produrre più di una catena polipeptidica attraverso processi diversi di maturazione del messaggio (vedi Capitolo 14).

Forse è quindi più utile definire un gene in base al suo prodotto. Un gene può essere definito come una sequenza di nucleotidi che porta l'informazione necessaria per produrre uno specifico RNA o un polipeptide.

Eccezioni alla normale direzione del flusso di informazione

Per molti decenni uno dei presupposti fondamentali della biologia molecolare è stato che l'informazione genetica si trasferisce dal DNA all'RNA e infine alle proteine. Un'importante eccezione a tale regola fu scoperta dal biologo statunitense Howard Temin nel 1964 studiando alcuni virus. Sebbene i virus non siano cellule, essi contengono un solo tipo di acido nucleico e sono in grado di riprodursi all'interno di una cellula ospite. Temin stava studiando alcuni virus oncogeni che possedevano come materiale genetico l'RNA, anziché il DNA. Egli scoprì che la possibilità, da parte di questi virus, di infettare la cellula ospite veniva impedita da inibitori sia della replicazione del DNA che della trascrizione. Ciò suggerì che le sintesi del DNA e dell'RNA fossero indispensabili per la replicazione di questi virus oncogeni a RNA e che doveva esistere un sistema per far passare l'informazione genetica in senso "inverso", cioè dall'RNA al DNA.

Temin propose che, nella replicazione del genoma a RNA di un virus oncogeno, si producesse come intermedio un provirus a DNA . Tale ipotesi richiedeva però la presenza di un nuovo tipo di enzima in grado di sintetizzare DNA utilizzando, come stampo, una molecola di RNA. Nel 1970, Temin e David Baltimore provarono l'esistenza di un enzima con queste caratteristiche e, nel 1975, proprio grazie a questa scoperta, furono insigniti del premio Nobel per la Medicina. Questa DNA polimerasi RNA-dipendente, che divenne nota come trascrittasi inversa , fu ritrovata in tutti i virus oncogeni a RNA (alcuni virus non oncogeni a RNA, tuttavia, si riproducono senza utilizzare un intermedio a DNA). I passaggi della riproduzione di un virus oncogeno a RNA sono presentati in FIGURA 13-21 . A causa dell'inversione del normale flusso dell'informazione genetica, i virus che richiedono la trascrittasi inversa sono noti come retrovirus . Il virus HIV-1, che causa l'AIDS, è il retrovirus più noto. Come vedremo nel Capitolo 15, la trascrittasi inversa è diventata per i biologi molecolari uno strumento di ricerca molto importante.



Javier F. Palatnik and Detlef Weigel

FIGURA 13-20

Gli effetti di una molecola di miRNA sulla crescita di una pianta

Un esemplare di *Arabidopsis* normale (veduta dall'alto, foglia e veduta laterale della plantula) è mostrato a sinistra e funge da controllo. I biologi hanno modificato una molecola di miRNA nella pianta mostrata a destra; il risultato è che essa presenta gravi anomalie di sviluppo, dimostrate dalle foglie raggrinzite.

Verifica

- Che cosa è la RNA interference?
- Che cos'è un gene?
- In che modo i retrovirus utilizzano l'enzima trascrittasi inversa?

13.6 LE MUTAZIONI

OBIETTIVO DI APPRENDIMENTO

14. Fornire esempi dei differenti tipi di mutazioni che colpiscono la sequenza delle basi del DNA e spiegare gli effetti che ciascuna mutazione può avere sulla proteina prodotta.

Una delle più importanti scoperte sui geni è stata quella che ha rivelato che possono andare incontro a cambiamenti detti mutazioni . È oggi noto che le mutazioni sono causate da cambiamenti nella sequenza nucleotidica del DNA. Tuttavia, la frequenza con cui il DNA è danneggiato è molto più bassa rispetto al numero totale delle mutazioni che avvengono in una cellula, in quanto tutti gli organismi hanno speciali sistemi enzimatici che sono in grado di riparare certi tipi di alterazioni del DNA.

Una volta che la sequenza del DNA è mutata e non sottoposta a correzione, con il processo della replicazione le sequenze alterate vengono copiate come quelle normali, consentendo alla mutazione di fissarsi nelle generazioni successive. Nella maggior parte dei casi, l'allele mutato non acquisisce maggiore tendenza a mutare nuovamente rispetto a quello originale.

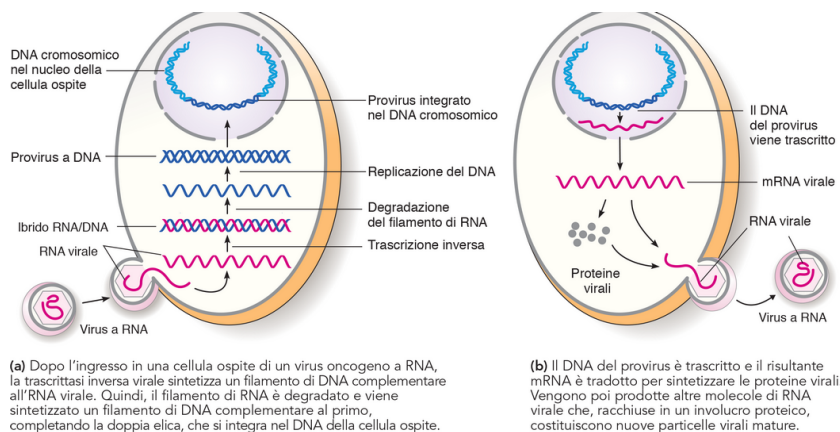


FIGURA 13-21

Il ciclo di infezione di un virus oncogeno ad RNA

Sebbene quasi tutte le mutazioni non corrette siano *silenti* (prive di effetti rilevabili) o dannose (come quelle che causano malattie ereditarie e cancro), alcune risultano utili. Dal momento che possono essere trasmesse alle generazioni cellulari successive e di conseguenza talvolta anche alle linee cellulari germinali che danno origine ai gameti, le mutazioni

sono di importanza vitale nell'evoluzione. Le mutazioni forniscono la variabilità tra gli individui su cui agiscono le forze evolutive. Inoltre, le mutazioni sono molto utili nella ricerca (si ricordi il lavoro di Beadle e Tatum), in quanto forniscono la diversità del materiale genetico che ci permette di studiare sia l'ereditarietà sia gli aspetti molecolari dei geni.

I ricercatori sono oggi in grado di determinare dove avvengono le specifiche mutazioni in un gene, isolando il gene stesso e determinandone la sequenza mediante l'utilizzo delle metodiche del DNA ricombinante (vedi Capitolo 15).

Le mutazioni per sostituzione di base originano dal cambiamento di una singola coppia di basi in un'altra

Le mutazioni possono modificare i geni in modi diversi. La mutazione più semplice è la mutazione per sostituzione di base , perché comporta la modificazione di una singola coppia di nucleotidi. Spesso, queste mutazioni derivano da errori nell'appaiamento delle basi durante il processo di replicazione, quando per esempio la coppia AT può essere sostituita da GC, CG o TA. Una simile mutazione può portare un DNA

alterato ad essere trascritto in un mRNA modificato, che a sua volta sarà tradotto in una catena polipeptidica con un aminoacido diverso rispetto alla sequenza normale.

Le mutazioni silenti sono sostituzioni nucleotidiche che non portano ad una conseguenza funzionale, come nel caso di una mutazione in un gene codificante una proteina che non comporta variazioni nella sequenza aminoacidica della catena polipeptidica (FIG. 13-22a , b). Le mutazioni che provocano la sostituzione di un aminoacido con un altro sono definite mutazioni di senso (o missenso o missense mutation) (FIG. 13-22c). La sostituzione di un aminoacido all'interno di una catena polipeptidica può avere un vasto numero di effetti; infatti, se la sostituzione di un aminoacido avviene all'interno o in prossimità di un sito attivo di un enzima, l'attività della proteina alterata può risultare minore oppure essere addirittura assente. Se una mutazione missenso provoca un cambiamento a carico di un aminoacido che non fa parte del sito attivo di un enzima oppure comporta la sostituzione di un aminoacido con un altro con caratteristiche chimiche del tutto simili, la mutazione può risultare irrilevante a livello funzionale e, talvolta, non rilevabile a livello strumentale. Poiché le mutazioni silenti sono relativamente frequenti, il reale numero di mutazioni all'interno di un organismo o di una specie è maggiore di quello che si riesce ad osservare.

Le mutazioni non senso (nonsense mutation) sono mutazioni puntiformi che possono modificare un codone che normalmente codifica un aminoacido trasformandolo in un codone di terminazione (FIG. 13-22d). Una mutazione non senso generalmente provoca l'alterazione della funzione del prodotto di quel gene; nel caso di un gene che codifichi una proteina, la porzione della catena polipeptidica a valle del codone di terminazione viene persa.

Le mutazioni frameshift originano dall'inserzione o dalla delezione di coppie di basi

Nelle mutazioni “frameshift” (anche dette mutazioni per slittamento), una o due coppie di nucleotidi sono inseriti o eliminati (deleti) all'interno della molecola del DNA, causando un'alterazione della griglia di lettura (“reading frame”). Come risultato di questo scivolamento, i codoni a valle dell'inserzione o della delezione specificheranno una sequenza di aminoacidi completamente nuova. A seconda della posizione in cui avviene l'inserzione o la delezione, si possono avere effetti diversi. Spesso una mutazione frameshift dà origine ad un codone di stop a breve distanza dal punto in cui è avvenuta la mutazione (FIG. 13-22e), così da terminare precocemente la catena polipeptidica. Altre volte si origina un prodotto genico aberrante, costituito da una nuova catena polipeptidica avente alterata sequenza aminoacidica immediatamente a valle della mutazione (FIG. 13-22f). Lo spostamento della griglia di lettura in un gene che specifica un enzima ha quasi sempre come conseguenza la perdita dell'attività biologica dell'enzima stesso.

