

Genetica dei procari 2

L'espressione, la regolazione e la ricombinazione genica.

INDICE

In copertina

Ricombinazione nei batteri gram-negativi.

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_uptake_by_Gram-negative_bacteria.jpg

[Introduzione](#)

[I geni nei procarioti: geni essenziali, geni costitutivi e regolati](#)

[Dal gene al prodotto genico: sintesi proteica e sintesi degli RNA](#)

[La regolazione genica](#)

[La regolazione genica: procarioti vs eucarioti](#)

[La ricombinazione genica](#)

[Author credits](#)

[Sitografia](#)

Introduzione

BioTechnologySanitarie.it

Introduzione

Questa presentazione prosegue e completa quanto è stato già affrontato in “[Genetica dei procarioti. Parte prima](#)” dedicata allo studio del genoma dei batteri e delle principali modalità di replicazione del loro DNA.

In questa presentazione, invece, ci occuperemo di espressione genica e della sua regolazione e di ricombinazione genica.

Introduzione

N.B.

Dal momento che nei procarioti sono compresi i regni dei Batteri e degli Archeobatteri, in questa presentazione verrà utilizzato il termine batterio per indicare genericamente un procariote quando non è necessario distinguere tra gli appartenenti ai due regni. In caso contrario si specificherà l'appartenenza ai Batteri o agli Archeobatteri.

Introduzione: prerequisiti

Per una piena comprensione di questa parte della genetica batterica è necessario conoscere:

- tutti gli argomenti affrontati nella presentazione precedente;
- il codice genetico;
- lo schema generale della sintesi proteica perché in questo contesto verranno forniti ulteriori dettagli, tipici dei procarioti, e quindi bisogna avere le idee chiare sul processo.

I geni nei procarioti: geni essenziali, geni costitutivi e regolati

BioTechnologySapienza.it

I geni nei procarioti: che cos'è un gene?

Prima di tutto dobbiamo definire **cos'è un gene**.

Grazie ad una lunga serie di straordinari esperimenti effettuati nel secolo passato sono stati elaborati diversi assiomi. Eccoli in sequenza cronologica:

- un gene → un enzima;
- un gene → una proteina;
- un gene → un polipeptide e un gene → una molecola di RNA con importanti funzioni che non sono coinvolte nella sintesi proteica.

I geni nei procarioti: che cos'è un gene?

Il primo assioma “un gene \rightarrow un enzima” si è visto subito che era troppo limitato. In fondo gli enzimi sono proteine.

Con lo sviluppo delle conoscenze sulle proteine anche il secondo è stato superato. Ci sono proteine formate da più catene polipeptidiche che hanno le informazioni necessarie alla loro sintesi localizzate su geni diversi.

E si è passati così a “un gene \rightarrow un polipeptide”. Chi si aspettava che questa fosse la risposta definitiva è rimasto deluso quando si è avuta la certezza che nel DNA sono contenute addirittura le informazioni per la sintesi delle molecole di RNA.

I geni nei procarioti: che cos'è un gene?

E stiamo parlando di molecole di RNA non coinvolte nella sintesi proteica, quindi quelle strutturali o catalitiche (queste ultime sono impiegate come enzimi e ne parleremo tra poco).

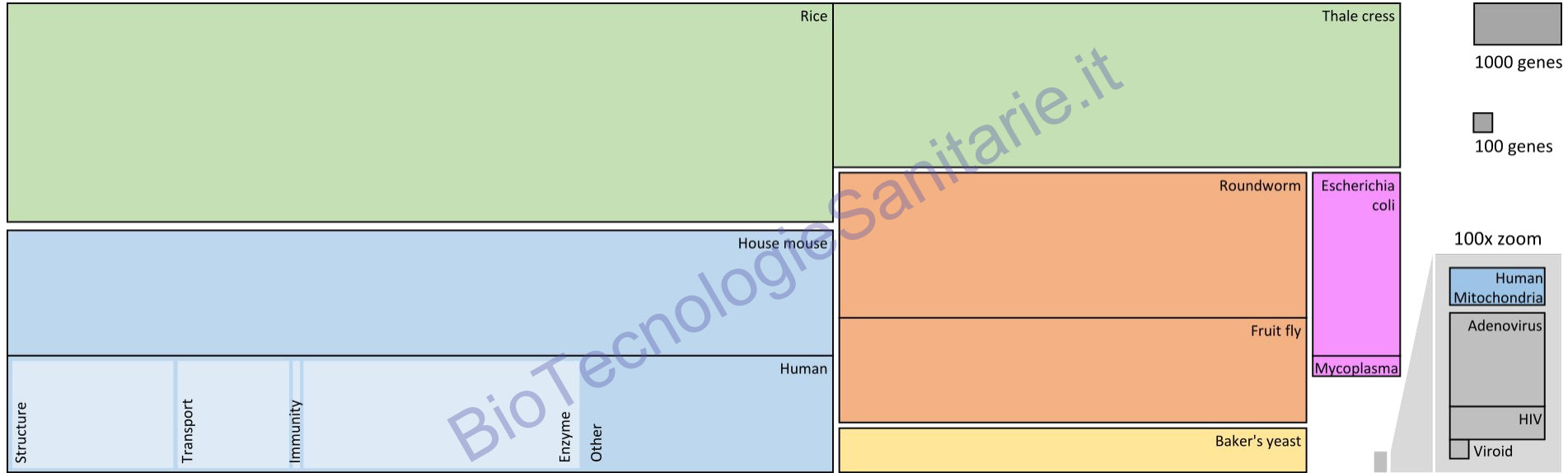
In conclusione potremmo allora definire il gene come una sequenza di basi azotate, più o meno lunga, che codifica la sequenza primaria di un **polipeptide** oppure di un **RNA non direttamente coinvolto con la sintesi proteica**.

Questa definizione vale per i procarioti e gli eucarioti.

Ma quanti sono i geni in una cellula batterica?

I geni nei procarioti: quanti sono?

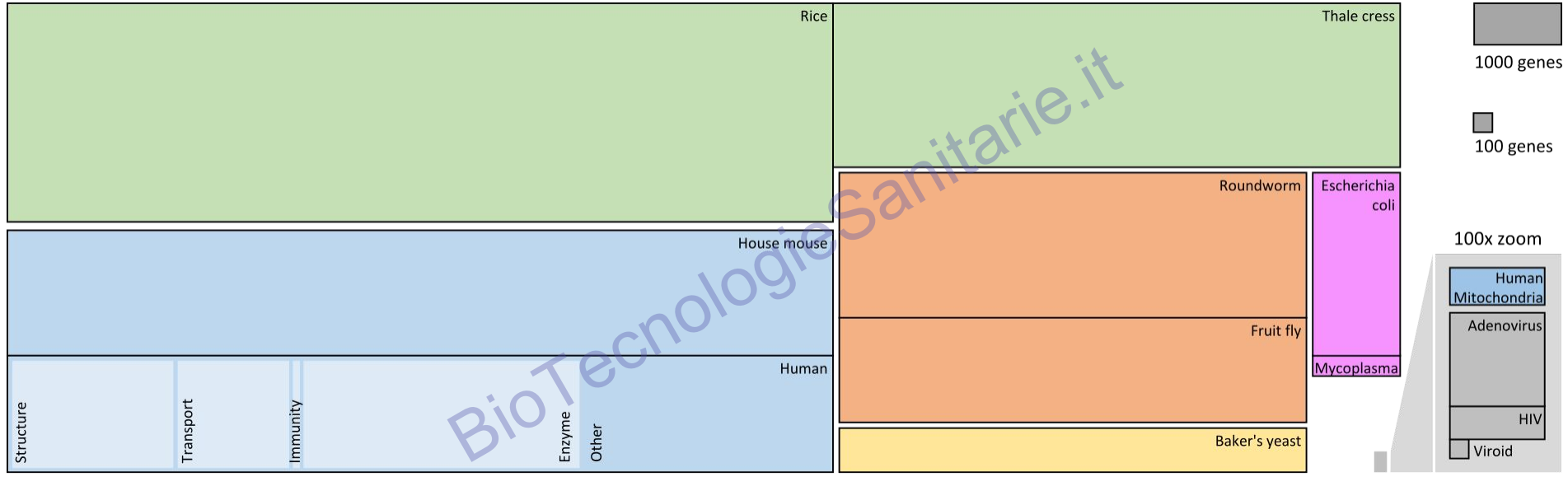
1



Conosciamo già i paradossi della genomica e il fatto che la complessità di un organismo vivente non è affatto correlata al numero di geni. Diventa utile in questo contesto ritornare sui nostri passi e dare un'occhiata a questa immagine.

I geni nei procarioti: quanti sono?

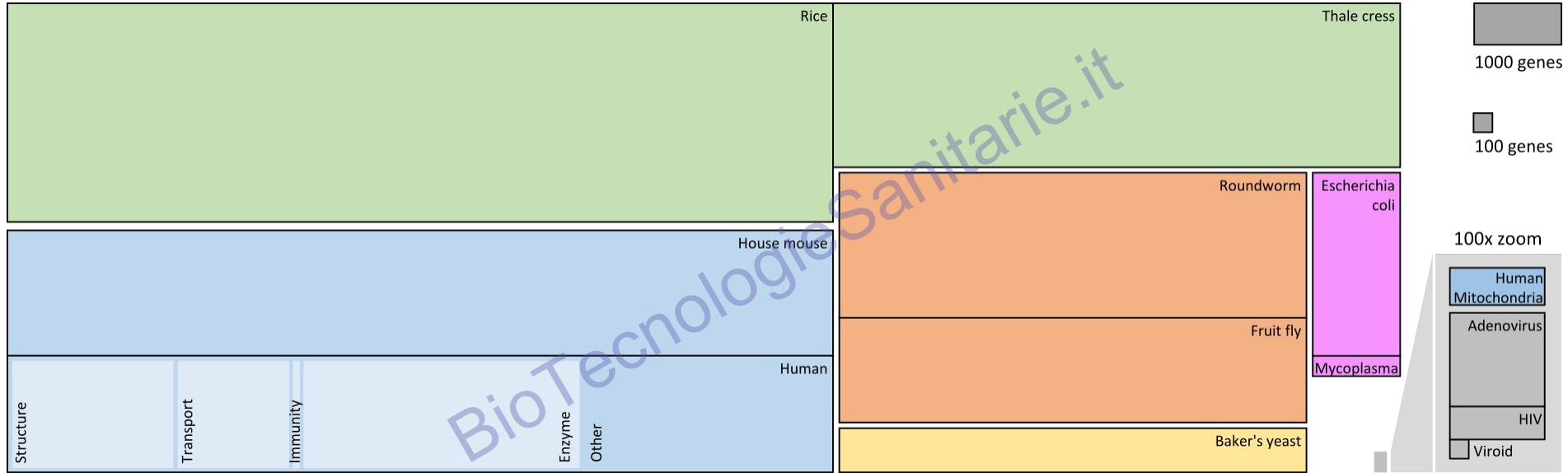
1



La figura 1 indica la quantità di geni in organismi rappresentativi delle piante (verde), dei vertebrati (azzurro), degli invertebrati (arancione), dei funghi (giallo), dei batteri (magenta) e dei virus (grigio).

I geni nei procarioti: quanti sono?

1



Non ha importanza il numero ma la quantità di geni, rappresentata dall'estensione dell'area dei rettangoli. Per quanto riguarda invece il numero, recenti ricerche indicano nei batteri parassiti 500-1200 geni, nei batteri a vita libera 1500-7500 geni e negli archaea 1500-2700 geni.

I geni nei procarioti: i geni di E. coli

Ora prendiamo in considerazione il nostro modello, *Escherichia coli*, di cui conosciamo la grandezza del cromosoma, **4,64 Mb**: in questa sequenza di basi azotate ci sono le informazioni per 4288 proteine (circa l'88% dell'intera sequenza), 7 operoni (lo analizzeremo a breve) per l'RNA ribosomiale e 86 geni per l'RNA di trasporto.

Attenzione! Quando si danno questi risultati **bisogna essere molto precisi**. I dati sono quelli pubblicati nel 1997 e si riferiscono al ceppo di laboratorio K-12 derivato a sua volta dal ceppo MG1655.

I geni nei procarioti: i geni di E. coli

Ormai sono diverse centinaia i genomi di ceppi di Escherichia coli completamente sequenziati e depositati nelle banche dati. Il batterio continua ad evolvere anche grazie alla trasmissione orizzontale dei geni e a mutazioni. Quindi è necessario precisare di quale ceppo stiamo parlando.

Tornando al ceppo K-12, sullo stesso è stata osservata un'alta densità genica (la distanza media tra due geni è pari solo a 118 paia di basi). Inoltre è stato descritto un numero significativo di elementi genetici trasponibili, elementi ripetuti, profagi criptici e resti di batteriofagi.

I geni nei procarioti: profagi criptici

Conosciamo già cosa sono gli elementi trasponibili e possiamo immaginare facilmente che gli elementi ripetuti si riferiscano a sequenze di basi azotate ripetute. Ma cosa sono i profagi criptici? I fagi o batteriofagi sono i virus che infettano i batteri. Il ciclo litico e lisogeno dovrebbe essere già noto. Nel secondo caso il virus integra il proprio genoma direttamente nel cromosoma batterico oppure si aggrega come plasmide. Si parla in ambedue i casi di **profagi**. I profagi, esattamente come qualsiasi porzione di DNA, possono essere soggetti a mutazioni; se la mutazione coinvolge i geni necessari per lo sviluppo del ciclo litico, di fatto impedendolo, vengono chiamati **criptici**.

I geni nei procarioti: geni essenziali

La descrizione appena data e soprattutto l'integrazione tra genomi di specie diverse e di organismi di regni diversi non deve stupire. Uno studio del 2015 ha scoperto 150 geni di batteri nel genoma umano, trasmessi sempre col meccanismo orizzontale. Visto il numero di specie microbiche ospitate nel nostro intestino, il numero è destinato a crescere.

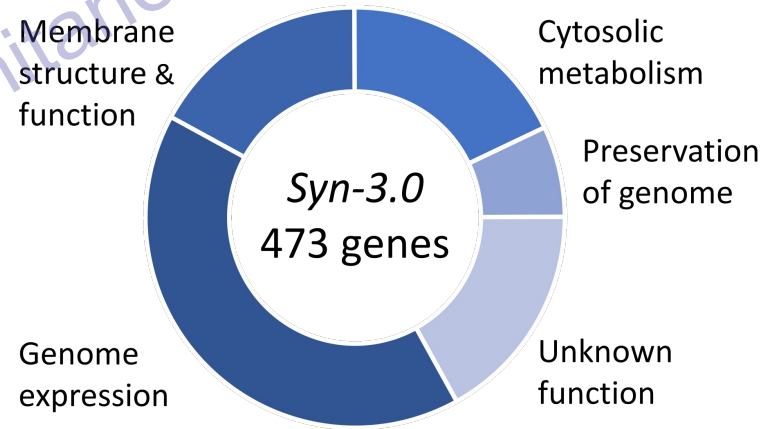
Torniamo ancora ad E. coli. Sono tutti necessari i 4288 geni che codificano per proteine e tutti gli altri? varrebbe la pena farsi la stessa domanda per tutti i genomi. La domanda è di grande interesse per tanti campi di ricerca ma soprattutto per la creazione di organismi sintetici.

I geni nei procarioti: geni essenziali

Stiamo parlando di **geni essenziali**, quelli indispensabili per far sopravvivere un organismo.

È stato calcolato che in *E. coli* e *Bacillus subtilis* (bacillo gram-positivo - phylum Firmicutes presente nel suolo) questi geni sono 250-400 e nella metà dei casi sono coinvolti nella sintesi di proteine.

La figura 19 mostra il genoma minimo di un **ceppo di batterio sintetico (Syn-3.0)** creato a partire dalle conoscenze di *Mycoplasma genitalium*.



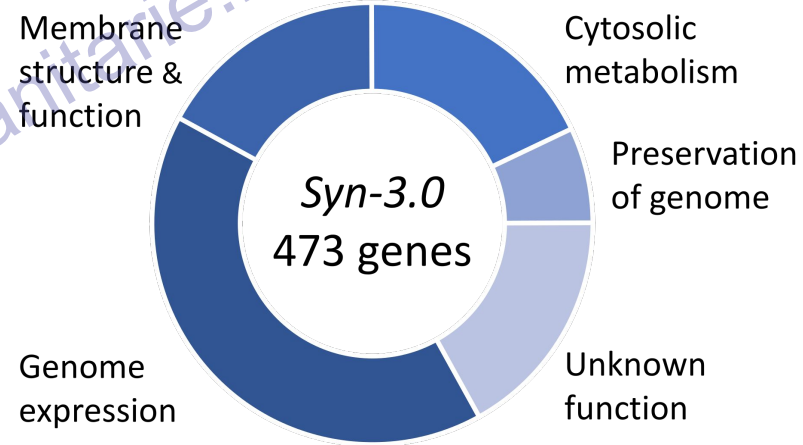
2

I geni nei procarioti: geni essenziali

Dalla conoscenza del genoma del batterio e di altre specie sono stati scelti i **geni ritenuti essenziali** le cui funzioni sono descritte molto bene dal diagramma.

Syn-3.0 è stato presentato alla comunità scientifica nel marzo del 2016 e rappresenta un grande passo in avanti per lo sviluppo della vita artificiale.

La genetica in genere e la genetica microbica in particolare sono campi di ricerca fondamentali al giorno d'oggi e sono strettamente legati alle biotecnologie.



2

I geni nei procarioti: geni costitutivi e regolati

Ora, al di là dei geni essenziali che garantiscono la sopravvivenza e della loro utilità nel campo della ricerca, i geni dei procarioti sono suddivisi in due grandi gruppi.

- **Geni costitutivi** o **housekeeping**: sono sempre attivi perché necessari per processi metabolici come la produzione di energia o la sintesi di biomolecole essenziali.
- **Geni regolati**: sono chiamati in questo modo perché vengono attivati solo quando si rende necessario il loro prodotto; tutto ciò è legato essenzialmente al risparmio energetico.

I geni nei procarioti: facciamo il punto!

In conclusione si può dire che:

1. il prodotto genico è una proteina o una molecola di RNA
2. non tutti i geni sono attivi nello stesso momento e non tutti vengono “sfruttati” nello stesso modo.

Il punto 1 ci riporta al processo della **sintesi proteica** che dobbiamo rispolverare per capire come funziona nel dettaglio in una cellula procariote e alla **sintesi degli RNA** (mRNA, rRNA, tRNA) che è il risultato della sola trascrizione.

Il punto 2 riguarda la **regolazione genica** che verrà affrontata subito dopo.

Dal gene al prodotto genico: sintesi proteica e sintesi degli RNA

BioTechnology's Sanitarie.it

La sintesi proteica

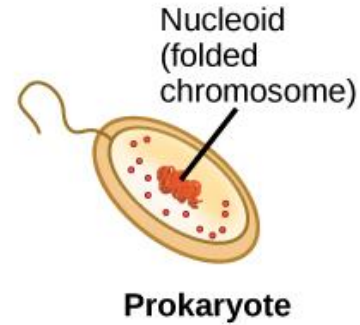
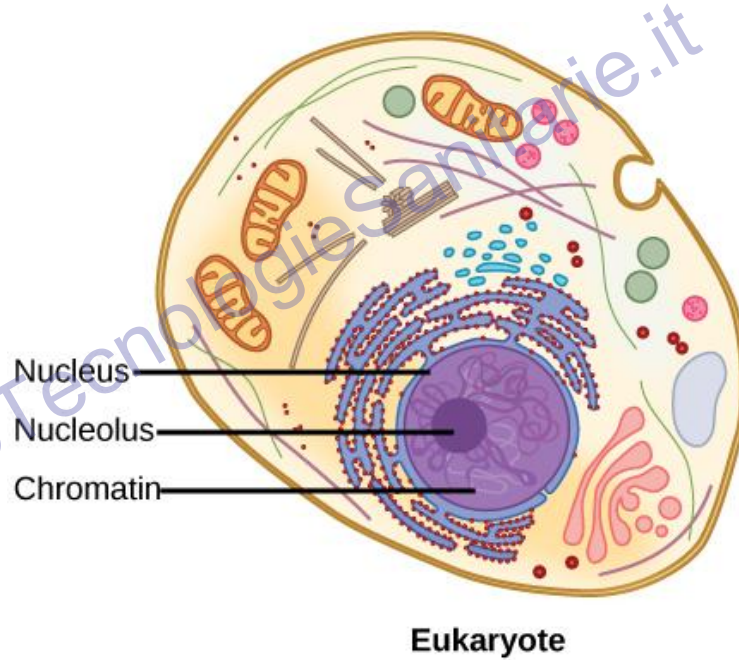
Esamineremo la sintesi proteica fase per fase paragonando ciò che succede nella cellula eucariote e nella cellula procariote.

In genere a questo punto degli studi è noto lo schema del processo nella cellula eucariote. Si sa che si articola in due fasi: **trascrizione** e **traduzione**.

- **① Trascrizione**: serve per copiare l'informazione contenuta nel DNA in una molecole di RNA messaggero che la trasferisce nella sede della sintesi della proteina, cioè il ribosoma.
- **② Traduzione**: decodifica il messaggio in codice. In altre parole trasforma la sequenza di basi azotate dell'RNA nella corretta sequenza di amminoacidi della proteina.

La sintesi proteica: trascrizione

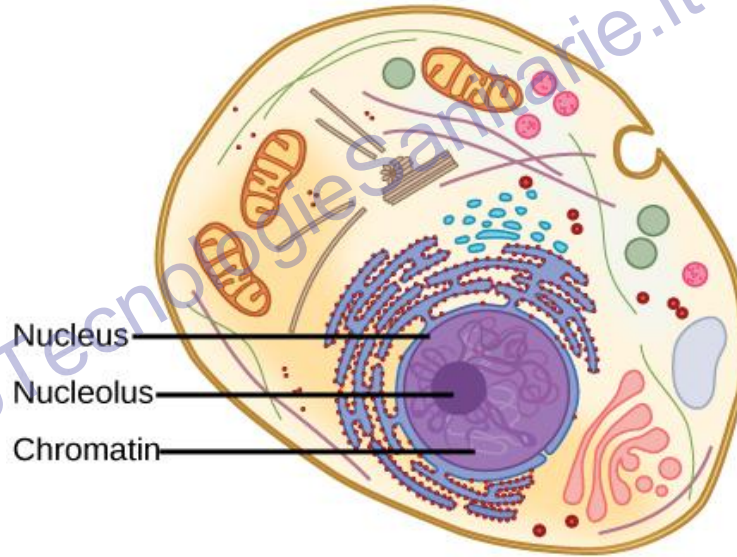
Trascrizione Procediamo per ordine. Le differenze sono numerose e derivano prima di tutto dalla struttura delle due cellule. Mentre nella cellula eucariote l'RNA messaggero deve passare dal nucleo al citoplasma, nella cellula procariote questo non è necessario. Il nucleoide è immerso nel citoplasma.



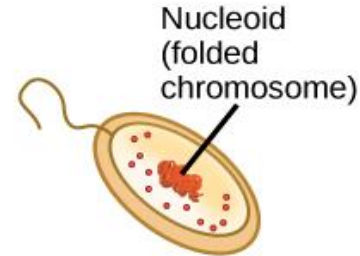
3

La sintesi proteica: trascrizione

Trascrizione Quindi trascrizione e traduzione nella cellula eucariote sono discontinui perché avvengono in spazi e quindi in tempi diversi. Nella cellula procariote il processo è continuo perché entrambi si svolgono nel citoplasma. In altre parole non c'è la necessità di tempi diversi perché l'mRNA si trova già in prossimità dei ribosomi.



Eukaryote



Prokaryote

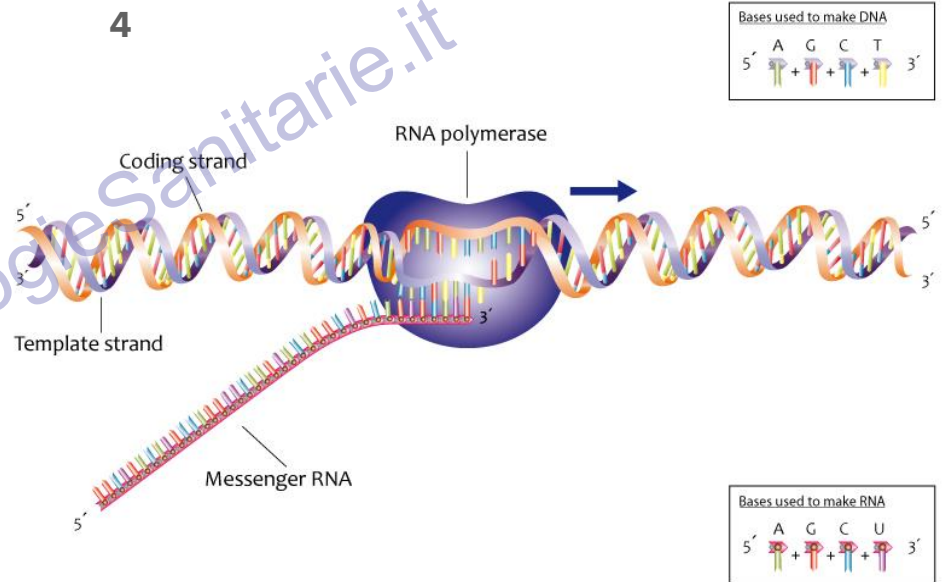
La sintesi proteica: trascrizione

Trascrizione. L'enzima che si incarica della trascrizione è una **RNA polimerasi** che copia la sequenza specifica delle basi azotate di un filamento del DNA (**filamento stampo** - template strand).

L'altro filamento viene chiamato **filamento non stampo** (quindi codificante - coding strand).

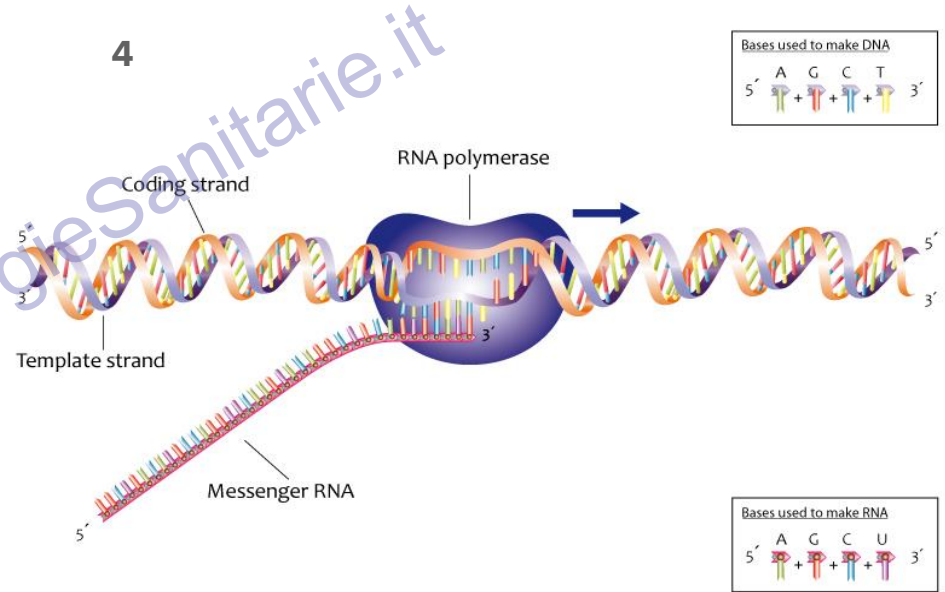
La RNA polimerasi, come la DNA polimerasi, lavora in **direzione 5'-3'** aggiungendo nucleotidi all'estremità 3'.

A differenza però della DNA polimerasi non ha bisogno di un primer.



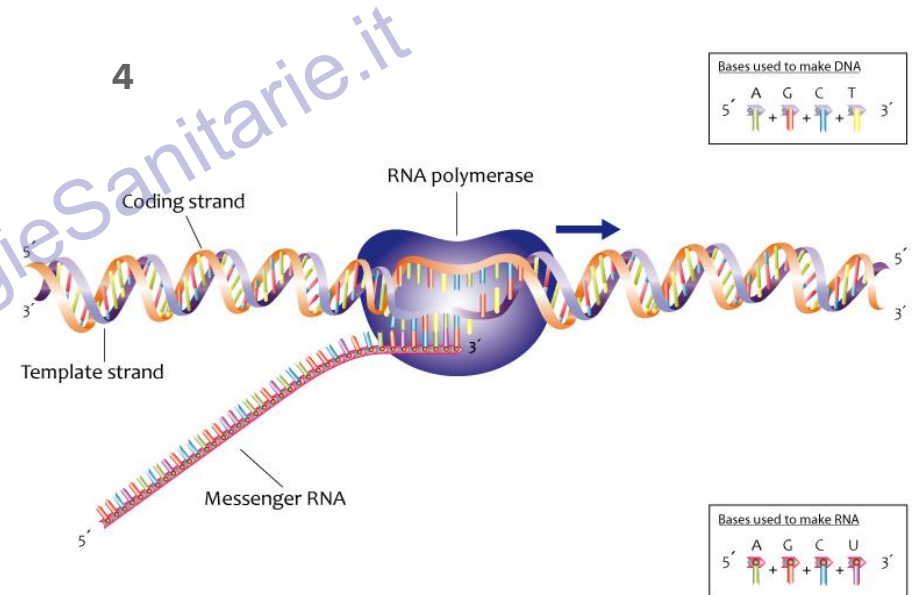
La sintesi proteica: trascrizione

Trascrizione. Nello schema operativo della RNA polimerasi niente di diverso tra eucarioti e procarioti. La differenza sta nel fatto che **nei procarioti la RNA polimerasi è una sola.** Lo stesso enzima si incarica di sintetizzare l'mRNA ma anche altri RNA tra cui ad esempio quello che dà vita ai ribosomi. Invece **negli eucarioti ci sono 3 RNA polimerasi.** Quella che si incarica della sintesi dell'mRNA è la RNA polimerasi II. Le altre due trascrivono RNA non coinvolti direttamente nella sintesi proteica.



La sintesi proteica: trascrizione

Trascrizione. La trascrizione viene distinta in tutti gli esseri viventi in tre fasi: inizio, allungamento e terminazione. L'obiettivo, come sappiamo, è quello di sintetizzare una molecola di mRNA complementare al filamento stampo e quindi uguale al filamento codificante. La molecola di mRNA però nei procarioti non contiene un solo gene ma più geni che costituiscono il cosiddetto **operone**. **L'operone è un insieme di geni che collaborano tra di loro per produrre una proteina o un prodotto genico sotto il controllo di uno stesso promotore.** Lo esamineremo tra qualche slide.



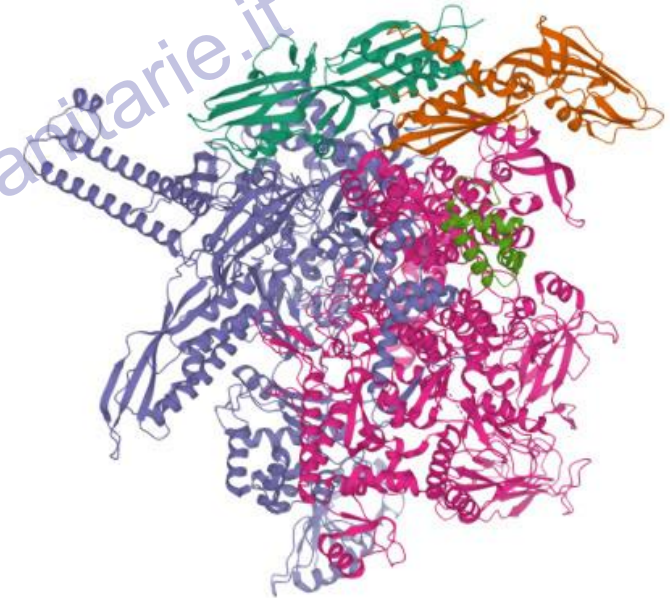
La sintesi proteica: trascrizione

Trascrizione.