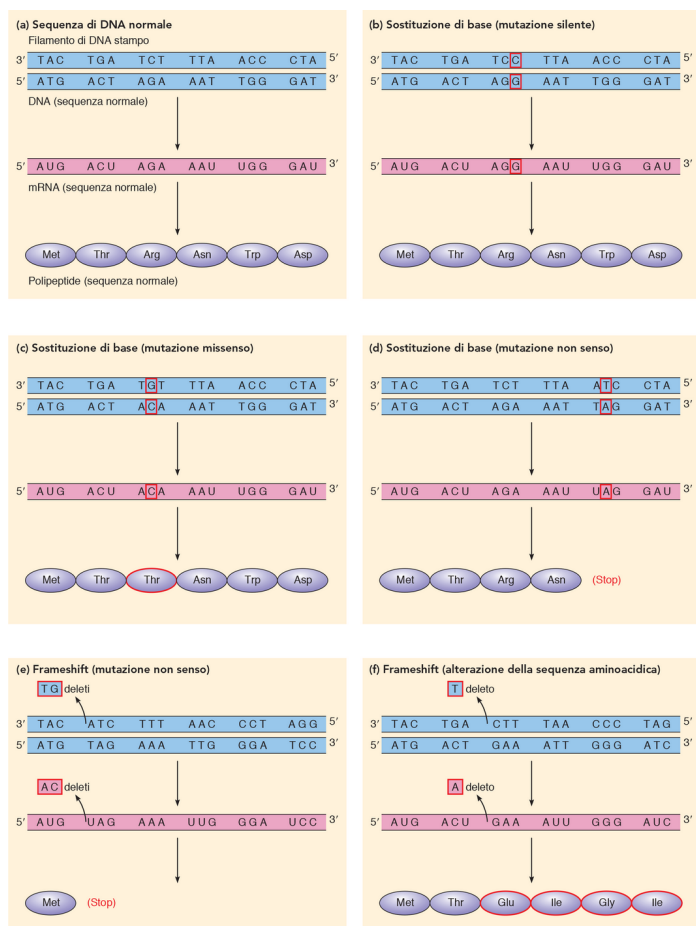


FIGURA 13-22 *Tipi di mutazioni*

Confrontare la sequenza normale del DNA (parte a) con le sequenze mutate (illustrate nelle parti dab ed e).

Alcune mutazioni coinvolgono segmenti mobili di DNA

Alcuni tipi di mutazioni sono causate da sequenze di DNA che “saltano” all'interno di un gene. Questi elementi mobili di DNA non solo alterano la funzione di alcuni geni, ma in alcune condizioni sono anche in grado di attivare geni altrimenti inattivi. Gli elementi genetici mobili, anche noti come elementi trasponibili o trasposoni, sono stati scoperti attorno al 1950 nel granoturco dalla genetista americana Barbara McClintock (FIG. 13-23). Ella osservò che alcuni geni sembravano “accendersi” o “spegnersi” spontaneamente, e ne dedusse che il meccanismo coinvolgeva un segmento di DNA in grado di spostarsi da una regione cromosomica ad un'altra, attivando o inattivando i geni vicini. A riconoscimento delle sorprendenti scoperte, nel 1983 Barbara McClintock ricevette il premio Nobel per la Fisiologia e la Medicina.

Fu solamente con lo sviluppo della tecnologia del DNA ricombinante e con la scoperta dei trasposoni in una varietà di organismi che il fenomeno iniziò ad essere compreso. Ora sappiamo che i trasposoni sono

segmenti di DNA lunghi da centinaia a migliaia di coppie di basi. Nell'uomo quasi metà del genoma è costituito da trasposoni.

Sono stati identificati diversi tipi di elementi genetici mobili. Alcuni, detti trasposoni a DNA, spostano materiale genetico da un sito ad un altro con un meccanismo "taglia e incolla". I trasposoni a DNA sono comuni nei batteri e negli animali, incluso l'uomo.

Molti elementi mobili sono retrotrasposoni, i quali si replicano mediante la formazione di un intermedio a RNA. La trascrittasi inversa li converte nella loro sequenza di DNA di origine, prima che si spostino all'interno di un gene. Molti retrotrasposoni utilizzano il macchinario di espressione genica della cellula ospite per produrre la trascrittasi inversa. Dal momento che i retrotrasposoni utilizzano la trascrittasi inversa, si ipotizza che alcuni di essi si siano evoluti dai retrovirus, o viceversa. Gli scienziati stimano che le cellule umane contengano poco meno di 100 retrotrasposoni mobili. Nondimeno, i retrotrasposoni sono una causa di mutazione estremamente importante, aumentando l'abilità dell'organismo ad evolvere. Si stima, infatti, che essi causino circa il 10% delle mutazioni spontanee che determinano cambiamenti fenotipici evidenti.

Le mutazioni hanno cause diverse

La maggior parte delle mutazioni sono poco frequenti ed avvengono spontaneamente come conseguenza di errori nella replicazione del DNA oppure per difetti nella segregazione dei cromosomi durante la mitosi o la meiosi. Alcune regioni del DNA, dette *punti caldi*, sono soggette a mutazioni più di altre. A volte possono essere brevi sequenze di nucleotidi ripetuti che fanno sì che la DNA polimerasi "scivoli" mentre legge lo stampo nel corso della replicazione.

Mutazioni in certi geni possono aumentare il tasso di mutazione totale. Per esempio, una mutazione in un gene che codifica per la DNA polimerasi potrebbe rendere meno preciso il meccanismo di replicazione o la mutazione in un gene che codifica per un enzima di riparazione potrebbe far sì che siano più le mutazioni che rimangono di quelle che sono riparate.

Non tutte le mutazioni avvengono spontaneamente; molte fra quelle sopra descritte possono essere causate anche da agenti noti come mutageni, fra cui i raggi X, i raggi gamma, i raggi cosmici, i raggi ultravioletti e agenti chimici. Alcuni mutageni chimici reagiscono con specifiche basi del DNA modificandole, con conseguenti errori nell'appaiamento delle basi durante la replicazione. Altri mutageni causano inserzioni o delezioni di nucleotidi all'interno della molecola del DNA e cambiano la normale griglia di lettura durante la replicazione.

Malgrado l'esistenza di enzimi che le riparano, alcune nuove mutazioni permangono. Molto probabilmente ciascuno di noi possiede qualche allele mutato che non è presente nei propri genitori; sebbene alcune di queste mutazioni possano produrre un fenotipo alterato, la maggior parte di esse passa inosservata perché recessiva.



FIGURA 13-23 *Trasposoni nel granoturco*

Le striature presenti nei chicchi sono causate da trasposoni che si sono mossi all'interno del genoma sopprimendo la produzione di pigmento in alcune cellule. Il numero di divisioni cellulari che avvengono durante lo sviluppo del chicco, successivamente all'entrata in azione del trasposone, determina quanto pigmento viene prodotto. Alcuni chicchi sono infatti incolore (non pigmentati) in quanto la soppressione genica è avvenuta molto precocemente nel corso dello sviluppo.

Le mutazioni che avvengono nelle cellule somatiche non vengono trasmesse ai discendenti; tuttavia, esse sono di grande interesse, in quanto esiste una stretta correlazione tra mutazioni somatiche e cancro. Molti mutageni sono anche carcinogeni, cioè agenti responsabili dell'insorgenza del cancro.

Verifica

- Quali sono i principali tipi di mutazioni?
- Quali sono gli effetti di ciascun tipo di mutazione sulla proteina prodotta?

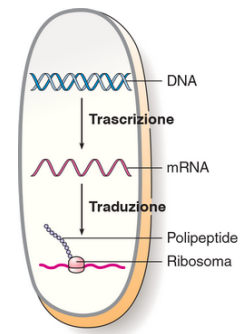
SOMMARIO: CONCENTRARSI SUGLI OBIETTIVI DI APPRENDIMENTO

13.1

1. Riassumere le prove iniziali che la maggior parte dei geni specifica la struttura delle proteine.
 - Il lavoro di Garrod sugli errori congeniti del metabolismo ha fornito dimostrazioni che i geni specificano le proteine. Garrod studiava una rara malattia genetica detta alcaptonuria. Egli ipotizzò che gli individui affetti da alcaptonuria fossero privi dell'enzima che normalmente ossida l'acido omogentisico. L'ipotesi di Garrod si rivelò corretta: una mutazione in tale gene è associata all'assenza di uno specifico enzima.
2. Descrivere gli esperimenti di Beadle e Tatum su *Neurospora*.
 - Beadle e Tatum cercavano mutazioni che interferissero con le reazioni metaboliche che portano alla produzione di molecole essenziali nella muffa *Neurospora*. Essi esposero spore di *Neurospora* ai raggi X o alle radiazioni ultraviolette per indurre la formazione di ceppi mutanti; quindi, identificarono ceppi che portavano una mutazione che impediva alla muffa di produrre un composto chimico essenziale per la crescita. Il loro lavoro rivelò che ogni ceppo mutante portava una mutazione in un solo gene e che ogni gene influenzava un solo enzima.

13.2

3. Descrivere il flusso dell'informazione genetica nelle cellule, dal DNA all'RNA ai polipeptidi.
 - Il processo attraverso il quale l'informazione codificata nel DNA specifica le sequenze di aminoacidi nelle proteine comprende due passaggi: la trascrizione e la traduzione.
 - Durante la trascrizione, viene sintetizzata una molecola di RNA complementare al filamento di DNA che funge da stampo. Le molecole di RNA messaggero (mRNA) contengono le informazioni che stabiliscono la corretta sequenza degli aminoacidi nelle catene polipeptidiche.
 - Con la traduzione, avviene la sintesi della catena polipeptidica specificata dall'mRNA. Ciascuna tripletta (sequenza di tre basi) nell'mRNA costituisce un codone, che codifica per uno specifico aminoacido nella catena polipeptidica, oppure per un segnale di inizio o di terminazione. La traduzione richiede i tRNA ed un apparato cellulare che comprende i ribosomi.
4. Confrontare le strutture del DNA e dell'RNA.
 - L'RNA è costituito da subunità nucleotidiche, ciascuna delle quali contiene lo zucchero ribosio, una base azotata (uracile, adenina, guanina o citosina) e tre gruppi fosfato. Come nel DNA, anche le subunità dell'RNA si legano con un legame covalente 5' – 3' in modo da formare uno scheletro zucchero-fosfato.
5. Spiegare perché il codice genetico viene detto ridondante e praticamente universale e discutere come queste caratteristiche possano rifletterne la storia evolutiva.
 - Il codice genetico viene letto sull'mRNA come una serie di codoni che specificano una singola sequenza di aminoacidi. Il codice genetico è ridondante in quanto alcuni aminoacidi sono specificati da più di un codone. Il codice genetico è praticamente universale e ciò suggerisce che tutti gli organismi discendono da un comune progenitore ancestrale. Le uniche eccezioni al codice standard sono variazioni minime.



13.3

6. Confrontare i processi di trascrizione e replicazione del DNA, identificando somiglianze e differenze.
 - Le RNA polimerasi, coinvolte nella sintesi dell'RNA, presentano molte similarità con le DNA polimerasi coinvolte nella replicazione del DNA. Entrambi gli enzimi effettuano la sintesi in direzione 5' → 3'. Entrambi utilizzano come substrato nucleotidi con tre gruppi fosfato, rimuovendo due di tali gruppi quando i nucleotidi vengono legati covalentemente all'estremità 3' del filamento neosintetizzato.
 - Proprio come i due filamenti appaiati di DNA sono antiparalleli, così il filamento di DNA stampo e il filamento complementare di RNA sono anch'essi antiparalleli. Di conseguenza, nel corso della sintesi dell'RNA in direzione 3' → 5', il filamento di DNA stampo viene letto in direzione 5' → 3'.
 - Vengono seguite le stesse regole dell'appaiamento complementare della replicazione del DNA, tranne che la timina è sostituita dall'uracile.
7. Confrontare gli mRNA procariotici ed eucariotici e spiegare il significato funzionale delle loro differenze strutturali.
 - I geni eucariotici e i loro mRNA sono più complessi di quelli batterici. Dopo la

trascrizione, alle molecole di mRNA eucariotico viene aggiunto, all'estremità 5', un cappuccio o cap (una guanosina trifosfato modificata). Molti messaggeri vengono modificati dall'aggiunta all'estremità 3' di una coda di poli-A (una serie di nucleotidi adenilici). Queste modifiche sembrano proteggere le molecole di mRNA eucariotiche dalla degradazione, aumentandone la vita media rispetto a quelle batteriche.

- In molti geni eucariotici, le regioni codificanti, chiamate esoni, sono interrotte da regioni non codificanti, chiamate introni. Sia gli introni che gli esoni sono trascritti, ma gli introni vengono successivamente rimossi dal trascritto primario, o pre-mRNA, e gli esoni vengono riuniti insieme per costituire una sequenza codificante continua.

13.4

8. Identificare le caratteristiche del tRNA importanti per decodificare l'informazione genetica e convertirla nel "linguaggio delle proteine".
 - Gli RNA transfer (tRNA) sono le molecole "decodificanti" nel processo di traduzione. Ciascuna molecola di tRNA è specifica per un solo aminoacido. Una porzione della molecola contiene un anticodone complementare ad un codone dell'mRNA. L'aminoacido specificato dal codone dell'mRNA è legato ad un'estremità della molecola di tRNA.
9. Spiegare il funzionamento dei ribosomi nella sintesi proteica.
 - Ciascun ribosoma è costituito da una subunità maggiore ed una minore; ciascuna subunità contiene RNA ribosomale (rRNA) e numerose proteine. I ribosomi permettono l'appaiamento tra i tRNA e i codoni sull'mRNA, catalizzano la formazione dei legami peptidici tra gli aminoacidi e traslocano l'mRNA in modo che il codone successivo possa essere letto.
10. Schematizzare i processi di inizio, allungamento e terminazione nella sintesi proteica.
 - L'inizio rappresenta la prima fase della traduzione. I fattori di inizio si legano alla subunità ribosomale minore, che in seguito lega l'mRNA in corrispondenza della regione del codone di inizio AUG. Il tRNA iniziatore si lega al codone di inizio e successivamente avviene il legame della subunità ribosomale maggiore.
 - L'allungamento è un processo ciclico in cui gli aminoacidi vengono aggiunti uno ad uno alla catena polipeptidica in crescita. L'allungamento procede sempre in direzione 5' → 3' lungo l'mRNA. La catena polipeptidica si allunga dall'estremità amminica all'estremità carbossilica.
 - La terminazione, la fase finale della traduzione, si verifica quando il ribosoma incontra uno dei tre codoni di stop. Il sito A lega un fattore di rilascio, che determina il rilascio della catena polipeptidica completa e la dissociazione del complesso di traduzione.

13.5

11. Descrivere i poliribosomi della cellula batterica
 - In modo simile a ciò che avviene nella cellula eucariotica, trascrizione e traduzione procedono affiancate anche nella cellula batterica. I ribosomi procariotici si legano all'estremità 5' della sequenza di mRNA ed iniziano la traduzione prima che il processo di trascrizione sia completato. Fino a 15 ribosomi si legano all'mRNA formando un poliribosoma.
12. Illustrare brevemente l'RNA interference
 - L'RNA interference (RNAi) avviene quando piccole molecole di RNA, quali per esempio i piccoli RNA interferenti (siRNA) e i microRNA (miRNA) interferiscono con l'espressione di un gene o con il suo trascritto.
13. Descrivere i retrovirus e l'enzima trascrittasi inversa.
 - I retrovirus sono virus che sintetizzano il DNA da uno stampo di RNA. In essi, il flusso dell'informazione genetica è invertito dall'attività dell'enzima trascrittasi inversa. L'HIV-1, il virus che causa l'AIDS, è un esempio di retrovirus.

13.6

14. Fornire esempi dei differenti tipi di mutazioni che colpiscono la sequenza delle basi del DNA e spiegare gli effetti che ciascuna mutazione può avere sulla proteina prodotta.
 - Una sostituzione di base è una mutazione in grado di compromettere la funzione di una proteina se altera un codone che quindi o specificherà un aminoacido diverso (mutazione di senso o missense mutation) o darà origine ad un codone di stop (mutazione non senso o nonsense mutation). La sostituzione di una base può avere effetti minimi se l'aminoacido non è cambiato oppure se viene sostituito con un altro chimicamente simile.
 - L'inserzione o la delezione di una o due coppie di basi in un gene altera invariabilmente la

funzione della proteina, poiché porta ad una mutazione frameshift (mutazione per slittamento), che cambia completamente la sequenza dei codoni a valle della mutazione.

- Le mutazioni possono anche verificarsi a causa di sequenze di DNA mobili, note come trasposoni, che possono “saltare” all’interno di un gene. Molti di essi sono retrotrasposoni, che si replicano mediante la formazione di un intermedio a RNA; la trascrittasi inversa poi li converte nella loro sequenza di DNA di origine prima che possano inserirsi in un gene.

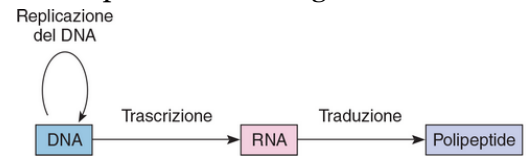
AUTOVERIFICHE

1. Beadle e Tatum hanno: (a) ipotizzato che il tRNA possiede un anticodone; (b) scoperto la malattia genetica alcaptonuria; (c) dimostrato che l’anemia falciforme è dovuta al cambiamento di un singolo aminoacido nella catena dell’emoglobina; (d) definito il codice genetico; (e) studiato la correlazione tra geni ed enzimi in *Neurospora*.
2. Qual è l’ordine corretto per il flusso di informazione nelle cellule procariotiche ed eucariotiche? (a) DNA → mRNA → proteina; (b) proteina → mRNA → DNA; (c) DNA → proteina → mRNA; (d) proteina → DNA → mRNA; (e) mRNA → proteina → DNA.
3. Nel corso della trascrizione, da quanti nucleotidi sarebbe composto l’RNA codificato da una sequenza di DNA di 99 coppie di nucleotidi? (a) 297; (b) 99; (c) 33; (d) 11; (e) è impossibile stabilirlo in base alle informazioni date.
4. Il codice genetico è definito come una serie di _____ nel _____. (a) Anticodoni, tRNA; (b) codoni, DNA; (c) anticodoni, mRNA; (d) codoni, mRNA; (e) codoni e anticodoni, rRNA.
5. L’RNA differisce dal DNA per il fatto che la base _____ è sostituita da _____. (a) Adenina, uracile; (b) uracile, timina; (c) guanina, uracile; (d) citosina, guanina; (e) guanina, adenina.
6. L’RNA cresce nella direzione _____ quando l’RNA polimerasi si muove lungo il filamento stampo di DNA nella direzione _____. (a) 5’ → 3’; 3’ → 5’; (b) 3’ → 5’; 3’ → 5’; (c) 5’ → 3’; 5’ → 3’; (d) 3’ → 3’, 5’ → 5’; (e) 5’ → 5’; 3’ → 3’.
7. Quale/i delle seguenti non si trova/trovano nelle molecole di mRNA procariotico? (a) Codone di stop; (b) sequenze leader a monte; (c) sequenze trailing a valle; (d) codone di inizio; (e) sequenze promotrici.
8. Negli eucarioti, durante il processamento nucleare, cosa è rimosso dal pre-mRNA? (a) Sequenze leader a monte; (b) coda di poli-A; (c) introni; (d) esoni; (e) tutte le precedenti.
9. Il ruolo del tRNA è quello di trasportare: (a) gli aminoacidi al ribosoma; (b) gli aminoacidi al nucleo; (c) i fattori di inizio al ribosoma; (d) l’mRNA al ribosoma; (e) i fattori di rilascio al ribosoma.
10. Supponete di miscelare i seguenti componenti della sintesi proteica in una provetta: gli aminoacidi di un coniglio, i ribosomi di un cane, i tRNA di un topo, gli mRNA di uno scimpanzé, gli enzimi necessari ed una fonte di energia di una giraffa. Se ha luogo la sintesi proteica, sarà prodotta la proteina di quale animale? (a) Coniglio; (b) cane; (c) topo; (d) scimpanzé; (e) giraffa.
11. _____ catalizza l’escissione degli introni dal premRNA. (a) Il ribosoma; (b) lo spliceosoma; (c) l’enzima RNA polimerasi; (d) l’enzima aminoacil-tRNA sintetasi; (e) l’enzima trascrittasi inversa.
12. Una mutazione non senso: (a) causa la sostituzione di un aminoacido con un altro in una catena polipeptidica; (b) deriva dalla delezione di una o due basi, portando ad uno scivolamento della griglia di lettura; (c) deriva dall’inserzione di una o due basi, portando ad uno scivolamento della griglia di lettura; (d) deriva dall’inserzione di un trasposone; (e) di solito porta alla formazione di una catena polipeptidica anormalmente breve.