La RNA polimerasi è un enzima, quindi una proteina, formata da diverse subunità. Nell'immagine di lato, scaricata dal portale [PDB](#) (Protein Data Base), è rappresentata la ricostruzione al microscopio elettronico della RNA polimerasi di *Escherichia coli* K-12.

Ogni subunità è stata colorata in modo diverso.

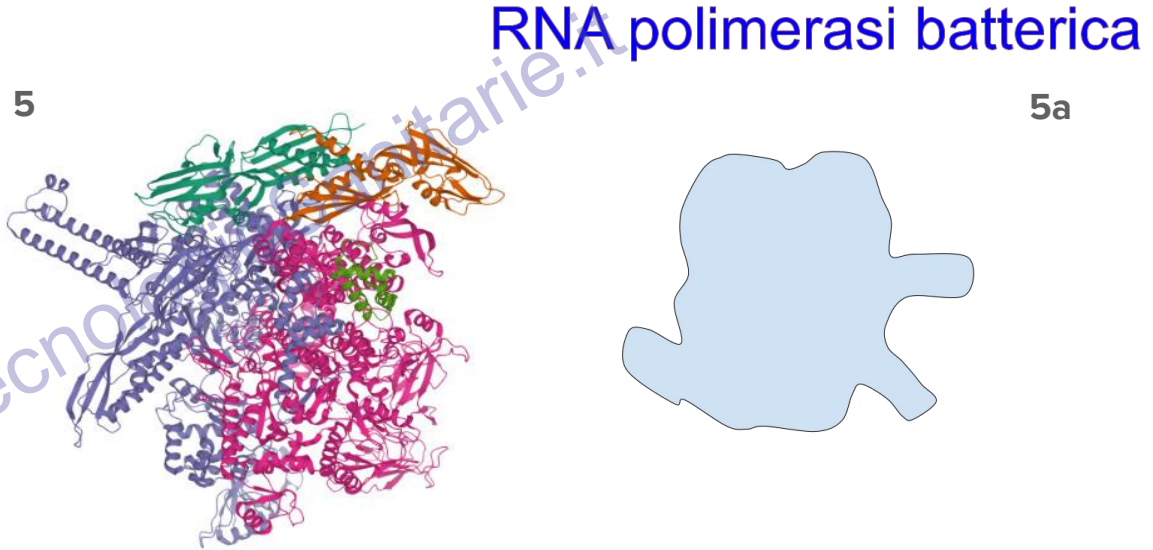
Sono ben evidenti le strutture secondarie a foglietto β pieghettato e ad α elica.



La sintesi proteica: trascrizione

Trascrizione.

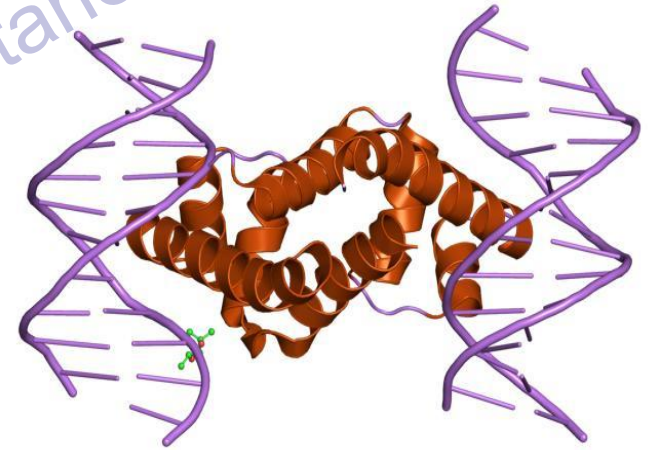
A fianco dell'immagine scaricata dalla piattaforma [PDB](#) c'è la riproduzione schematica dell'RNA polimerasi in forma inattiva che ci accompagnerà durante la spiegazione. È orientata in modo diverso perché già posizionata rispetto al suo funzionamento, come vedremo nelle prossime slide.



La sintesi proteica: trascrizione

Trascrizione.

Perché la RNA polimerasi possa iniziare la sua funzione di trascrizione è necessario che si leghi al **fattore sigma** (σ). Grazie a questo legame può riconoscere specifiche sequenze di legame sul DNA (il promotore). È questo il primo passo della trascrizione. In *Escherichia coli* sono stati individuati 7 fattori sigma; ecco spiegato il motivo del numero 70 nella didascalia del disegno di lato. Il fattore σ 70 regola l'espressione della maggior parte dei geni; gli altri regolano il metabolismo dell'azoto, il movimento dei flagelli o i geni espressi per rispondere agli stress esterni al batterio compresa l'esposizione al calore ...

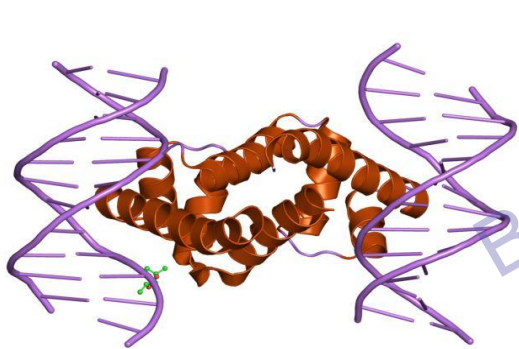


Fattore sigma 70 in *E. coli* legato alla sua posizione (-35) sul DNA. Non viene rappresentata la RNA polimerasi

La sintesi proteica: trascrizione

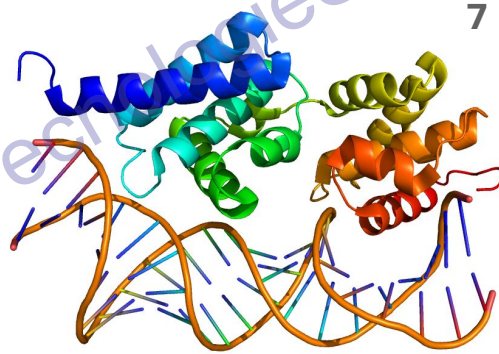
Trascrizione.

Il fattore sigma ha il suo omologo nel fattore B negli Archaea e nel fattore σ_{70} negli eucarioti. Le somiglianze sono maggiori tra gli ultimi due fattori citati, il che non costituisce una sorpresa tenendo conto della linea evolutiva.



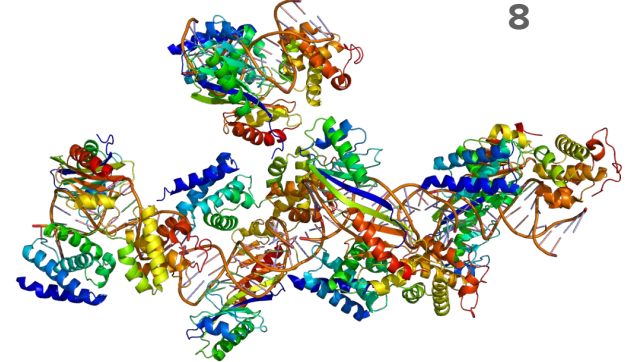
Fattore sigma **70** in *E. coli*

6



Fattore **B** negli Archaea

7



Fattore di trascrizione σ_{70} negli Eucarioti

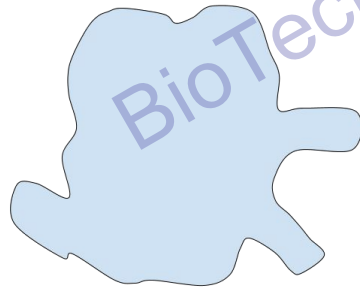
8

La sintesi proteica: trascrizione

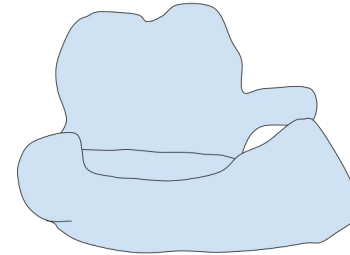
Trascrizione.

Ora torniamo all'inizio della trascrizione. Il fattore sigma si deve legare sia al DNA che alla RNA polimerasi. La RNA polimerasi, quindi, può essere in una forma inattiva (disegno a sinistra) oppure in una forma attiva quando è avvenuto il legame con il fattore sigma (disegno a destra).

RNA polimerasi batterica



RNA polimerasi attiva

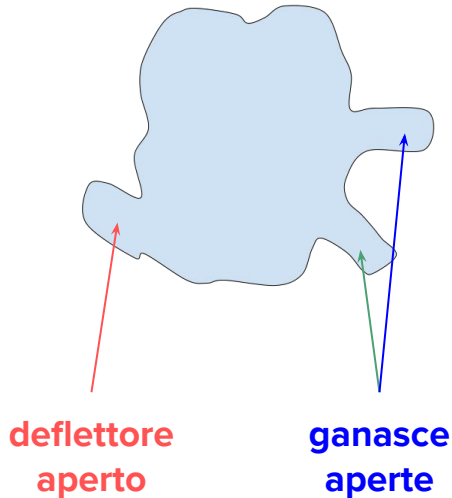


La sintesi proteica: trascrizione

① Trascrizione: inizio.

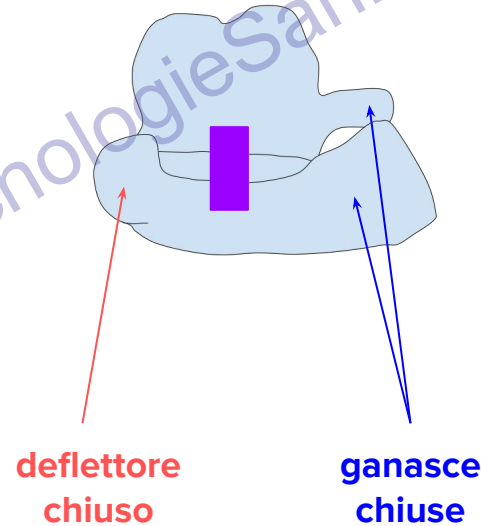
RNA polimerasi batterica

5a



RNA polimerasi attiva

5b



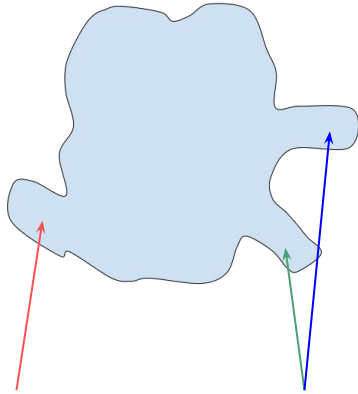
Come si può vedere dal disegno di lato alcune regioni della molecola di RNA polimerasi, dopo il legame con il fattore sigma e con il DNA, subiscono una modificazione nella conformazione che consente il bloccaggio all'acido nucleico. Per questo motivo vengono utilizzati termini tecnici adeguati (ganasce) per individuarle. Il fattore sigma è rappresentato dal rettangolo viola.

La sintesi proteica: trascrizione

① Trascrizione: inizio.

RNA polimerasi batterica

5a

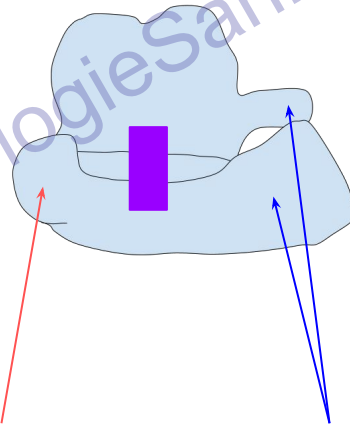


deflettore
aperto

ganasce
aperte

RNA polimerasi attiva

5b



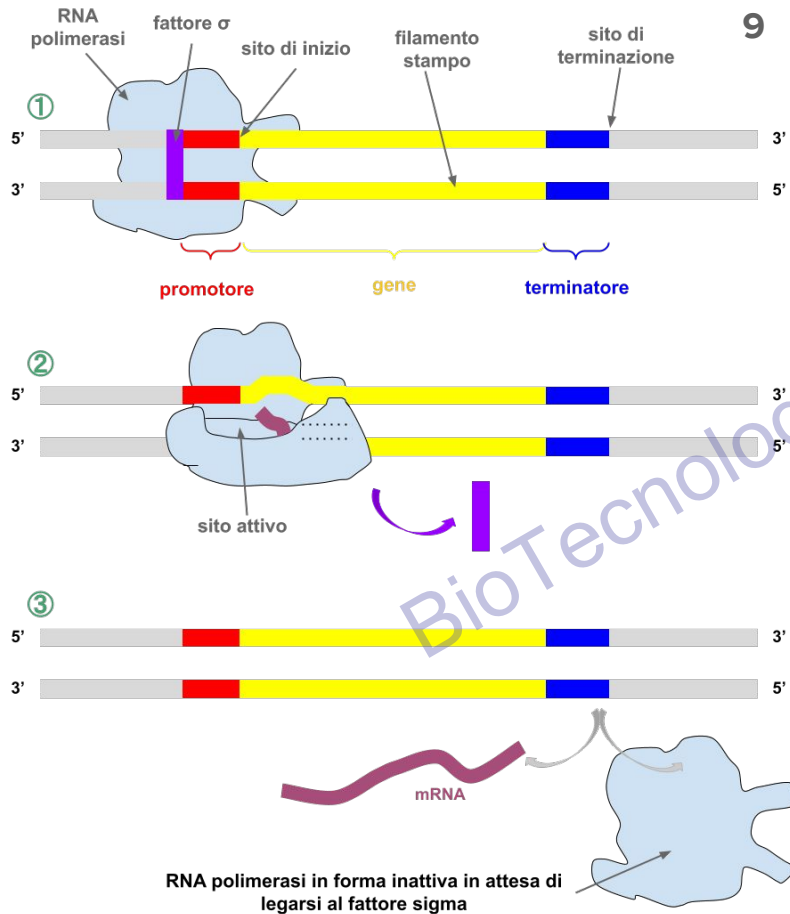
deflettore
chiuso

ganasce
chiuse

Il termine deflettore, invece, indica un dispositivo fisso o orientabile che ha la funzione di far deviare fasci luminosi, particelle cariche

In questo caso è strettamente associato al canale di uscita della molecola neosintetizzata di mRNA

Trascrizione nei procarioti

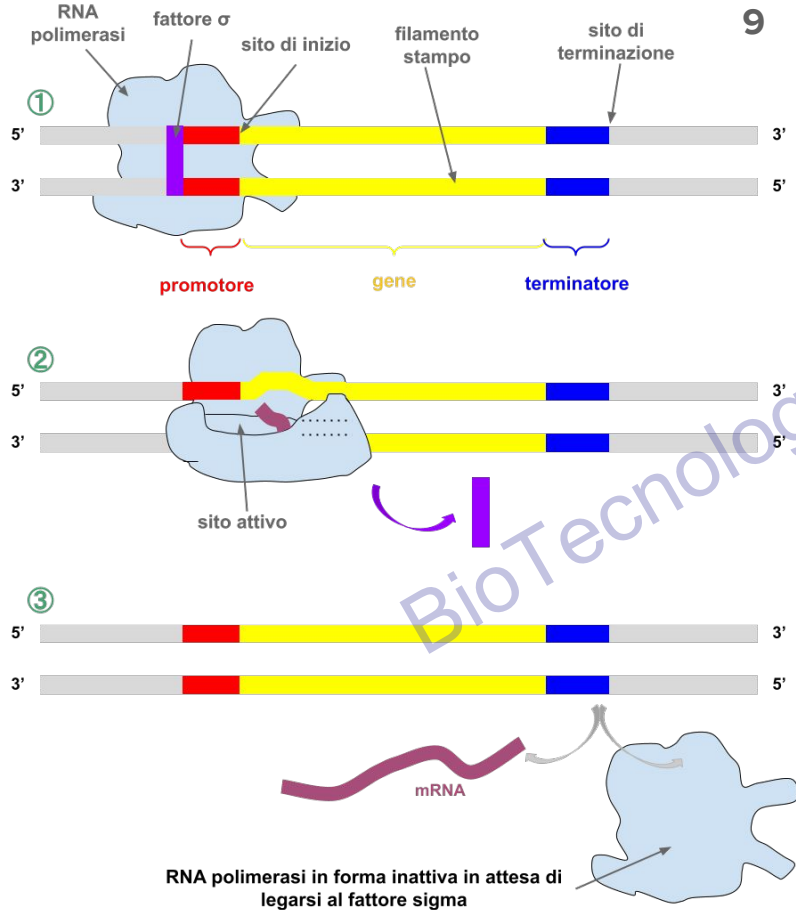


Trascrizione. ①

A questo punto siamo pronti per esaminare le varie fasi della trascrizione riportate nella figura 9. Con il numero ① indichiamo la fase di **inizio**.

Il primo a legarsi al DNA è il fattore σ che riconosce sequenze specifiche dell'acido nucleico nella regione -35 (TTGACA) e nella regione -10 (TATAAT). Siamo nell'area definita promotore (in rosso nel disegno). -35 e -10 indicano le posizioni delle basi azotate rispetto al sito di inizio, cioè il punto da cui inizia la trascrizione vera e propria.

Trascrizione nei procarioti

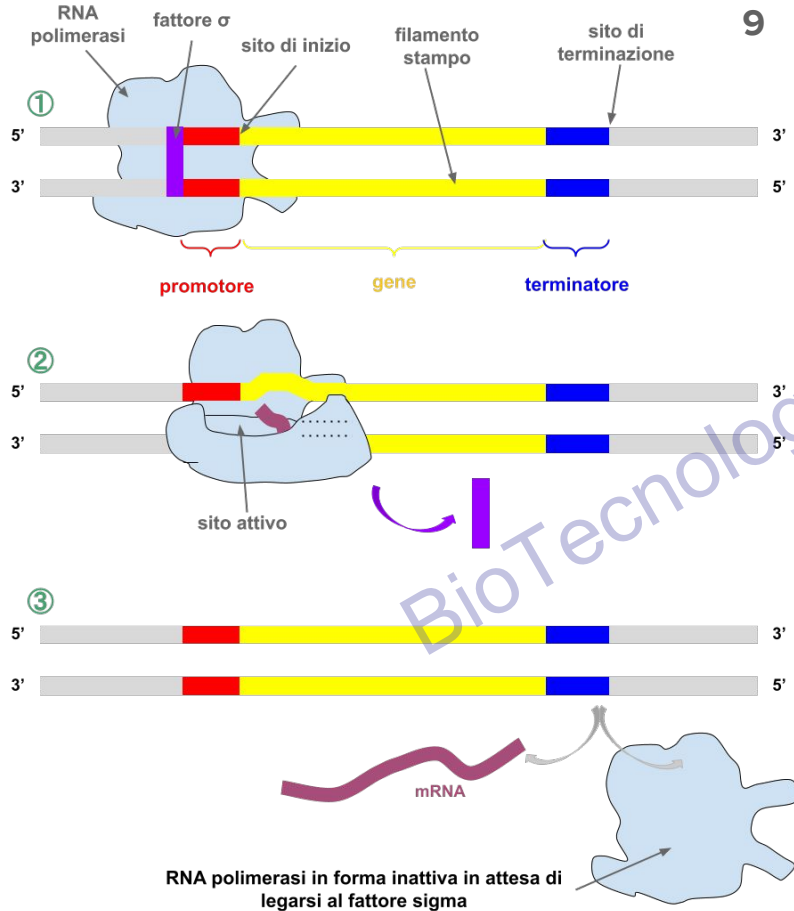


Trascrizione. ①

Completato il legame del fattore σ con la regione -35, al complesso neoformato si uniscono le subunità della RNA polimerasi. La RNA polimerasi acquisisce la conformazione attiva.

L'alta concentrazione di adenina-timina nella regione -10 favorisce lo svolgimento del DNA che, passando nell'occhiello tra le due ganasce, espone il filamento stampo alla RNA polimerasi. Il disegno è molto schematico per favorire la comprensione ma il DNA deve essere immaginato nella sua classica conformazione a doppia elica. Lo svolgimento del DNA avviene per azione della RNA polimerasi.

Trascrizione nei procarioti



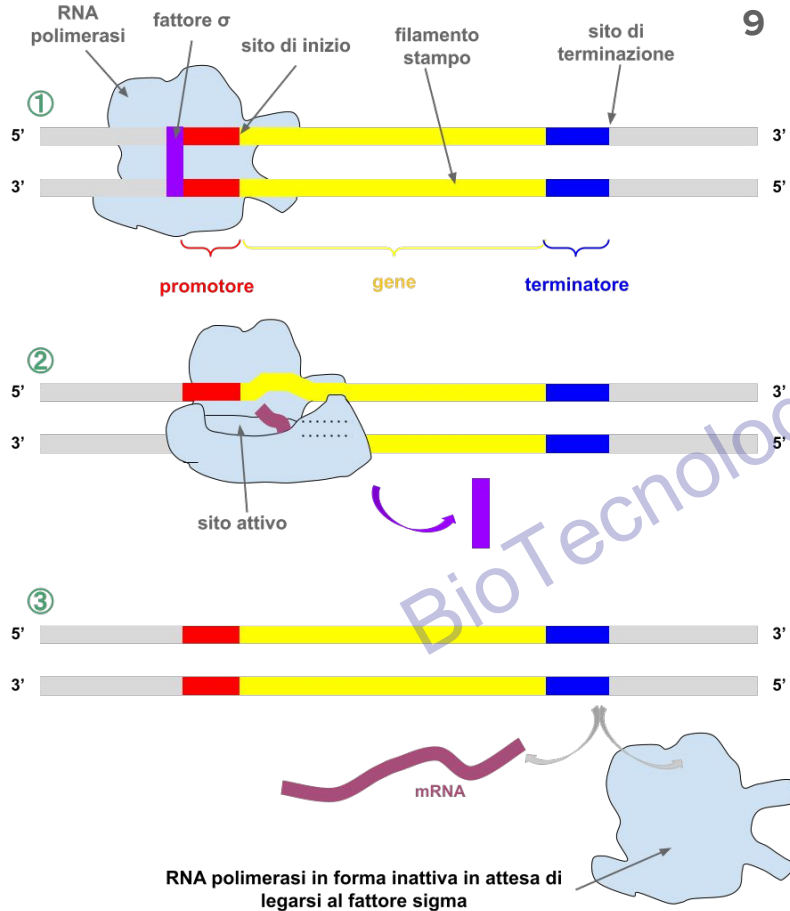
Trascrizione. ②

Nel DNA si forma la bolla di trascrizione che nel disegno è evidente solo per il filamento codificante in quanto la RNA polimerasi avvolge il DNA come una mano.

Siamo tra la fine della fase iniziale e l'inizio dell'**allungamento**.

La RNA polimerasi sintetizza una piccola sequenza di meno di 10 basi azotate (siamo ancora nella regione -10). Questa sequenza è spesso destinata ad abortire subito. L'operazione serve a stabilizzare la RNA polimerasi. Se la sequenza supera le 10 unità il fattore σ si stacca e la RNA polimerasi completa la sintesi dell'mRNA procedendo lungo il filamento stampo del DNA. Durante l'allungamento il DNA, svolto a formare la bolla, si riavvolge su se stesso a livello del deflettore.

Trascrizione nei procarioti



Trascrizione. ②

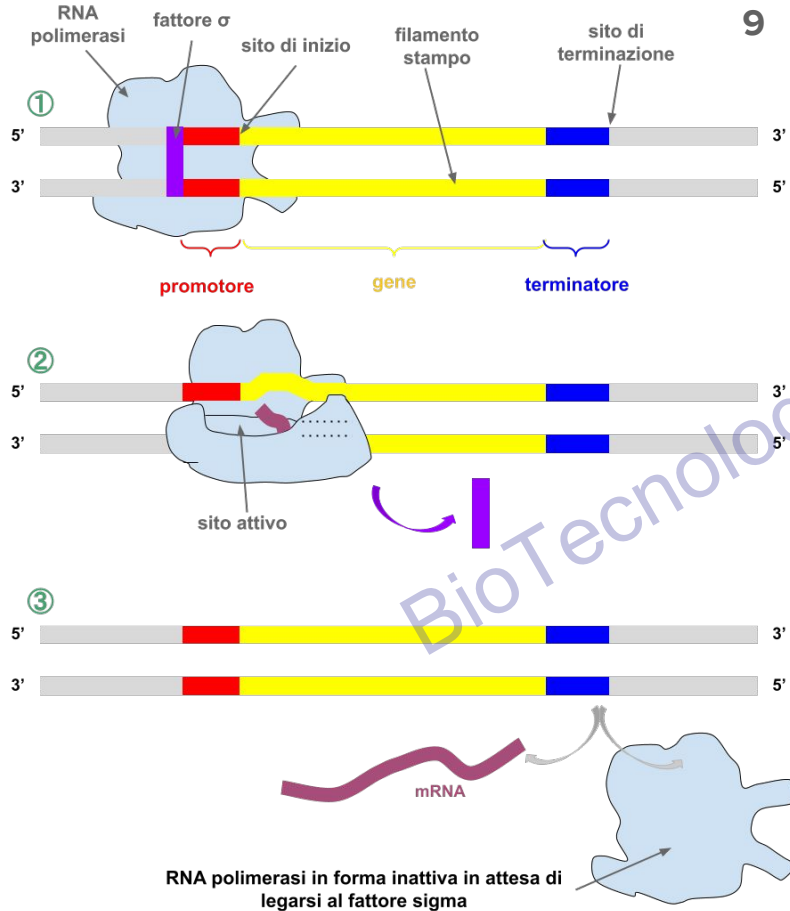
L'**allungamento** procede ad una velocità media di 50 nucleotidi al secondo. Si tratta di una media che tiene conto anche di eventuali pause.

Man mano che l'mRNA viene sintetizzato si dirige verso l'area del deflettore inserendosi in un apposito canale.

La stabilità del processo è notevole. Basti pensare che possono essere sintetizzate molecole di mRNA lunghe anche 10000 nucleotidi.

I nucleosidi trifosfato necessari per la sintesi dell'mRNA entrano nel complesso attraverso un canale che nell'immagine è stato raffigurato con linee tratteggiate.

Trascrizione nei procarioti



Trascrizione. ③

La **terminazione** si verifica quando la RNA polimerasi raggiunge specifiche sequenze del DNA (terminatore) poste nella regione indicata in blu nel disegno.

Vi sono due distinte modalità che non vengono qui riportate perché destinate ad uno studio più approfondito. Basti sapere che in ambedue i casi sono coinvolte diverse proteine che garantiscono la perfetta esecuzione del processo.

La sintesi proteica: trascrizione e antibiotici

Prima di proseguire nell'esame della sintesi proteica è bene fermarsi un momento e riflettere sull'importanza del processo molecolare di trascrizione. Le stesse considerazioni valgono anche per la traduzione. Quindi, la domanda è: perché è necessario conoscere e capire questo particolare argomento così come tanti altri di biologia molecolare a livello dei batteri?

La risposta è molto complessa perché riguarda numerosi argomenti spesso correlati tra di loro. Al di là dell'importanza del processo in sé (le proteine sono sia strutturali che funzionali), è essenziale per le applicazioni biotecnologiche.

La sintesi proteica: trascrizione e antibiotici

Se usiamo i batteri come laboratori per produrre proteine per l'uomo (per esempio l'insulina) non possiamo non conoscere quali molecole essi utilizzano nella sintesi proteica, in quali tempi e con quali modalità. Il loro processo è compatibile con quello umano? dobbiamo risolvere qualche problema? qualche risposta, peraltro limitata, la potremo dare quando affronteremo la regolazione genica, poco più avanti. Altro campo essenziale per la salute dell'uomo è la farmacologia e la medicina.

La sintesi proteica: trascrizione e antibiotici

Si sa che i farmaci che possono combattere i batteri patogeni sono gli **antibiotici**. Gli antibiotici hanno diversi meccanismi d'azione, cioè agiscono su un passaggio chimico di un preciso processo. In altre parole hanno un bersaglio molecolare. Possono inibire la sintesi della parete cellulare come la penicillina, oppure la sintesi di enzimi coinvolti nella replicazione del DNA come i chinoloni associati alla novobiocina o la sintesi proteica sia a livello di trascrizione che di traduzione.

In queste slide trattiamo gli antibiotici coinvolti nella trascrizione; più avanti ci sarà spazio per quelli che inibiscono la traduzione.

La sintesi proteica: trascrizione e antibiotici

La **rifampicina**, antibiotico che viene usato nel trattamento della tubercolosi, della lebbra o della legionellosi, agisce proprio sulla sintesi proteica dei batteri che inducono queste malattie.

Infatti la rifampicina inibisce l'inizio della trascrizione legandosi ad una delle subunità della RNA polimerasi, proprio quella destinata a formare i legami fosfodiesteri in quella piccola sequenza di mRNA che spesso abortisce. Agisce già a livello del secondo o terzo legame fosfodiesteri.

La mutazione della subunità della RNA polimerasi coinvolta è alla base quindi del fenomeno di resistenza alla rifampicina.

La sintesi proteica: l'mRNA

Dobbiamo ora occuparci della traduzione ma prima è necessario conoscere meglio il prodotto della trascrizione.

Da subito si parla di mRNA e non di pre-mRNA o di trascritto primario a cui eravamo abituati con gli eucarioti.