PENSIERO CRITICO

1. Confrontate la formazione dell’mRNA nei procarioti e negli eucarioti. In che modo le differenze influenzano le modalità di traduzione di ciascun tipo di RNA? Esiste, in uno dei due sistemi, un evidente vantaggio in termini di costo energetico? Quale dei due sistemi offre maggiori vantaggi dal punto di vista del controllo dell’espressione genica?
2. I biologi ipotizzano che ad un certo punto i trasposoni perdano la capacità di replicarsi e quindi restino inseriti nel DNA senza più spostarsi. In base a quanto appreso in questo capitolo, suggerite una plausibile spiegazione di tale perdita di mobilità.
3. Come è stato decifrato il codice genetico?
4. Inserite una freccia nella figura seguente che mostri il punto in cui si verifica la trascrizione inversa catalizzata dall’enzima trascrittasi inversa. Mostrate anche i punti in cui sono coinvolti gli enzimi DNA polimerasi, RNA polimerasi e peptidil transferasi.

5. ANALISI DEI DATI . State ripetendo il classico esperimento di Beadle e Tatum in un laboratorio di biologia. Inizialmente esponete spore di *Neurospora* ai raggi X, successivamente preparate una coltura partendo da una spora irradiata e la aliquotate in un terreno contenente (1) medium minimo con vitamine, (2) medium minimo con aminoacidi, (3) medium minimo semplicemente. Interpretate i risultati della crescita fungina nei tre terreni di coltura, in relazione alla capacità di crescita nei diversi terreni.
6. CONNESSIONE EVOLUTIVA . Dal momento che gli introni sono presenti in tutti gli eucarioti e solo in alcuni procarioti, i biologi ipotizzano che essi si siano evoluti molto presto nella storia della vita. Se questo è vero, suggerite perché quasi tutti i procarioti attuali hanno perso la maggior parte dei loro introni nel corso dell'evoluzione.



Articolo II. Regolazione genica

14

In un organismo pluricellulare, ogni tipo di cellula ha una forma caratteristica, svolge attività specifiche e produce un insieme distinto di proteine. Tuttavia, a parte poche eccezioni, tutte le cellule di un organismo contengono la stessa informazione genetica. Perché, allora, esse non sono identiche nella struttura, nella composizione molecolare e nella funzione? Le cellule differiscono perché l'espressione dei geni è regolata e in ogni cellula solo parte dell'informazione genetica totale viene espressa (vedi fotografia).

Quali sono allora i meccanismi che controllano l'espressione genica? Consideriamo un gene che codifica una proteina ad attività enzimatica. Esso è completamente espresso solo quando il gene è trascritto in RNA messaggero (mRNA), l'mRNA è tradotto in una proteina e la proteina è attivata per catalizzare una specifica reazione cellulare. L'espressione genica è dunque il risultato di una serie di processi, ognuno dei quali può essere controllato in molti modi diversi. I meccanismi di controllo necessitano di informazioni sotto forma di segnali diversi, alcuni dei quali hanno origine intracellulare, mentre altri provengono dall'ambiente esterno. Questi segnali interagiscono con il DNA, l'RNA o la proteina.

Alcune delle principali strategie usate per regolare l'espressione di un gene includono il controllo della quantità di mRNA trascritto, la velocità di traduzione dell'mRNA e l'attività della proteina prodotta. Tutto ciò può essere ottenuto in modi diversi. Per esempio, la quantità di mRNA disponibile può essere controllata regolando la velocità di degradazione o quella di sintesi.

Benché i batteri non siano multicellulari, anch'essi hanno la necessità di regolare l'espressione dei loro geni. Nei procarioti la regolazione genica spesso riguarda il controllo della trascrizione dei geni i cui prodotti sono coinvolti nell'utilizzazione delle risorse. Negli eucarioti, invece, per la maggiore complessità di queste cellule e per la necessità di controllare lo sviluppo in organismi pluricellulari, è di importanza primaria la fine sintonia dei sistemi di controllo. Di conseguenza, la regolazione dei geni eucariotici avviene a tutti i livelli.

14.1 LA REGOLAZIONE GENICA NEI BATTERI E NEGLI EUCARIOTI: una visione d'insieme

OBIETTIVO DI APPRENDIMENTO

1. Spiegare perché le cellule procariotiche ed eucariotiche presentano differenti meccanismi di regolazione genica.

Le cellule procariotiche ed eucariotiche utilizzano meccanismi di regolazione genica differenti, sulla base delle necessità dell'organismo. Poiché i batteri sono organismi unicellulari, ogni cellula deve essere in grado di assolvere a tutte le proprie funzioni essenziali; inoltre, i procarioti crescono rapidamente e hanno un periodo di vita relativamente breve, per cui sono dotati di una minore quantità di componenti chimici.

Il requisito primario per la regolazione genica nei batteri è la produzione di enzimi ed altre proteine nel momento in cui sono richiesti, per cui il meccanismo più efficiente è il controllo a livello trascrizionale.

L'organizzazione di geni correlati in gruppi, che possono essere accesi o spenti rapidamente come singole unità, permette a queste cellule di sintetizzare esclusivamente i prodotti genici utili in un particolare momento. Questo tipo di regolazione richiede un rapido ricambio di molecole di mRNA, in modo che queste non si accumulino e non continuino ad essere tradotte quando non è necessario farlo. Raramente i batteri regolano i livelli enzimatici mediante la degradazione delle proteine. Quando la sintesi di una proteina termina, le molecole proteiche precedentemente sintetizzate si diluiscono così rapidamente nei successivi cicli di divisione cellulare che in genere non è necessario degradarle. Solo quando le cellule non hanno nutrimento nell'ambiente e sono private degli aminoacidi essenziali, le proteasi sono utilizzate per degradare le proteine che non servono più, per poter così riciclare e riutilizzare gli aminoacidi.

Le cellule eucariotiche hanno esigenze di regolazione diverse. Sebbene il controllo a livello della trascrizione predomini, divengono importanti i controlli anche ad altri livelli dell'espressione genica, soprattutto negli organismi pluricellulari, dove i gruppi di cellule cooperano gli uni con gli altri nella suddivisione del lavoro. Poiché un singolo gene può essere regolato in modo differente in diversi tipi cellulari, la regolazione genica negli eucarioti è estremamente più complessa.

Di norma, le cellule eucariotiche hanno una vita media più lunga, durante la quale possono avere bisogno di rispondere ripetutamente a molti stimoli diversi; perciò, piuttosto che sintetizzare nuovi enzimi ogni volta che devono rispondere ad uno stimolo, esse utilizzano enzimi preformati e altre proteine che possono essere rapidamente convertite da uno stato inattivo ad uno attivo. Alcune cellule hanno una scorta di mRNA inattivi; ad esempio, gli mRNA di una cellula uovo vengono attivati quando essa è fecondata.

Gran parte della regolazione genica negli organismi pluricellulari è basata sull'espressione differenziale dei geni nelle cellule dei vari tessuti. Ogni tipo di cellula ha infatti geni che sono attivi ed altri che possono non essere mai usati. Per esempio, i globuli rossi in corso di differenziamento sintetizzano la proteina emoglobina, necessaria al trasporto dell'ossigeno; al contrario, le cellule muscolari non sintetizzano emoglobina, ma una proteina correlata, la mioglobina, che immagazzina ossigeno in quello specifico tipo di tessuto. Evidentemente, i vantaggi adattativi della cooperazione fra le cellule, negli organismi pluricellulari, superano lo svantaggio del trasporto di un "carico" di geni inattivi attraverso molti cicli di divisione cellulare.

Il maiale domestico rappresenta un altro esempio di come la regolazione genica influenzi l'espressione nei diversi tessuti. Nel 2003, sono stati riportati i dettagli di una mutazione genetica che fa sì che i maiali sviluppino una maggiore massa di tessuto muscolare (FIG. 14-1). Tale mutazione è portata da un gene, detto gene del fattore di crescita insulino-simile 2 (IGF2), che codifica una proteina prodotta sia nei muscoli che nel fegato. I biologi hanno scoperto che una mutazione per sostituzione di base (vedi Capitolo 13) nel gene IGF2 lo rende tre volte più attivo nei muscoli del maiale, rendendone più magra la carne. Tuttavia, la mutazione non altera l'espressione del gene nelle cellule epatiche. È interessante notare che tale mutazione non cade nella porzione del gene codificante la proteina, ma in una regione non codificante, presumibilmente responsabile della regolazione genica.



FIGURA 14-1

Maiale magro caratterizzato da una mutazione nel gene IGF

Anni fa, gli allevatori scoprirono un maiale che aveva più muscoli e meno grasso del normale e lo sottoposero ad accoppiamenti selettivi. Oggi, la maggior parte delle popolazioni commerciali di maiali possiede la mutazione che conferisce tale carattere. La mutazione, che è stata recentemente identificata in una sostituzione di una guanina con un'adenina, è localizzata in una regione non codificante del gene IGF2 .