In effetti l'RNA sintetizzato dalla RNA polimerasi nei procarioti non ha bisogno di essere processato e neanche trasferito dal nucleo al citoplasma, come abbiamo già evidenziato. Per questo si dice che **la trascrizione è accoppiata con la traduzione.**

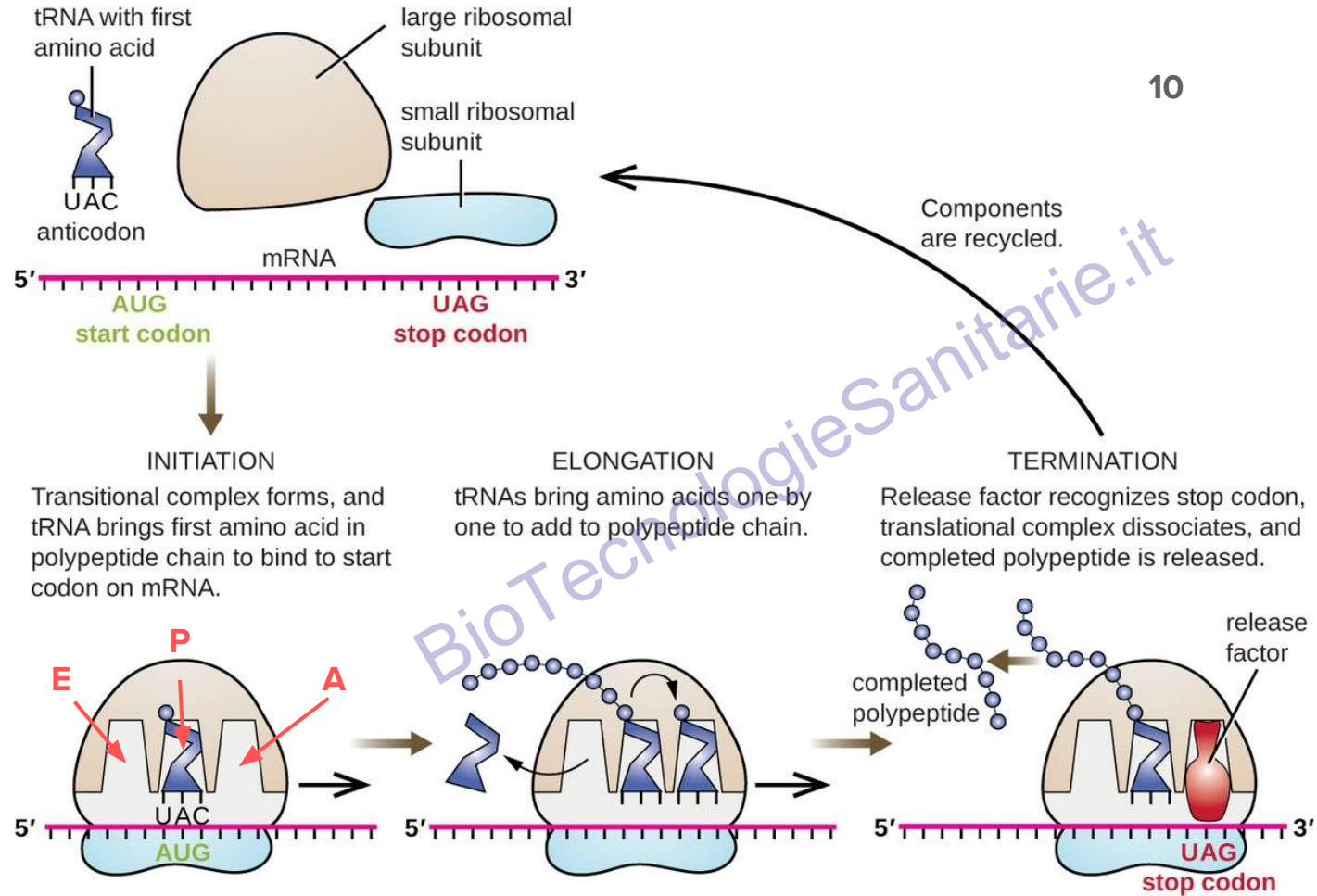
Quindi nell'mRNA procariotico non si parla in genere di rimozione di introni. Non c'è lo splicing. Nel regno dei Batteri non esistono introni (slide 64 della [prima parte](#)); gli Archaea invece qualche eccezione la presentano ma sappiamo anche che molti studi sono in corso.

La sintesi proteica: l'mRNA

Non è neanche necessario che venga incappucciata l'estremità 5' con un nucleotide che contiene guanina e tanto meno la poliadenilazione all'estremità 3'. Queste due modifiche negli eucarioti servono a far passare l'mRNA più agevolmente dal nucleo al citoplasma, lo proteggono da eventuali enzimi idrolitici nel suo lungo spostamento e lo aiutano a legarsi al ribosoma con la sua estremità 5'.

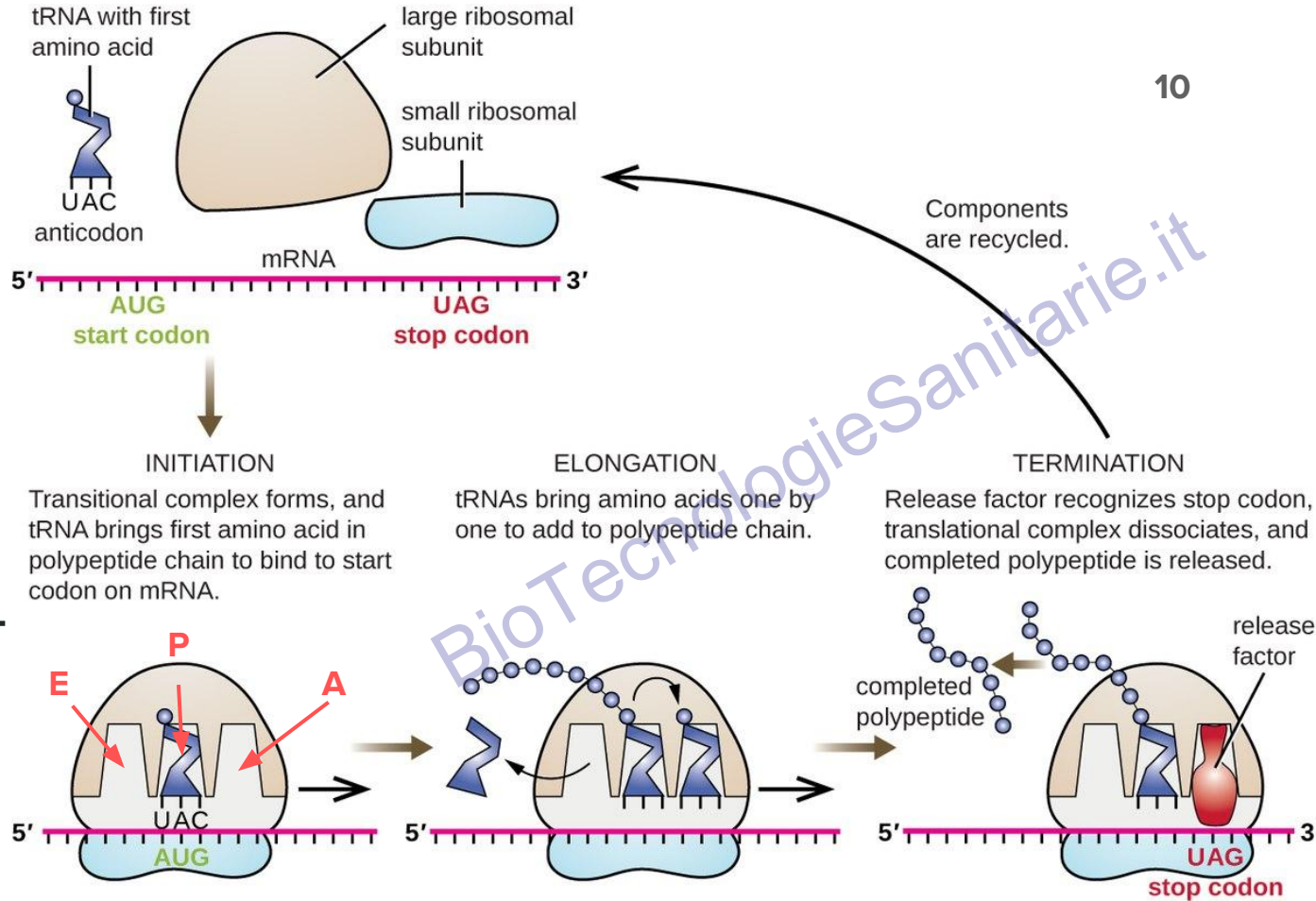
Altra differenza importante e in parte già accennata: **l'mRNA procariote è policistronico**, cioè contiene le informazioni per sintetizzare più geni che sono sotto il controllo dello stesso promotore. **L'mRNA eucariote è invece monocistronico** (informazioni per una proteina o un polipeptide sotto un singolo controllo)

La sintesi proteica: traduzione



10

Traduzione: ha il compito di decodificare il messaggio della molecola di mRNA in una sequenza precisa di aminoacidi. La sede è nei **ribosomi 70S**, tipici dei procarioti, che sono formati da due subunità: 50S e 30S. Gli eucarioti hanno ribosomi 80S e le subunità sono 60S e 40S.



10

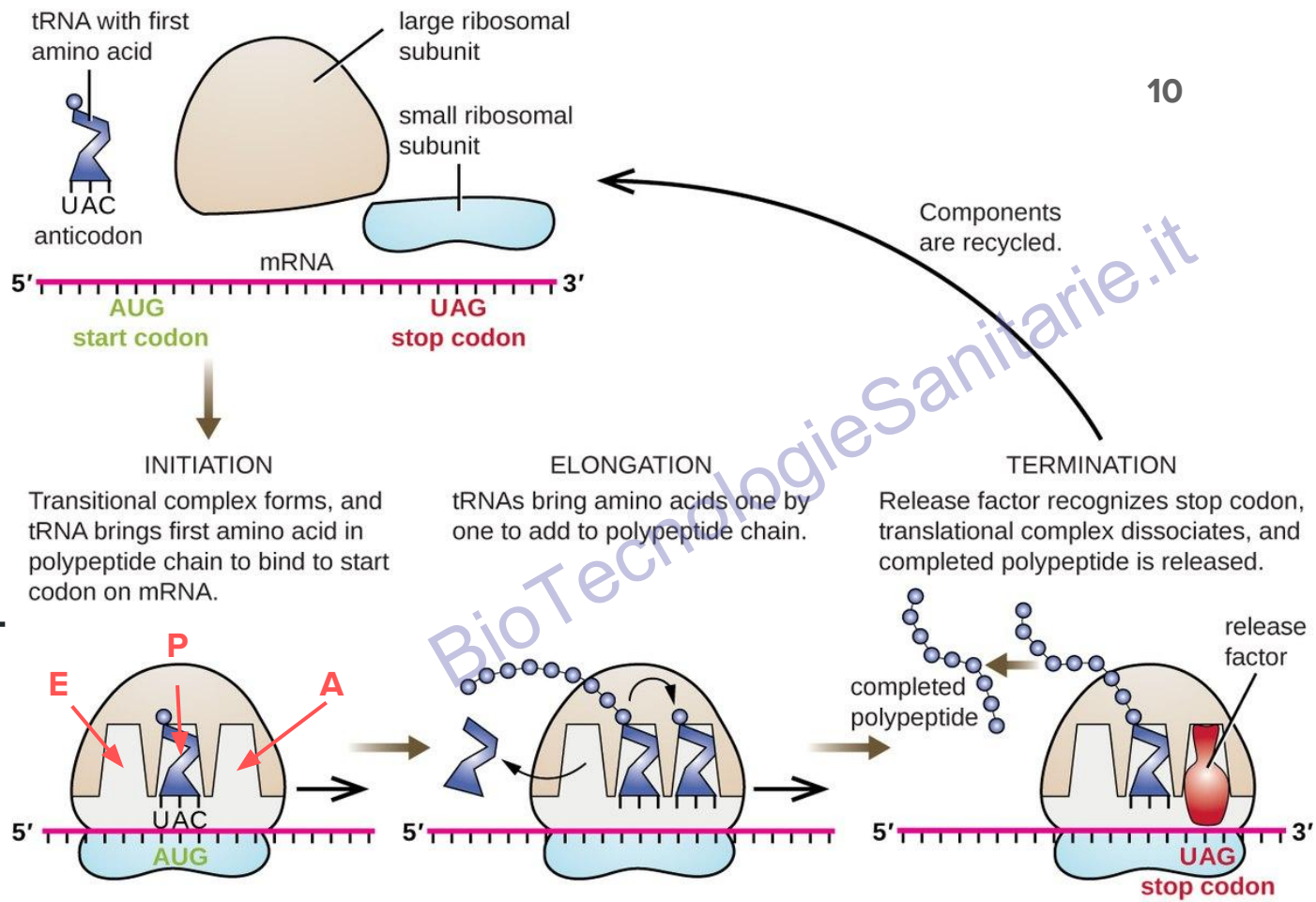
Components are recycled.

Traduzione.

Le subunità sono sempre dissociate e si uniscono solo quando si avvia la traduzione.

I ribosomi non interagiscono solo con l'mRNA ma anche con l'rRNA di trasporto o tRNA che ha il compito di legarsi agli aminoacidi specifici e di trasferirli dal citoplasma al ribosoma. Il tRNA agisce da adattatore o traduttore.

La sintesi proteica: traduzione



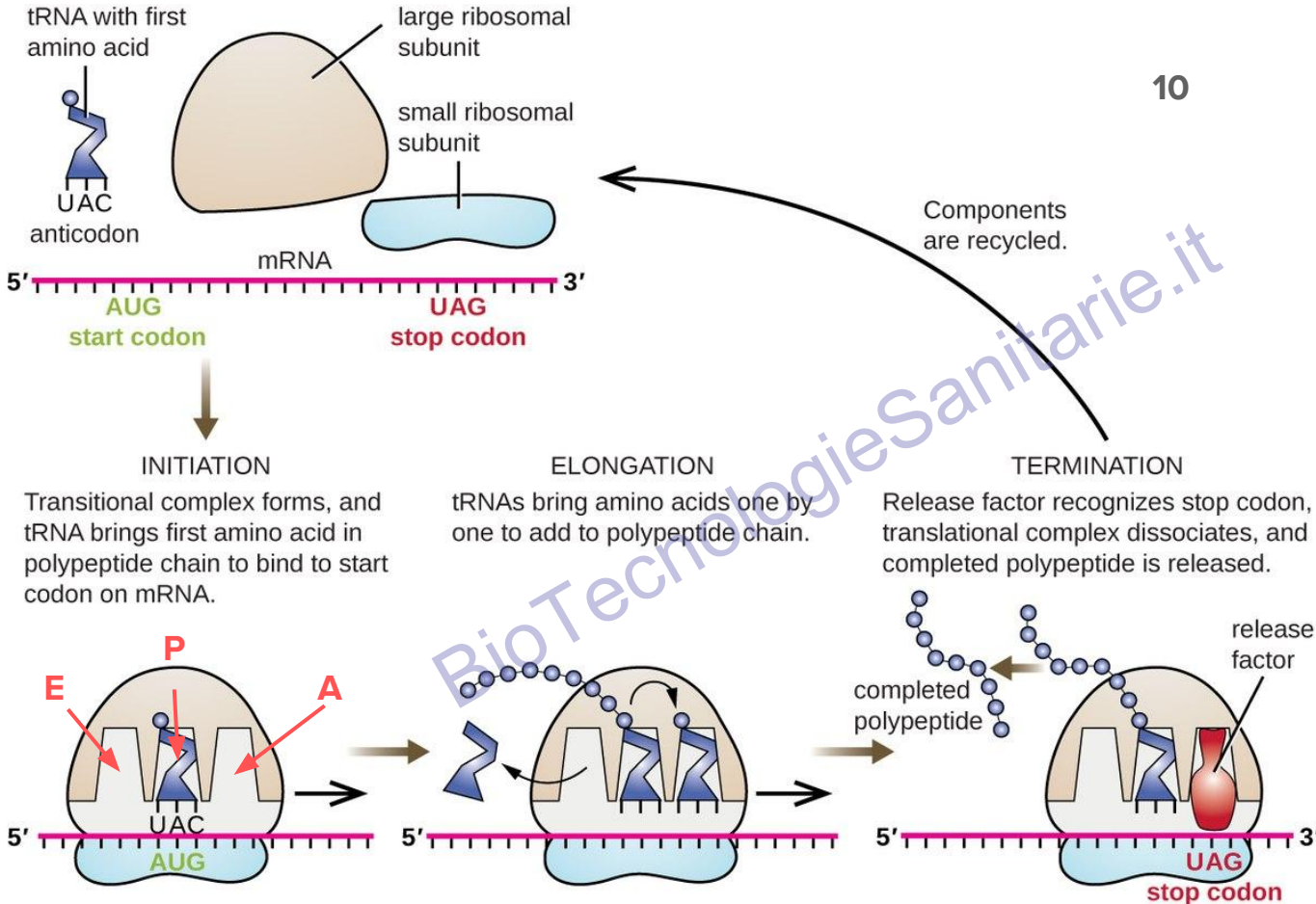
10

Traduzione. Inoltre ogni ribosoma presenta **tre siti attivi**, indicati nel disegno.

A: sito amminoacilico, accoglie il tRNA caricato del suo aminoacido (amminoacil-tRNA)

P: sito peptidilico, accoglie il tRNA dopo che questo ha scaricato il suo aminoacido

E: è il sito di rilascio.



10

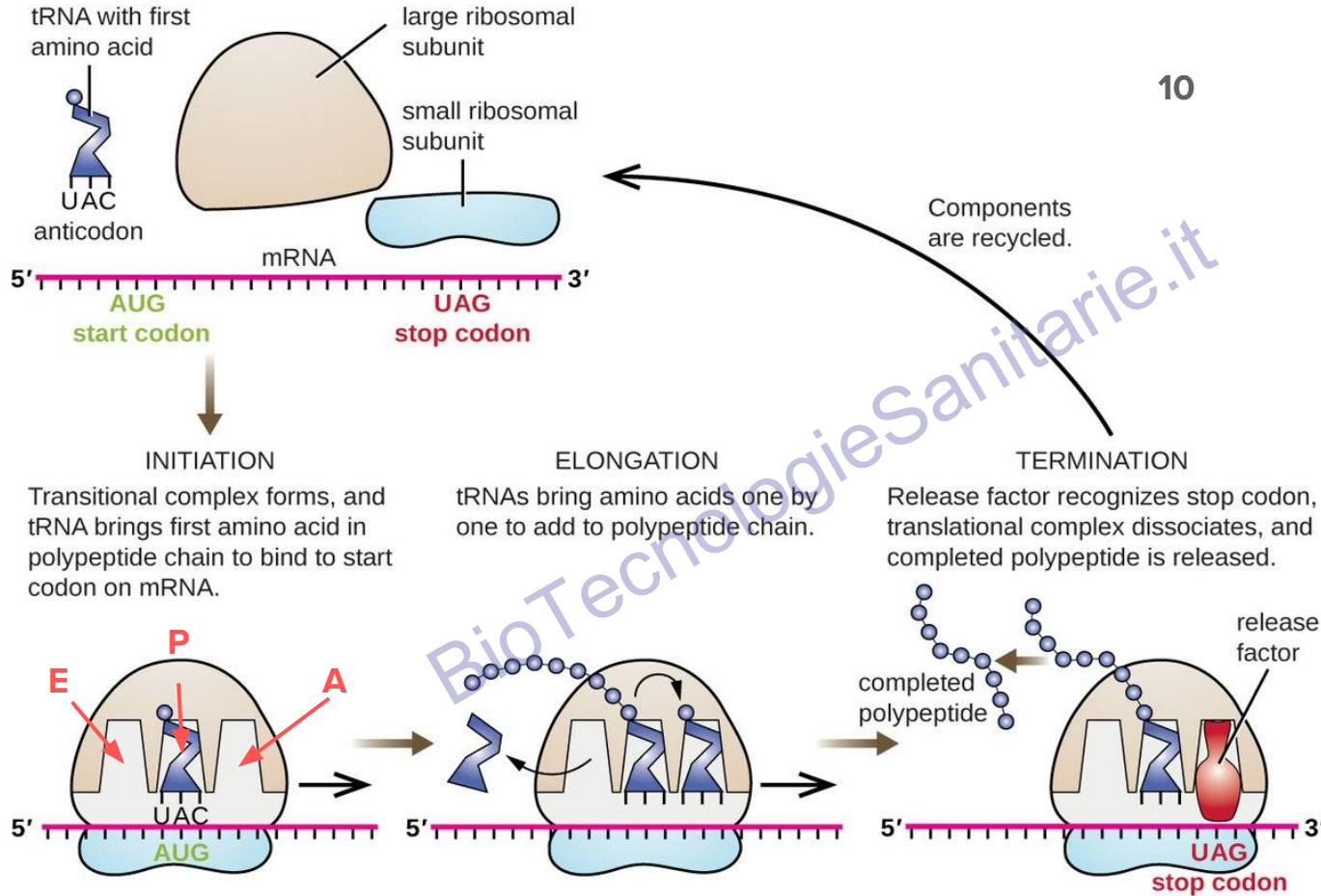
Traduzione

Inoltre ci sono diverse proteine con ruoli precisi e una fonte di energia che è il GTP (guanosina trifosfato) simile all'ATP (adenosina trifosfato).

La traduzione, come la trascrizione, si divide in tre fasi: inizio, allungamento e terminazione.

Percorriamo ora le tre fasi per capire meglio l'intero processo.

La sintesi proteica: traduzione



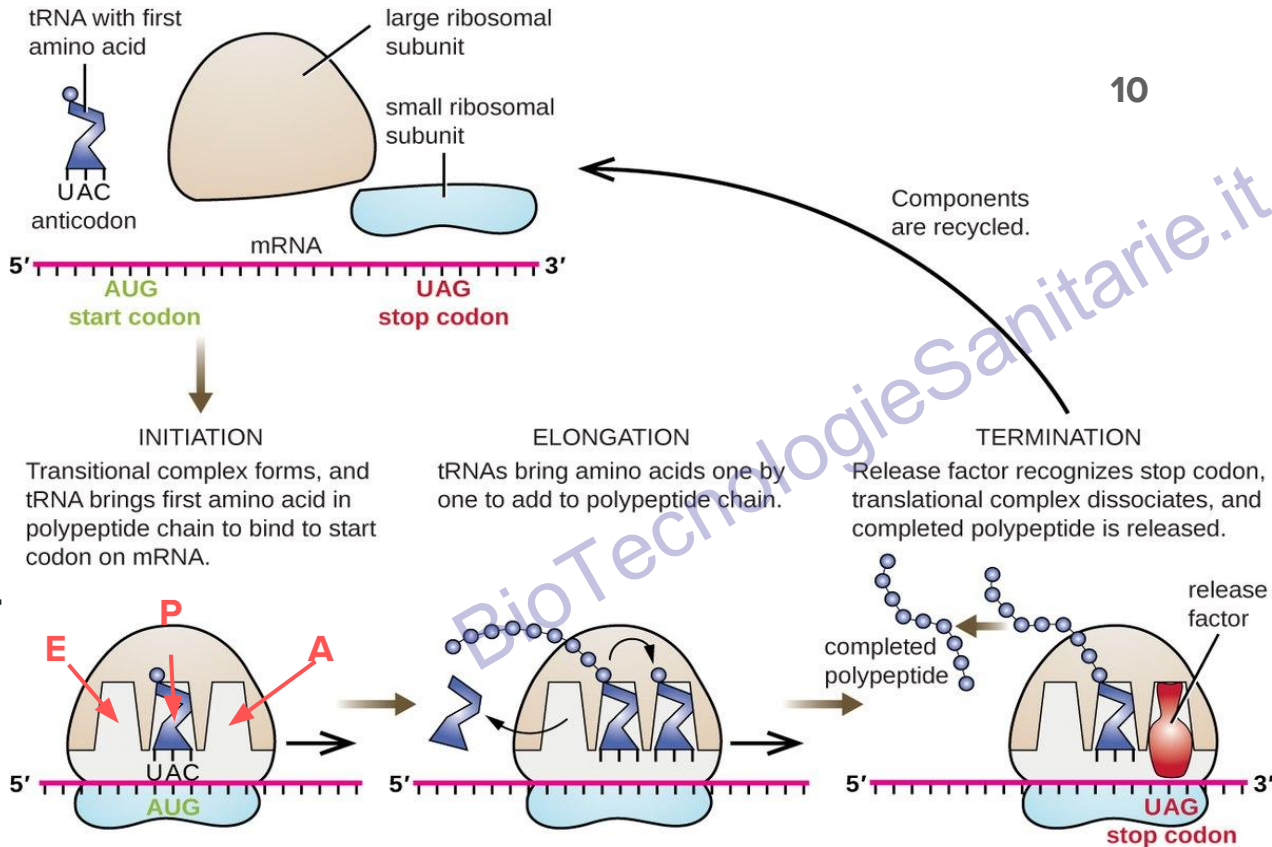
10

Components are recycled.

Traduzione: inizio.

Nei procarioti la subunità minore 30S del ribosoma interagisce con l'mRNA e, a livello di una regione ricca di purine (**sequenza Shine-Dalgarno**), si lega all'mRNA. Tutto ciò avviene a monte del codone di partenza (AUG). Negli eucarioti la situazione è diversa.

La sintesi proteica: traduzione



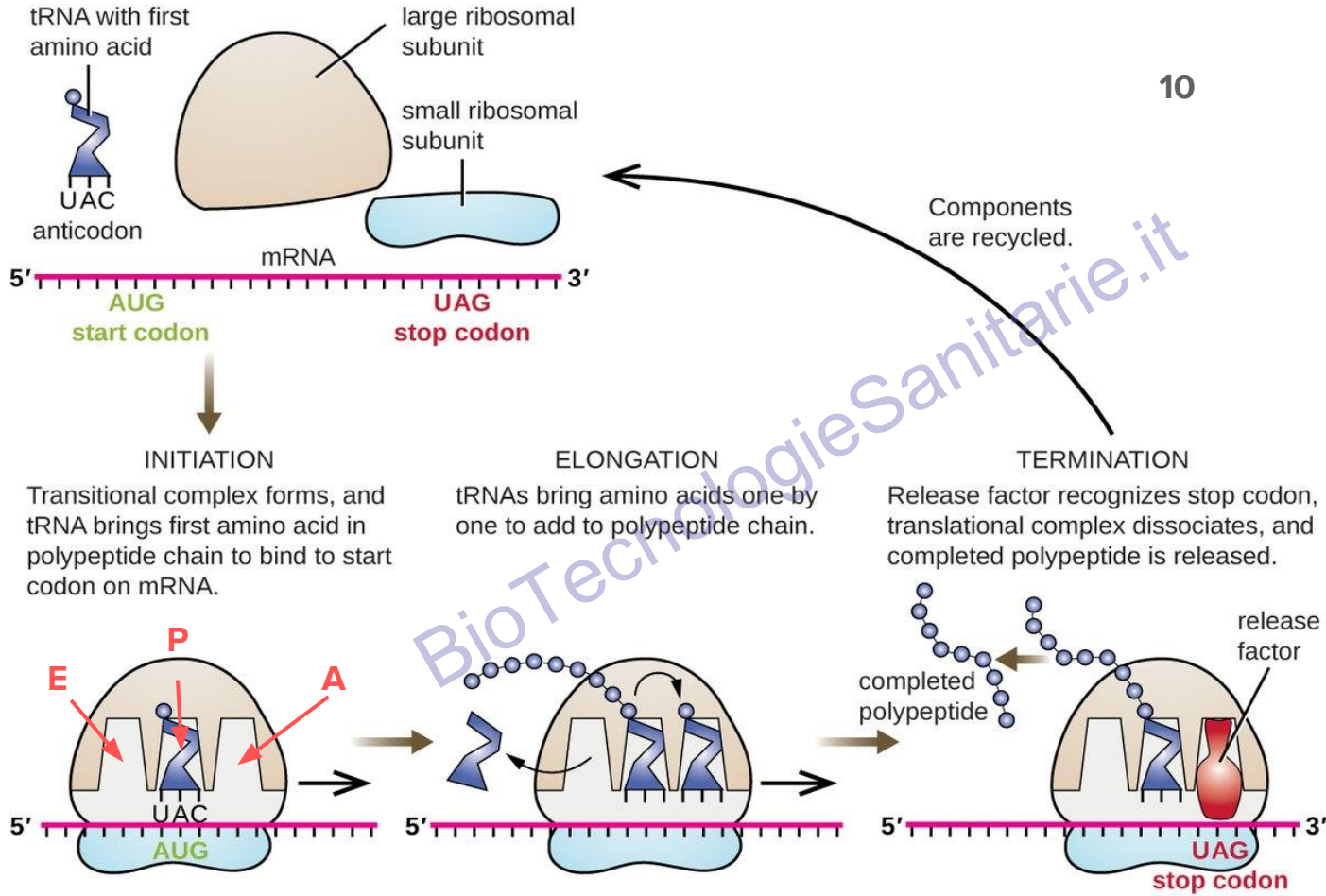
10

Traduzione: inizio.

Infatti negli eucarioti il legame con la subunità minore del ribosoma è facilitato dall'estremità 5' cap dell'mRNA; a quel punto la subunità del ribosoma si muove in direzione 5' - 3' per trovare il codone d'inizio AUG.

Nel regno dei batteri il primo RNA di trasporto ad essere coinvolto è il **formil-metionil-tRNA** (fMet-tRNA) che codifica per la formil metionina. La formil metionina è un derivato dell'aminoacido metionina.

La sintesi proteica: traduzione



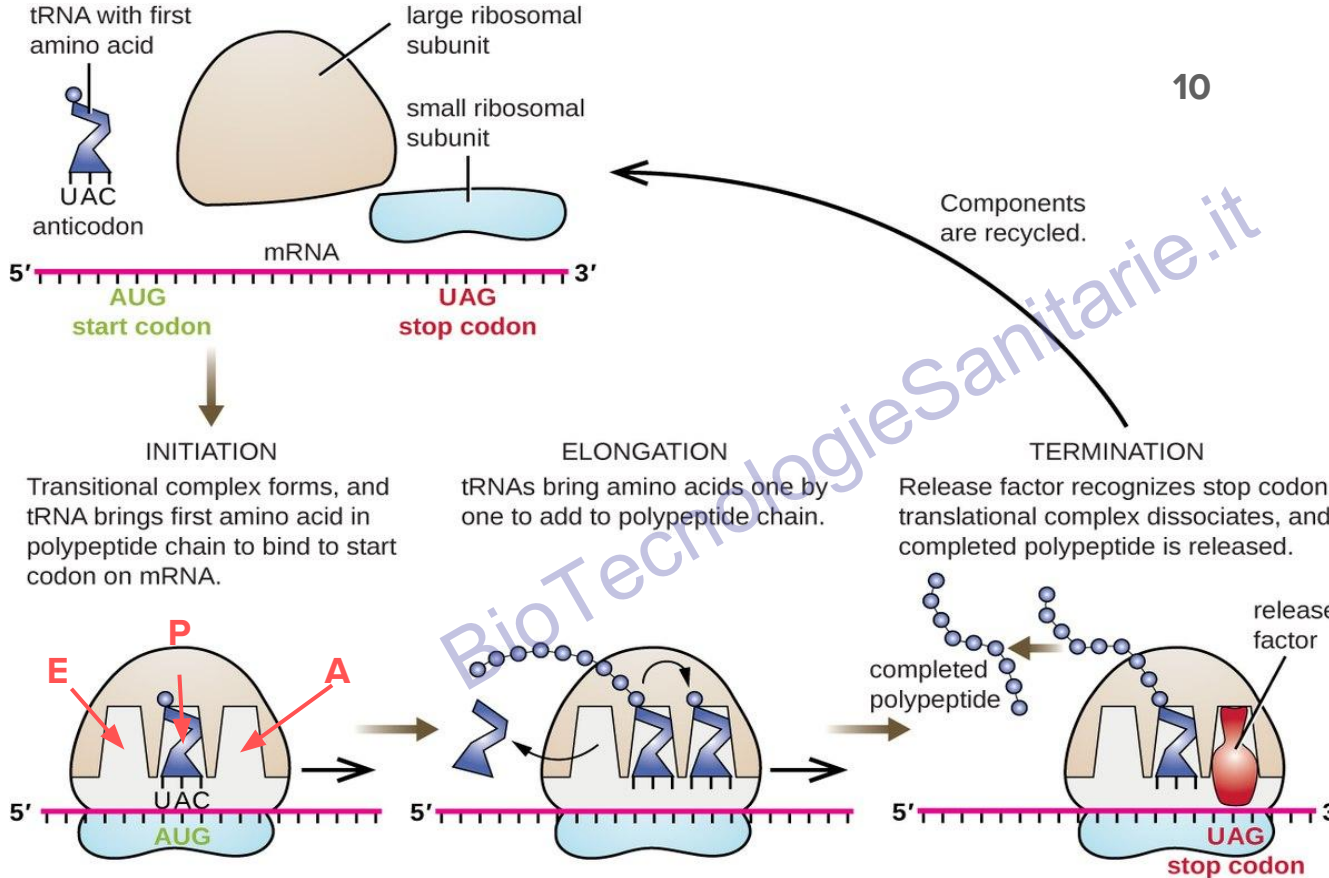
10

Traduzione: inizio.

Invece negli eucarioti e negli archeobatteri il primo RNA di trasporto è il **Met-tRNA** (metionil-tRNA) che codifica per la metionina.