Verifica

- Qual è il meccanismo di regolazione genica più efficiente nei batteri?
- Fate un confronto tra la regolazione genica dei procarioti e quella degli eucarioti.

14.2 LA REGOLAZIONE GENICA NEI BATTERI

OBIETTIVO DI APPRENDIMENTO

2. Definire il termine operone e spiegare le funzioni dei siti promotore ed operatore.
3. Fare una distinzione tra geni inducibili, reprimibili e costitutivi.
4. Evidenziare le differenze tra il controllo positivo e il controllo negativo, mostrando come entrambi i sistemi regolino l'operone del lattosio.
5. Descrivere i diversi tipi di controllo post-trascrizionale nei procarioti.

Una cellula di *Escherichia coli*, un batterio che vive nell'intestino dell'uomo e di altri mammiferi, ha 4288 geni che codificano per proteine di cui approssimativamente il 60% ha funzione nota. Alcune delle proteine codificate da questi geni sono sempre necessarie alla cellula (ad es., gli enzimi coinvolti nella glicolisi). Questi geni costantemente trascritti sono chiamati geni costitutivi e i biologi li descrivono come **espressi costitutivamente**. Altri prodotti genici sono invece necessari solo quando il batterio si trova in particolari condizioni ambientali.

Per esempio, i batteri che vivono nel colon di un bovino adulto non sono normalmente esposti al lattosio, un disaccaride presente nel latte. Tuttavia, se le stesse cellule si trovassero a vivere nel colon del vitello, allora avrebbero a disposizione del lattosio come fonte energetica. Questo pone un interrogativo. Può una cellula batterica investire energia e materiali per produrre enzimi che metabolizzano il lattosio solo per l'eventualità di trovarsi nel sistema digerente di un vitello? D'altra parte, se le cellule di *E. coli* non avessero la capacità di produrre questi enzimi potrebbero morire di fame pur in presenza di abbondanza di cibo. *E. coli* affronta il problema regolando la produzione di molti dei suoi enzimi in modo da poter utilizzare in modo estremamente efficiente le molecole organiche disponibili.

Le cellule hanno principalmente due possibilità per controllare la propria **attività** metabolica: possono regolare l'attività dei loro enzimi (ovvero quanto efficacemente l'enzima lavora) oppure possono regolare il **numero** di molecole enzimatiche presenti in ogni cellula. Per regolare alcuni enzimi, possono essere utilizzate entrambe le strategie.

Si stima che una cellula di *E. coli* che cresca in presenza di glucosio necessiti di circa 800 enzimi diversi. Alcuni di questi devono essere presenti in notevoli quantità, altri in modeste quantità. La quantità di ogni enzima, perciò, deve essere efficientemente controllata affinché sia garantito il corretto funzionamento della cellula.

I procarioti sono in grado di rispondere ai cambiamenti delle condizioni ambientali. Se viene aggiunto lattosio ad una coltura di cellule di *E. coli*, queste sintetizzano rapidamente gli enzimi necessari per metabolizzare questo zucchero. I batteri rispondono in maniera così efficiente, in quanto i geni funzionalmente correlati (come i tre geni coinvolti nel metabolismo del lattosio) sono regolati in modo coordinato all'interno di complessi genici chiamati **operoni**.

Gli operoni nei procarioti consentono il controllo coordinato di geni funzionalmente correlati

Nel 1961, i ricercatori francesi François Jacob e Jacques Monod dimostrarono come alcuni geni sono regolati a livello biochimico; essi studiarono i geni che codificano gli enzimi per il catabolismo del disaccaride lattosio. Nel 1965, Jacob e Monod furono insigniti del premio Nobel per la Medicina grazie alle loro scoperte relative al controllo genetico degli enzimi.

Affinché *E. coli* possa utilizzare il lattosio come fonte di energia, lo zucchero deve essere scisso nei monosaccaridi glucosio e galattosio dall'enzima beta-galattosidasi. Successivamente, il galattosio è convertito in glucosio da un altro enzima e le risultanti due molecole di glucosio sono a loro volta utilizzate nella via della glicolisi (vedi Capitolo 8).

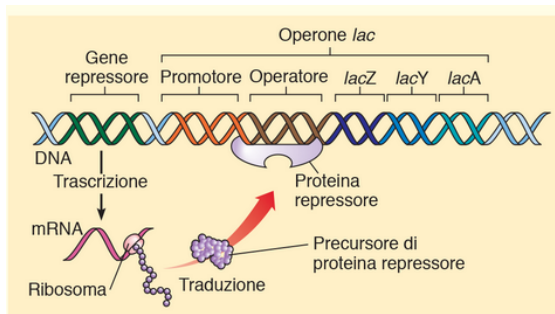
Mentre le cellule di *E. coli* cresciute in presenza di glucosio contengono modeste quantità dell'enzima β -galattosidasi, quelle cresciute in presenza di lattosio, come unica fonte di carbonio, hanno diverse migliaia di molecole dell'enzima per ogni cellula, pari a circa il 3% delle proteine cellulari totali. In presenza di lattosio aumentano anche i livelli di altri due enzimi: lattosio permeasi e galattoside transacetilasi. L'enzima permeasi è necessario per il trasporto del lattosio attraverso la membrana plasmatica; in sua assenza, solo una piccola quantità di lattosio può penetrare nella cellula. Anche l'enzima transacetilasi è coinvolto nel metabolismo del lattosio, sebbene la sua funzione sia meno chiara.

Jacob e Monod riuscirono ad identificare ceppi mutanti di *E. coli* nei quali un singolo difetto genetico

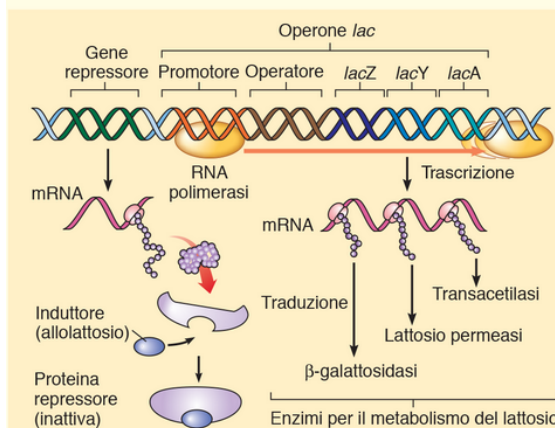
portava alla perdita di tutti e tre gli enzimi. Questa scoperta, insieme ad altre informazioni, li portò a concludere che le sequenze di DNA codificanti tutti e tre gli enzimi fossero organizzate, nel cromosoma del batterio, a costituire una singola unità, e fossero soggette ad un meccanismo di controllo comune. Ciascuna sequenza che codifica una proteina ad attività enzimatica è detta gene strutturale. Jacob e Monod hanno coniato il termine operone per riferirsi ad un complesso genico che comprende geni strutturali con funzioni correlate e sequenze di DNA vicine responsabili del loro controllo. I geni strutturali dell'operone **lac** (operone lattosio) – **lacZ**, **lacY** e **lacA** – codificano rispettivamente per la β -galattosidasi, la lattosio permeasi e la galattoside transacetilasi (FIG. 14-2).

La trascrizione dell'operone lattosio inizia quando l'RNA polimerasi si lega ad un singolo sito promotore a monte delle sequenze codificanti. Procede poi alla trascrizione del DNA, formando una singola molecola di mRNA che contiene le informazioni che codificano per i tre enzimi. Ciascuna sequenza codificante un enzima su questo mRNA contiene i propri codoni di inizio e di terminazione della traduzione, così che vengono sintetizzate tre molecole proteiche separate. Poiché tutti e tre gli enzimi sono tradotti dalla stessa molecola di mRNA, per regolare la loro sintesi è sufficiente attivare o disattivare la trascrizione.

L'interruttore che controlla la sintesi dell'mRNA è chiamato operatore. Si tratta di una sequenza di basi a monte del primo gene strutturale nell'operone lattosio. In assenza di lattosio, una proteina repressore, chiamata repressore del lattosio, si lega strettamente alla regione dell'operatore. L'RNA polimerasi si lega al promotore, ma non può trascrivere i geni strutturali dell'operone.



(a) **Lattosio assente.** In assenza di lattosio, una proteina repressore, codificata da un gene adiacente, si lega ad una regione conosciuta come operatore, bloccando la trascrizione dei geni strutturali.



(b) **Lattosio presente.** Quando il lattosio è presente, viene trasformato in allolattosio, che si lega al repressore in un sito allosterico, alterando la struttura della proteina, che così non si può più legare all'operatore. Questo permette all'RNA polimerasi di trascrivere i geni strutturali.

PUNTO CHIAVE I geni strutturali dell'operone lac sono controllati in modo coordinato e trascritti in una singola molecola di mRNA.

FIGURA 14-2
L'operone lac

Il repressore del lattosio è codificato da un gene repressore che in questo caso è un gene strutturale adiacente, situato a monte del sito promotore. A differenza dei geni dell'operone lattosio, il gene che codifica il repressore è costitutivo, ovvero è sempre attivo, e piccole quantità della proteina repressore sono prodotte di continuo.

Questa proteina è capace di legarsi specificamente alla sequenza dell'operatore del lattosio. Quando le cellule sono coltivate in assenza di lattosio, il sito operatore è quasi sempre occupato da una molecola di repressore. Solo quando il sito operatore è libero, per un breve lasso di tempo, l'RNA polimerasi può legarsi ed iniziare la trascrizione dei geni strutturali; tuttavia, la cellula sintetizza poche molecole di enzima in quanto l'mRNA di *E. coli* viene degradato rapidamente (ha un'emivita fra i 2 e i 4 minuti).