Il primo aminoacido che corrisponde al codone start, in tutti i casi, è destinato ad essere distrutto perché è solo il segnale di inizio e non fa parte della proteina.

La sintesi proteica: traduzione



10

Traduzione: inizio.

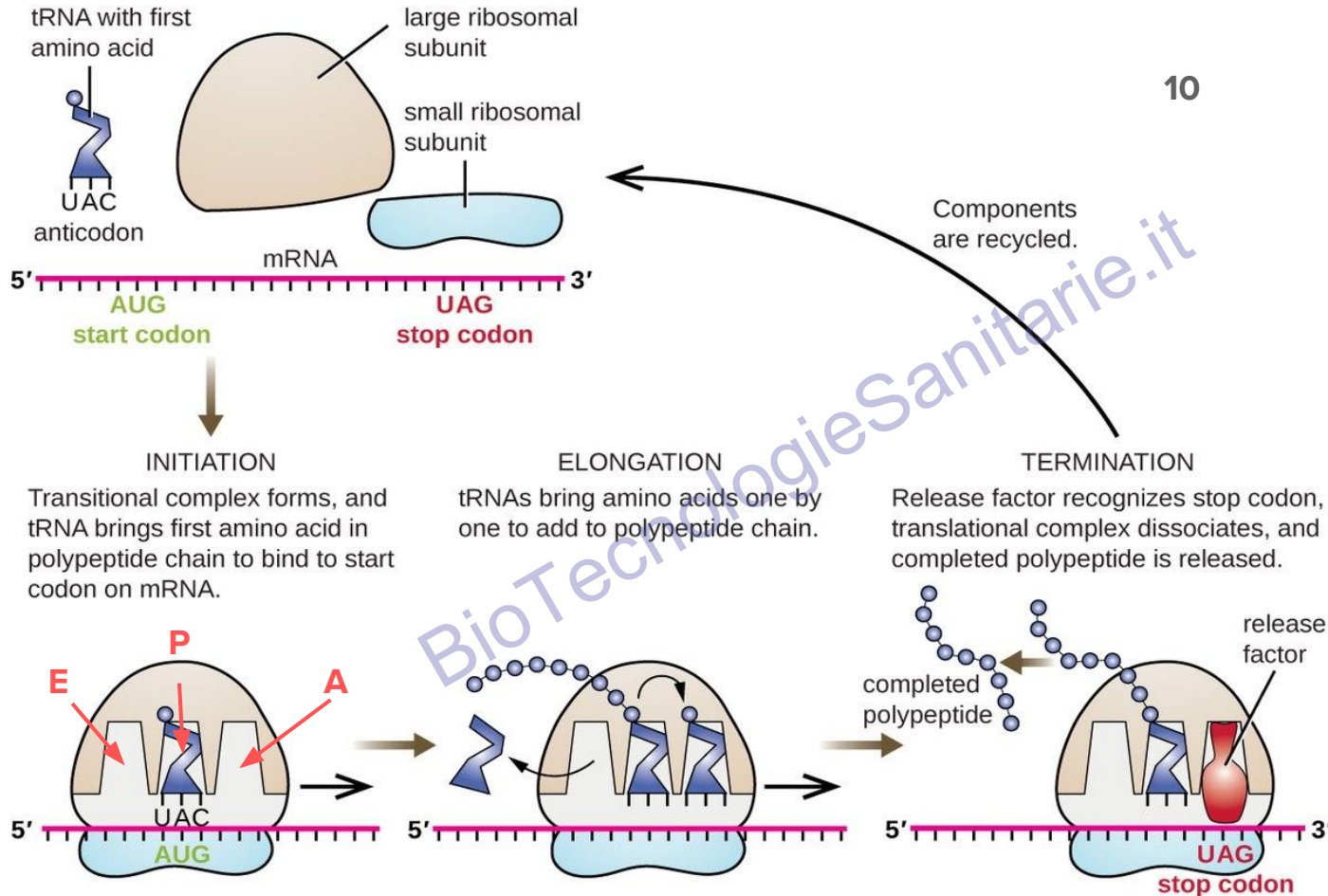
Nei procarioti la fase di inizio coinvolge **tre fattori proteici** (**Initiation Factor = IF**) che controllano gli eventi.

IF1: si lega alla subunità 30S e fa in modo che i tRNA non si leghino prima del previsto al sito A.

IF2: insieme a GTP aiuta fMet-tRNA a legarsi al sito corretto (lo vedremo nella prossima slide).

IF3: controlla che la subunità 50S si associ alla 30S nei tempi giusti.

La sintesi proteica: traduzione



10

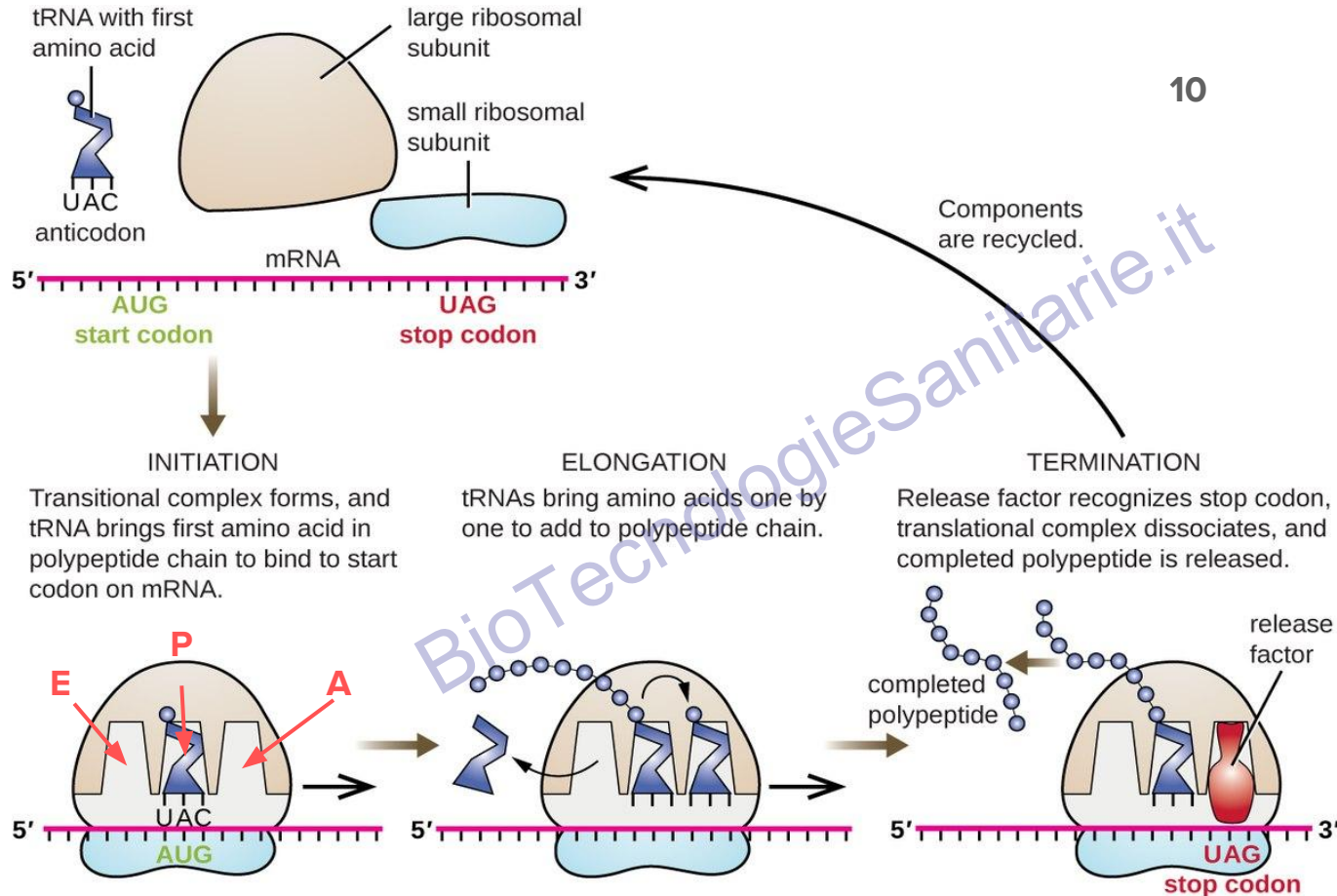
Traduzione: inizio.

Negli eucarioti **i fattori proteici di controllo sono ben 12.**

Nota bene.

All'inizio sia la fMet tRNA che la Met tRNA si legano al sito P e non al sito A come avviene poi di norma. Quanto descritto viene evidenziato nel disegno.

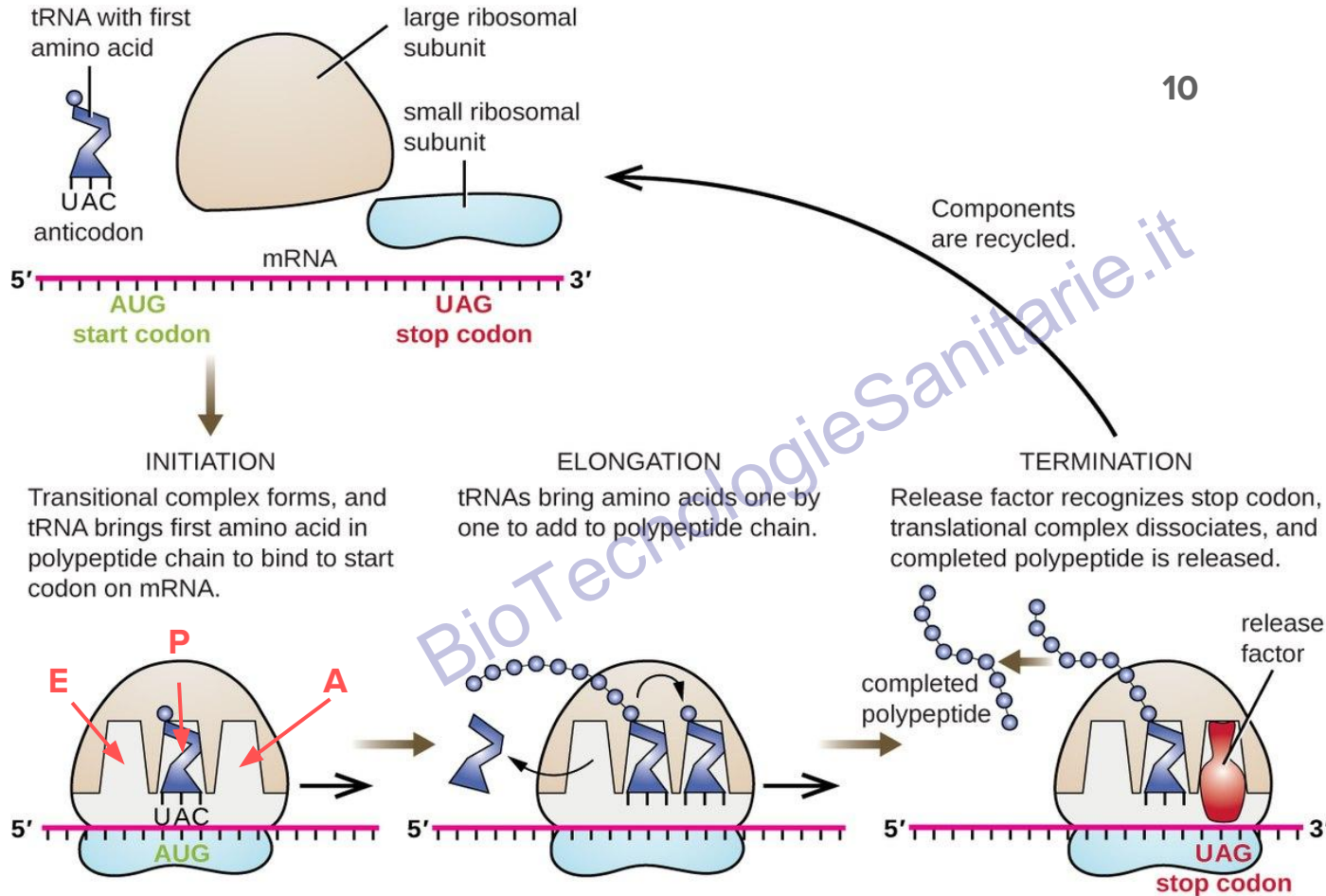
La sintesi proteica: traduzione



10

Traduzione: allungamento.

L'allungamento inizia quando la fMet-tRNA si lega al sito P. Infatti questo legame provoca un cambiamento di conformazione che apre il sito A perché possa accogliere l'amminoacil-tRNA il cui anticodone è complementare a quello dell'mRNA successivo al codone start.

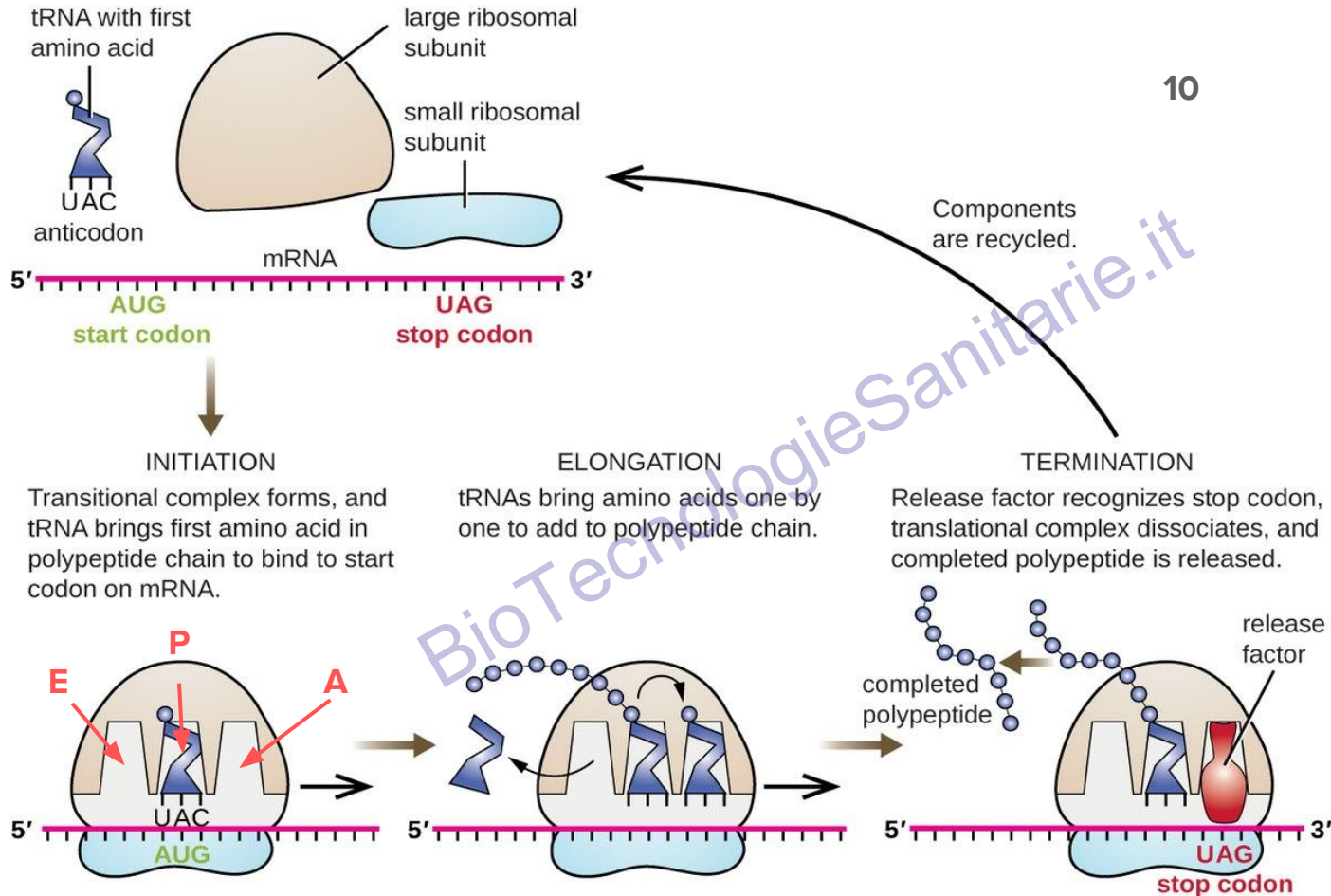


10

**Traduzione:
allungamento.**

fMet-tRNA in P rilascia il suo aminoacido e si forma un legame peptidico tra la formil metionina e l'amminoacido legato al tRNA posizionato nel sito A. La formazione del legame è catalizzata da un ribozima (l'RNA ribosomiale S23, presente nella subunità 50S).