Il lattosio è capace di attivare, o meglio indurre, la trascrizione dell'intero operone, in quanto la proteina repressore del lattosio contiene una seconda regione funzionale oltre a quella di legame per il DNA. Questo è un sito di legame allosterico (vedi Capitolo 7) per l'allolattosio, un isomero strutturale prodotto dal lattosio. Se il lattosio è presente nel mezzo di crescita, alcune molecole

entrano nella cellula e vengono trasformate in allolattosio dalle poche molecole di β -galattosidasi presenti. Quando una molecola di allolattosio si lega al repressore nel sito allosterico, altera la conformazione della proteina cosicché il sito di legame del DNA non può più riconoscere l'operatore. Quando tutte le molecole di repressore hanno legato l'allolattosio e pertanto sono inattivate, l'RNA polimerasi trascrive attivamente i geni strutturali dell'operone.

La cellula di *E. coli* continua a produrre β -galattosidasi e le altre proteine dell'operone fino a quando il lattosio non è virtualmente esaurito. Quando i livelli intracellulari di lattosio diminuiscono, la proteina repressore non ha più allolattosio a cui legarsi e quindi assume nuovamente una conformazione compatibile con il legame alla regione dell'operatore, così che la trascrizione dell'operone lattosio ha termine.

Per studiare l'operone lattosio, Jacob e Monod isolarono mutanti genetici

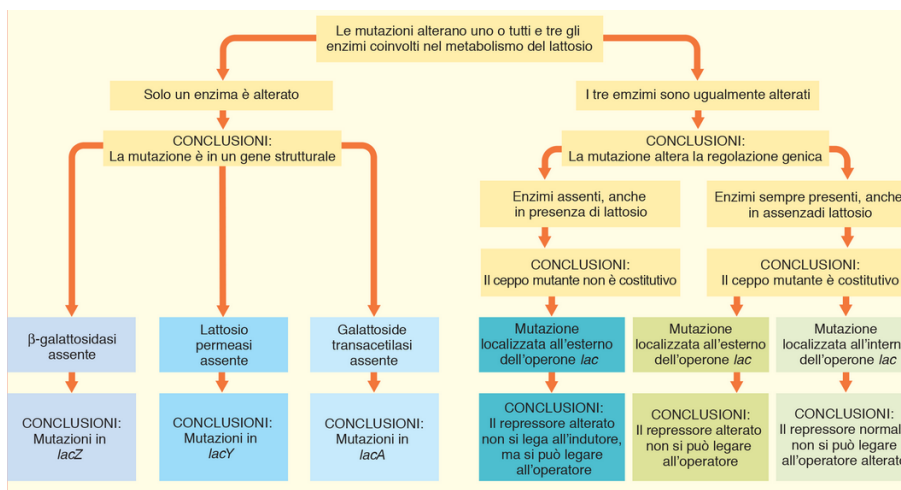
In che modo Jacob e Monod hanno studiato l'operone lattosio? Il loro approccio era basato sull'uso di ceppi mutanti che anche oggi hanno un ruolo essenziale per identificare i componenti dei sistemi di regolazione. Incroci genetici di ceppi mutanti permettono infatti ai ricercatori di determinare le **posizioni di mappa** (cioè l'ordine lineare) dei geni sul DNA e di capirne le normali funzioni studiando cosa accade quando non ci sono o sono alterati. Queste informazioni sono di solito associate dai ricercatori a quelle derivate direttamente da studi biochimici.

I due ricercatori furono in grado di suddividere i ceppi mutanti in due gruppi, sulla base del fatto che una particolare mutazione avesse effetto su un solo enzima o su tutti e tre (FIG. 14-3). In un gruppo, solo un enzima, tra β -galattosidasi, lattosio permeasi o galattoside transacetilasi, era influenzato dalla mutazione. I successivi studi di mappatura genica dimostrarono che queste erano mutazioni in geni strutturali, localizzate una vicina all'altra, in una sequenza lineare.

Jacob e Monod studiarono anche ceppi che classificarono come mutanti di regolazione, perché una singola mutazione era in grado di alterare in modo coordinato l'espressione di tutti e tre gli enzimi. Alcuni mutanti di regolazione erano in grado di trascrivere i geni strutturali dell'operone lac ad un tasso significativo anche quando il lattosio era assente, comportando un dispendio energetico ingiustificato per la cellula dovuto alla produzione di enzimi non necessari. Un gruppo di queste mutazioni geniche mappava al di fuori dell'operone lac . Jacob e Monod ipotizzarono quindi l'esistenza di un gene repressore che codifica per una molecola repressore (successivamente identificata in una proteina). Sebbene il difetto specifico potesse essere di tipo diverso, i membri di questo gruppo di mutanti producono repressori difettivi non in grado di legarsi all'operone lac e quindi incapaci di inattivarne il promotore; in questo modo l'operone lattosio è espresso costitutivamente.

Al contrario, alcuni mutanti di regolazione erano incapaci di trascrivere l'operone lac anche in presenza di lattosio. I ricercatori scoprirono che ognuno di questi geni anomali codificava un repressore caratterizzato da un alterato sito di legame per l'allolattosio. Una volta legata all'operatore, questa forma mutata di repressore manteneva quindi l'operone inattivo.

I geni responsabili del comportamento di un altro gruppo di mutanti regolatori erano situati all'interno dell'operone lattosio, ma non interessavano direttamente nessuno dei tre geni strutturali. Jacob e Monod ipotizzarono che i membri di questo gruppo di mutanti producessero molecole di repressore normali, ma avessero sequenze alterate nell'operatore incapaci di legare il repressore.



PUNTO CHIAVE Jacob e Monod hanno analizzato le caratteristiche di diversi ceppi mutanti di *E. coli* per comprendere la struttura e la funzione dell'operone lac.

FIGURA 14-3 *Caratterizzazione genetica e biochimica dell'operone lac*
Il diagramma mostra come Jacob e Monod formularono le loro conclusioni basate su osservazioni sperimentali.

Un gene inducibile non è trascritto fino a che uno specifico induttore inattiva il suo repressore

I genetisti definiscono l'operone lattosio un operone inducibile . Un gene o un operone inducibile è di solito controllato da un repressore che lo mantiene inattivo. La presenza di un induttore (in questo caso l'allolattosio) inattiva il repressore e così il gene o l'operone viene trascritto. Di norma, i geni o gli operoni inducibili codificano enzimi che fanno parte di una via catabolica, la cui funzione è quella di degradare molecole organiche per fornire l'energia e i substrati utili alle reazioni anaboliche. Questo tipo di sistema di regolazione consente alle cellule di risparmiare l'energia necessaria per sintetizzare gli enzimi, quando non sono disponibili i loro substrati.

Un gene reprimibile è trascritto fino a che uno specifico complesso repressore/corepressore si lega al DNA

Un altro tipo di sistema di regolazione genica nei batteri è associato principalmente con le vie anaboliche,

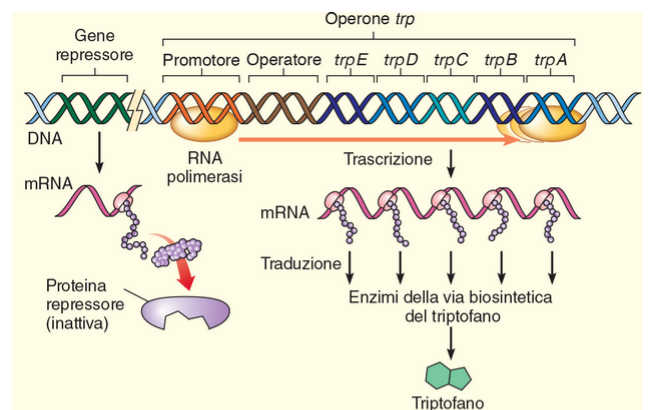
nelle quali aminoacidi, nucleotidi ed altre molecole essenziali sono sintetizzati a partire da precursori più semplici. La regolazione di questi percorsi coinvolge normalmente enzimi che sono codificati da geni reprimibili.

Geni ed operoni reprimibili sono di solito attivi e vengono inattivati solo in particolari condizioni. Nella maggior parte dei casi, il segnale molecolare usato per regolare questi geni è il prodotto finale della via metabolica. Quando la concentrazione del prodotto (ad esempio, un aminoacido) è bassa, tutti gli enzimi della via metabolica sono attivamente sintetizzati. Viceversa, quando il livello intracellulare del prodotto finale è alto, la sintesi enzimatica viene repressa. Poiché composti come gli aminoacidi sono continuamente necessari per la crescita cellulare, la strategia più efficace è mantenere attivi i geni che controllano la loro produzione, eccetto quando sia disponibile una grossa scorta degli stessi aminoacidi. La capacità di disattivare opportunamente i geni permette alle cellule di evitare una sovrapproduzione di aminoacidi e di altre molecole che sono essenziali, ma la cui sintesi è al tempo stesso dispendiosa.

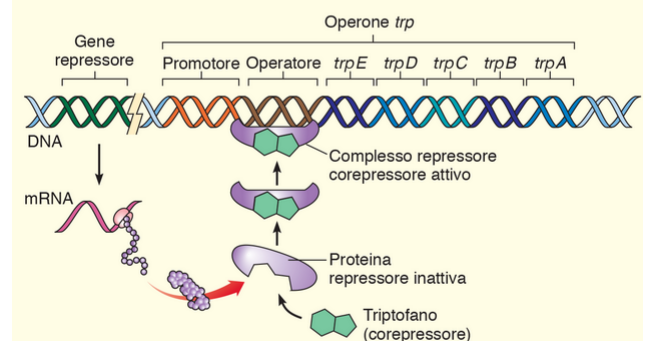
L'operone triptofano (*trp*) è un chiaro esempio di sistema reprimibile. Sia in *E. coli* che in altri batteri ad esso correlati quali la *Salmonella*, l'operone *trp* è costituito da cinque geni strutturali che codificano gli enzimi necessari alla sintesi dell'aminoacido triptofano. Questi sono raggruppati insieme in un'unità trascrizionale con un singolo promotore ed un singolo operatore (FIG. 14-4a). Un gene regolatore, posto a distanza, codifica una proteina repressore diffusibile che presenta un meccanismo d'azione differente rispetto a quello del repressore del lattosio. Questa proteina è infatti sintetizzata in forma inattiva ed è incapace di legarsi alla regione dell'operatore dell'operone *trp*.

Il sito di legame del repressore al DNA diventa attivo solo quando il triptofano, suo corepressore, si lega ad un sito allosterico sulla molecola del repressore (FIG. 14-4b). Quando i livelli intracellulari di triptofano sono bassi, la proteina repressore è inattiva ed è quindi incapace di legarsi alla regione dell'operatore sul DNA. In questo caso, gli enzimi richiesti per la sintesi del triptofano sono sintetizzati e la concentrazione dell'aminoacido aumenta. Al crescere della concentrazione di triptofano, alcune molecole dell'aminoacido si legano al sito allosterico del repressore alterandone la conformazione, così da rendere possibile il suo legame con la sequenza operatore sul DNA. Questo meccanismo ha l'effetto di disattivare l'operone, bloccando di conseguenza la trascrizione.

PUNTO CHIAVE I geni strutturali che codificano gli enzimi per la sintesi dell'aminoacido triptofano sono organizzati in un operone reprimibile.



(a) Livelli intracellulari di triptofano bassi. La proteina repressore è incapace di impedire la trascrizione perché non può legarsi all'operatore.



(b) Livelli intracellulari di triptofano elevati. L'aminoacido si lega ad un sito allosterico sulla proteina repressore modificandone la conformazione. Il repressore in questo modo viene attivato e si lega alla regione dell'operatore bloccando la trascrizione dell'operone fino a che il triptofano non sia di nuovo richiesto dalla cellula.

FIGURA 14-4
L'operone *trp*

I meccanismi di regolazione negativi inibiscono la trascrizione, quelli positivi la stimolano

Le caratteristiche degli operoni lattosio e triptofano, appena descritte, sono esempi di controllo negativo. Infatti, i sistemi sotto controllo negativo sono quelli in cui la proteina regolatrice, che si lega al DNA, è un repressore che inattiva la trascrizione di un gene. Alcuni sistemi regolatori implicano, viceversa, un controllo positivo, ossia mediante proteine con funzione di attivatori che legano il DNA e stimolano la trascrizione del gene. L'operone lattosio presenta sia elementi di controllo negativi (repressore del lattosio) sia positivi.

Il controllo positivo dell'operone lac necessita che la cellula avverta l'assenza del glucosio, substrato iniziale nella via della glicolisi. Il lattosio, come anche il glucosio, viene degradato mediante tappe enzimatiche successive per produrre energia. Tuttavia, poiché il lattosio deve essere prima convertito in glucosio, è più conveniente, per le cellule di *E. coli*, usare prima la scorta disponibile di glucosio. Utilizzando il glucosio come substrato preferenziale per produrre energia, la cellula evita il considerevole dispendio energetico della sintesi di enzimi addizionali quali la β -galattosidasi (FIG. 14-5a).

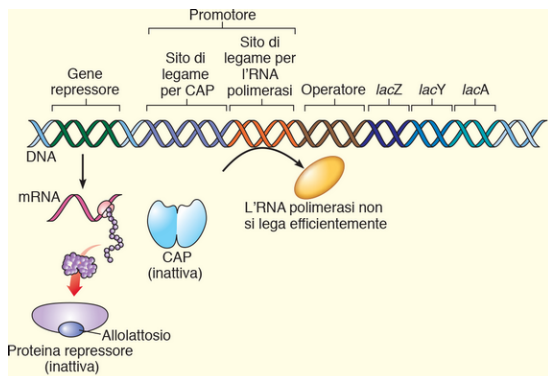
In effetti, l'operone lattosio ha una sequenza promotore relativamente inefficiente, ossia con una scarsa affinità per l'RNA polimerasi anche quando la proteina repressore è inattivata. Tuttavia, esiste una

sequenza adiacente al sito promotore che può effettuare un legame con un'altra proteina regolatrice, chiamata proteina CAP (Catabolite Activator Protein o proteina attivatrice del catabolita). Una volta attivata, la CAP stimola la trascrizione dell'operone lattosio e di altri operoni batterici.

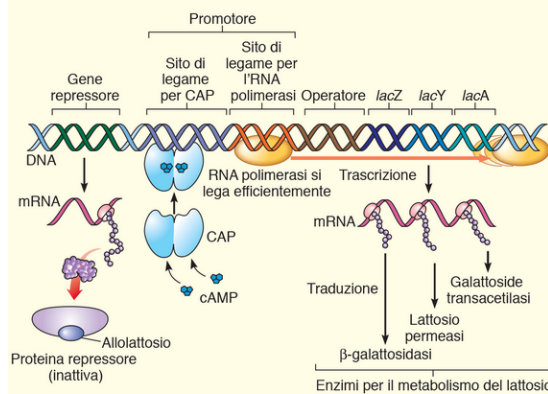
Nella sua forma attiva, la CAP lega, in un suo sito allosterico, l' AMP ciclico o cAMP , derivato ciclico dell'adenosina monofosfato (vedi Fig. 3-25). Quando le cellule si impoveriscono di glucosio, aumentano i livelli di cAMP (FIG. 14-5b). Il cAMP si lega alla proteina CAP e il complesso che ne risulta è in grado di riconoscere una specifica sequenza del DNA vicina al promotore dell'operone lattosio. Questo legame della CAP attiva provoca la curvatura della doppia elica del DNA (FIG. 14-6) ed aumenta l'affinità della regione del promotore per l'RNA polimerasi, permettendo un aumento della velocità di inizio della trascrizione in presenza di lattosio. Perciò, l'operone è completamente attivo solo se è presente il lattosio e i livelli di glucosio intracellulari sono bassi. Le caratteristiche dei sistemi di controllo negativi e positivi sono riassunte nella TABELLA 14-1.

I geni costitutivi sono trascritti a diversa velocità

Molti dei prodotti genici codificati dal cromosoma di *E. coli* sono necessari solo in particolari condizioni ambientali e nutrizionali. Come si è visto, questi geni sono generalmente regolati a livello della trascrizione e vengono attivati o disattivati qualora si modifichino le condizioni ambientali e metaboliche. Al contrario, i geni costitutivi sono continuamente trascritti, ma non sono necessariamente trascritti (o i loro mRNA tradotti) alla stessa velocità. Alcuni enzimi lavorano più efficientemente o sono più stabili di altri e, di conseguenza, è sufficiente che siano presenti in piccole quantità. I geni costitutivi che codificano proteine richieste in grandi quantità devono essere trascritti più rapidamente di quelli che codificano proteine richieste in minore quantità. La velocità di trascrizione dei geni costitutivi, comunque, è controllata dalle sequenze dei propri promotori. Geni costitutivi con promotori efficienti ("forti") legano la RNA polimerasi più spesso e, di conseguenza, trascrivono più molecole di mRNA di quelli che hanno promotori inefficienti ("deboli").



(a) Alti livelli di lattosio, alti livelli di glucosio, bassi livelli di cAMP. Quando i livelli di glucosio sono alti, il cAMP è basso; la proteina CAP è in forma inattiva e non può promuovere la trascrizione che avviene quindi solo a livelli bassi o non avviene per niente.



(b) Alti livelli di lattosio, bassi livelli di glucosio, alti livelli di cAMP. Quando i livelli di glucosio sono bassi, il cAMP si lega alla proteina CAP che può così attivare la trascrizione dell'operone legandosi al DNA.

PUNTO CHIAVE Il promotore del lattosio è di per sé debole e lega in maniera inefficiente la RNA polimerasi anche quando il repressore lattosio è inattivo.

FIGURA 14-5
Il controllo positivo dell'operone lac

I geni che codificano proteine repressore o attivatore, che regolano operoni per la sintesi di enzimi metabolici, sono di solito costitutivi e producono i propri prodotti proteici in modo continuo. Dato che ogni cellula di solito necessita di scarse quantità di molecole di repressore o di attivatore, i promotori di questi geni sono relativamente deboli.

Nei procarioti esiste anche una regolazione post-trascrizionale

Come abbiamo visto in *E. coli*, la maggior parte della variabilità dei livelli di proteine è dovuta a meccanismi di regolazione trascrizionale. Ci sono, comunque, anche meccanismi di regolazione che operano dopo la trascrizione, conosciuti come controlli post-trascrizionali, che agiscono a vari livelli dell'espressione genica.

I controlli traduzionali sono controlli posttrascrizionali che regolano la velocità di traduzione di una specifica molecola di mRNA; infatti, poiché la vita media degli mRNA in una cellula batterica è molto breve, un messaggero che viene tradotto rapidamente può produrre molte proteine rispetto ad uno che viene tradotto più lentamente. In *E. coli*, alcune molecole di mRNA vengono tradotte ad una velocità 1000 volte superiore ad altre; la maggior parte delle differenze sembra imputabile alla velocità con cui si realizza il legame dei ribosomi all'mRNA, e quindi all'inizio della traduzione.

In linea generale, i controlli post-traduzionali agiscono come interruttori che determinano l'attivazione o l'inattivazione di uno o più enzimi già presenti nella cellula. Questi sistemi di controllo consentono una

risposta rapida a cambiamenti nella concentrazione intracellulare di molecole essenziali, quali gli aminoacidi, modificando l'attività dei propri enzimi. Un comune meccanismo di controllo post-traduzionale, che agisce sulla velocità di sintesi di una via metabolica, è l'inibizione retroattiva (o inibizione da feedback o da prodotto finale) (vedi Fig. 7-15). Il prodotto finale di una via metabolica lega il primo enzima di tale via in un suo sito allosterico, determinando temporaneamente la sua inibizione. Se il primo enzima di una catena di reazioni metaboliche non funziona, tutti gli enzimi seguenti nella stessa via saranno privati dei propri substrati. È importante notare che ciò differisce dalla repressione da prodotto finale dell'operone triptofano sopra discussa. In questo caso, infatti, il prodotto finale (triptofano) previene la sintesi di nuovi enzimi, mentre l'inibizione da feedback agisce come meccanismo di regolazione fine sull'attività di enzimi *già presenti* in una via metabolica.

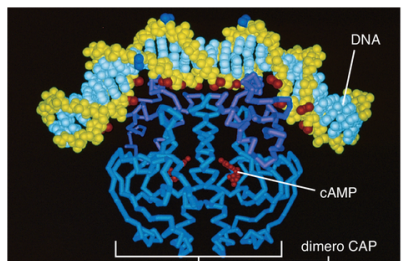


FIGURA 14-6 Il legame della proteina CAP al DNA

Questa immagine generata al computer illustra la curvatura nella doppia elica del DNA quando lega la proteina CAP. CAP è un dimero costituito da due catene polipeptidiche identiche, ognuna delle quali si lega ad una molecola di cAMP.

TABELLA 14-1 Il controllo trascrizionale nei batteri*

* La descrizione generale di ciascun tipo di regolazione è seguita da un esempio specifico.

Controllo negativo	Risultati
Geni inducibili	
Solo proteina repressore Repressore lattosio da solo	Il repressore attivo disattiva i geni regolati L'operone lattosio non è trascritto
Proteina repressore + induttore Repressore lattosio + allolattosio	Il complesso repressore inattivo-induttore non riesce a disattivare i geni regolati L'operone lattosio è trascritto
Geni reprimibili	
Solo proteina repressore Repressore triptofano da solo	Il repressore inattivo non riesce a disattivare i geni regolati L'operone triptofano è trascritto
Proteina repressore + corepressore Repressore triptofano + triptofano	Il complesso repressore attivo-corepressore disattiva i geni regolati L'operone triptofano non è trascritto
Controllo positivo	Risultati
Solo proteina attivatore CAP da sola	Il solo attivatore non può promuovere la trascrizione dei geni regolati La trascrizione dell'operone lattosio non viene attivata
Complesso attivatore CAP + cAMP	Il complesso attivatore funzionale stimola la trascrizione dei geni regolati La trascrizione dell'operone lattosio viene attivata

* La descrizione generale di ciascun tipo di regolazione è seguita da un esempio specifico.

Verifica

- Qual è la funzione di ciascun componente dell'operone lattosio (promotore, operatore e geni strutturali)?
- Quali sono le caratteristiche strutturali comuni agli operoni lattosio e triptofano?
- Perché gli scienziati definiscono l'operone trp reprimibile e l'operone lac inducibile?
- In che modo il glucosio è coinvolto nel controllo positivo dell'operone lattosio?

14.3 LA REGOLAZIONE GENICA NELLE CELLULE EUCARIOTE

OBIETTIVO DI APPRENDIMENTO

6. Par Tracciare la struttura di un tipico gene eucariotico e le sequenze di DNA coinvolte nella sua regolazione.
7. Fornire qualche esempio delle modalità con cui alcune proteine eucariotiche si legano al DNA.
8. Illustrare come un cambiamento della struttura cromosomica possa modificare l'attività di un gene.
9. Spiegare in che modo, in un organismo pluricellulare, uno stesso gene può dare origine a prodotti diversi in tipi cellulari diversi.
10. Identificare i principali tipi di regolazione che possono essere utilizzati negli eucarioti dopo la formazione dell'mRNA maturo.

Come le cellule batteriche, anche le cellule eucariotiche devono rispondere ai cambiamenti dell'ambiente. Inoltre, gli eucarioti pluricellulari richiedono sistemi di regolazione addizionali che permettano alle singole cellule di differenziarsi nei propri ruoli specifici e a gruppi di cellule di organizzarsi in tessuti ed organi. Ciò è realizzato principalmente mediante la regolazione trascrizionale, ma anche i controlli post-trascrizionali (traduzionale e post-traduzionale) sono importanti. Nei Capitoli 12 e 13 , si è detto che tutti gli aspetti del trasferimento di informazioni — incluse la replicazione, la trascrizione e la traduzione — sono più complessi

nelle cellule eucariotiche e, come atteso, questa maggiore complessità offre ulteriori opportunità per il controllo dell'espressione genica.

A differenza di molti geni procariotici, i geni eucariotici non costituiscono solitamente sistemi del tipo degli operoni. (Un'eccezione degna di considerazione è rappresentata dai nematodi, o vermi cilindrici, nei quali alcuni geni sono organizzati in operoni). Tuttavia, ciascun gene eucariotico presenta specifiche sequenze di regolazione essenziali al controllo della sua trascrizione.

Molti degli enzimi necessari a tutte le cellule, detti "housekeeping" o di mantenimento, sono codificati da geni costitutivi che vengono sempre espressi. Altri, che sono codificati da geni inducibili, vengono espressi solo in risposta ad alterazioni ambientali quali, per esempio, l'ingestione di metalli pesanti, l'infezione virale o lo shock termico. Per esempio, quando una cellula è esposta ad alte temperature, molte proteine hanno difficoltà ad assumere la corretta conformazione (folding). La presenza di proteine con conformazione non corretta induce una risposta di sopravvivenza, costituita dall'induzione della trascrizione di geni noti come heat-shock e dalla conseguente produzione delle corrispondenti proteine. Benché la funzione della maggior parte delle proteine heat-shock non sia nota, alcune di esse funzionano da chaperoni molecolari, aiutando altre proteine a mantenere, o ad assumere, la corretta conformazione molecolare (vedi Capitoli 3 e 13).

Alcuni geni, inoltre, sono inducibili solo in determinati periodi della vita dell'organismo e sembrano perciò controllati da meccanismi di regolazione temporali. Infine, un certo numero di geni è sotto il controllo di meccanismi di regolazione tissutospecifici. Per esempio, un gene coinvolto nella produzione di un enzima particolare può essere regolato da un certo stimolo (ad es., un ormone) nel tessuto muscolare, da uno stimolo completamente diverso nelle cellule pancreatiche e da un terzo tipo di stimolo nelle cellule epatiche. Questi tipi di regolazione saranno considerati in maggior dettaglio nei Capitoli 17 e 49.

La FIGURA 14-7 riassume i meccanismi di regolazione dell'espressione genica negli eucarioti. Sarà utile farvi riferimento durante la lettura dei paragrafi seguenti.

Il controllo della trascrizione negli eucarioti avviene a molti livelli e da parte di molecole regolatrici differenti

In modo simile a ciò che avviene per i geni batterici, la maggior parte dei geni degli eucarioti pluricellulari è controllata a livello trascrizionale. Come verrà analizzato di seguito, nel controllo trascrizionale rivestono un importante ruolo differenti sequenze di basi del DNA. Inoltre, la velocità di trascrizione è influenzata da proteine regolatrici e dal modo nel quale il DNA è organizzato nei cromosomi.

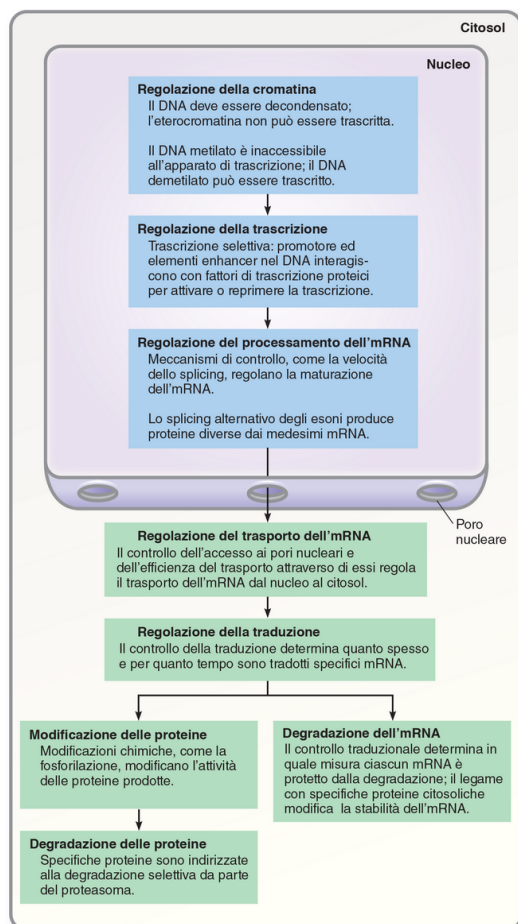


FIGURA 14-7

Regolazione genica nelle cellule eucariotiche

L'organizzazione del cromosoma influenza l'espressione di alcuni geni

Un cromosoma non è un semplice contenitore di geni. Vari riarrangiamenti nell'ordine dei suoi componenti possono portare ad un aumento o ad una diminuzione della velocità di espressione dei geni in esso contenuti. La Figura 10-4 mostra l'organizzazione di un cromosoma eucariotico. Negli eucarioti pluricellulari, solo un piccolo sottoinsieme dei geni presenti in una cellula è attivo in ogni momento. I geni inattivi differiscono fra i vari tipi cellulari e in molti casi sembrano essere irreversibilmente quiescenti.

Alcuni dei geni inattivi sono associati alla cromatina altamente condensata, che corrisponde alle regioni densamente colorate dei cromosomi durante la divisione cellulare. Queste regioni di cromatina rimangono estremamente condensate e legate a proteine cromosomiche in ogni momento del ciclo cellulare; anche durante l'interfase, sono visibili come fibre di colore scuro chiamate eterocromatina (FIG. 14-8a). Esistono numerose prove che suggeriscono che la maggior parte del DNA dell'eterocromatina non venga trascritto; per esempio, quando uno dei due cromosomi X viene inattivato nelle cellule delle femmine di mammifero, la maggior parte del cromosoma X inattivo diventa eterocromatico ed è visibile come **corpo di Barr** (vedi Fig. 11-16).

I geni attivi, invece, sono associati alla cromatina più lassamente organizzata, chiamata eucromatina (FIG. 14-8b). Il DNA dell'eucromatina, essendo esposto, è in grado di