La sintesi proteica: traduzione



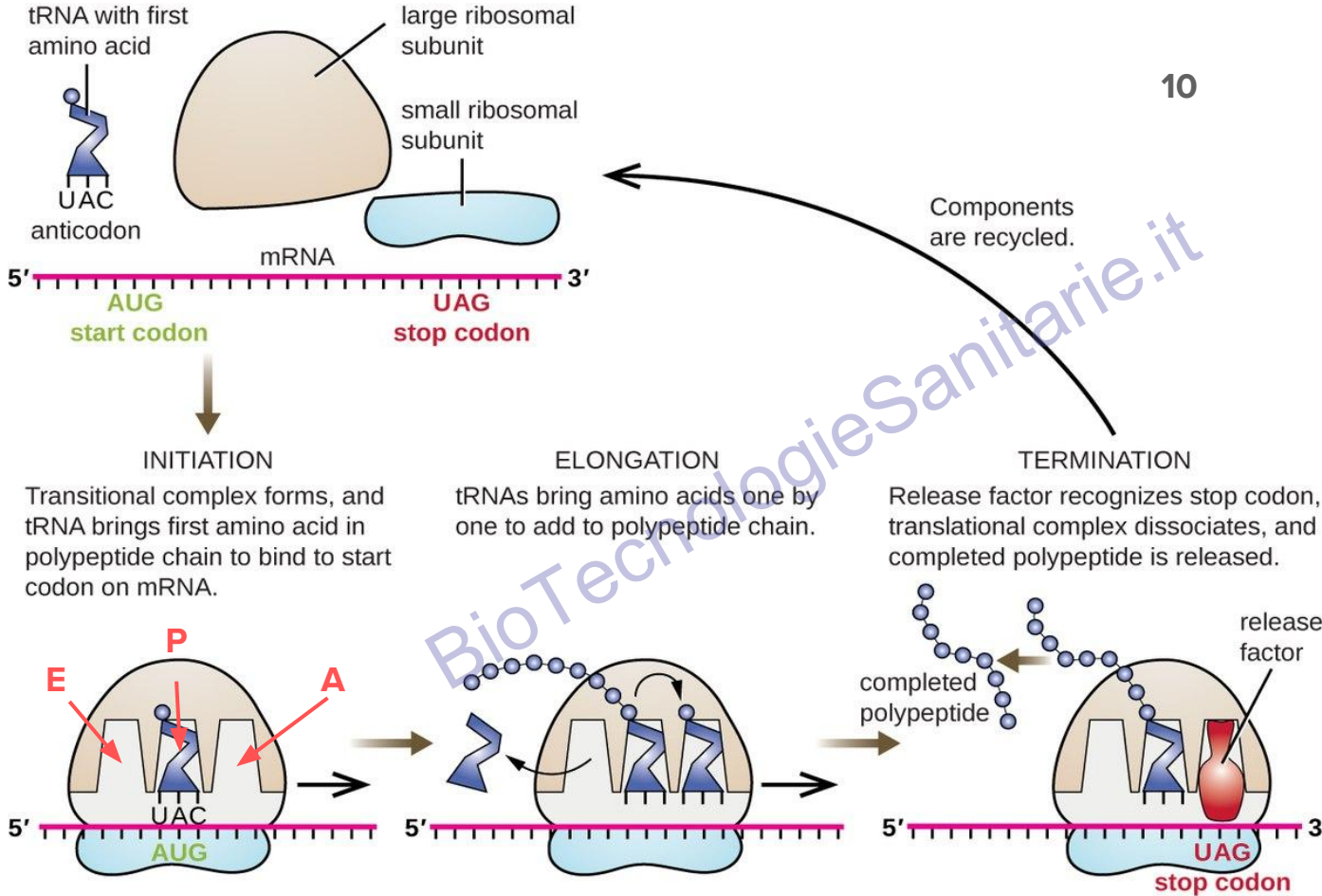
10

Traduzione: allungamento.

Il ribozima è un enzima non di natura proteica ma formato da RNA.

La parte iniziale della nuova catena polipeptidica è un dipeptide il cui primo aminoacido è destinato ad essere poi degradato come è stato già detto.

La sintesi proteica: traduzione



10

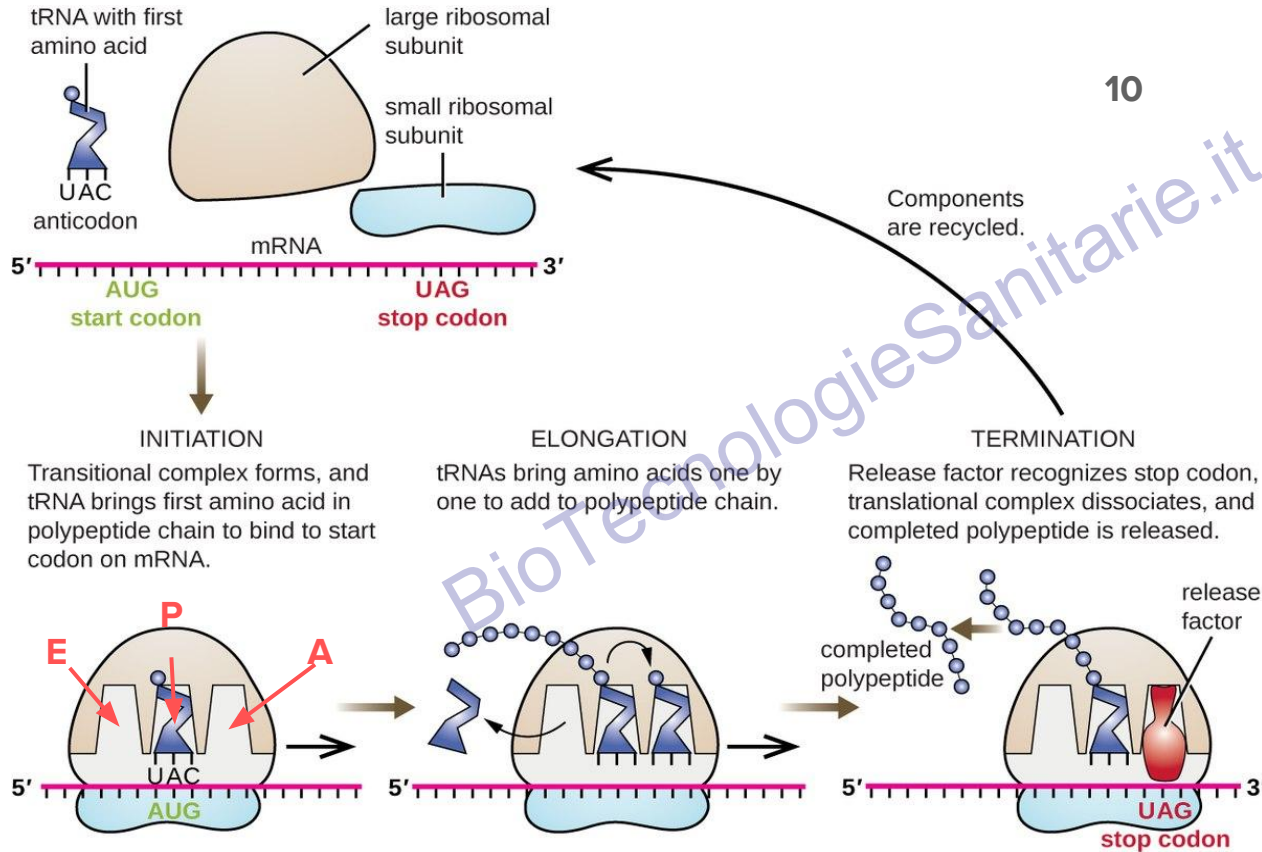
Traduzione: allungamento.

A questo punto il tRNA in P è scaricato (deacilato).

Invece in A si è formato il complesso dipeptidil-tRNA.

Il ribosoma si sposta di una tripletta di basi azotate verso l'estremità 3' dell'mRNA.

La sintesi proteica: traduzione



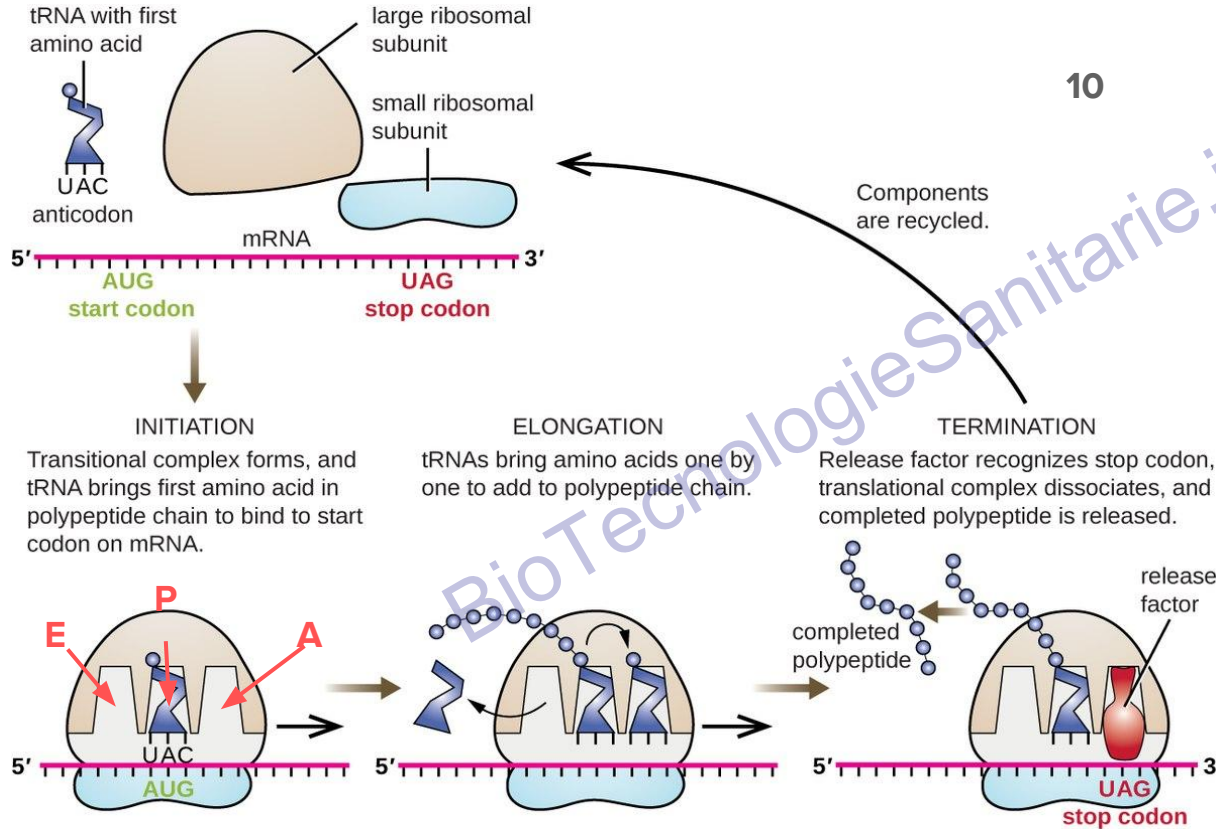
10

Traduzione: allungamento.

La conseguenza sono:

- lo spostamento del tRNA deacilato da P ad E, da dove viene poi rilasciato;
- lo spostamento del dipeptidil-tRNA da A a P;
- la liberazione del sito A, pronto ad accogliere ora l'amminoacil-tRNA che corrisponde al codone successivo dell'mRNA.

La sintesi proteica: traduzione



10

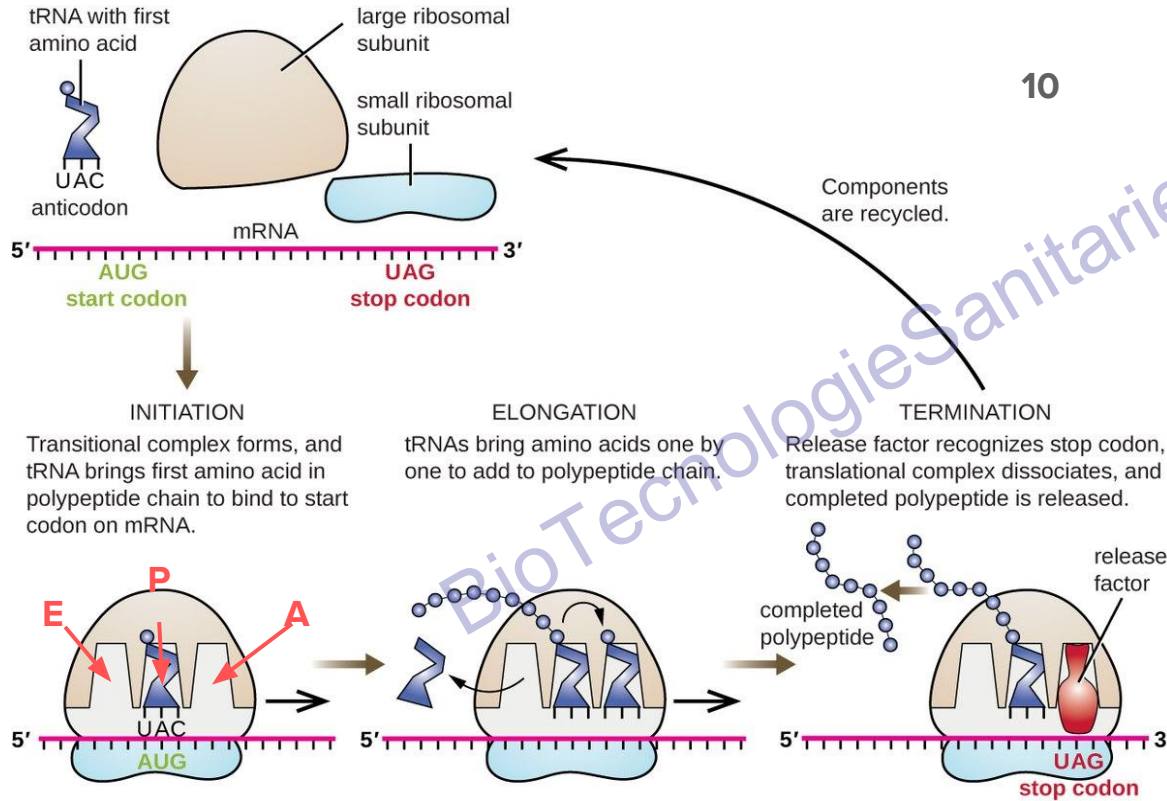
Traduzione: allungamento.

Anche la fase dell'allungamento è sotto il controllo di **fattori proteici** (**Elongation Factor = EF**). Nei procarioti sono:

- EF-Tu (eEF1 α)**: porta l'amminoacil-tRNA nel sito A;
- EF-Ts (eEF1 $\beta\gamma$)**: ha il compito di attivare EF-Tu;
- EF-G (eEF2)**: controlla il passaggio da un sito attivo all'altro (traslocazione)
- EF-P (EEIF5A)**: coinvolto nella formazione del legame peptidico.

Tra parentesi, in blu, sono indicati i fattori negli eucarioti

La sintesi proteica: traduzione



10

Traduzione: terminazione.

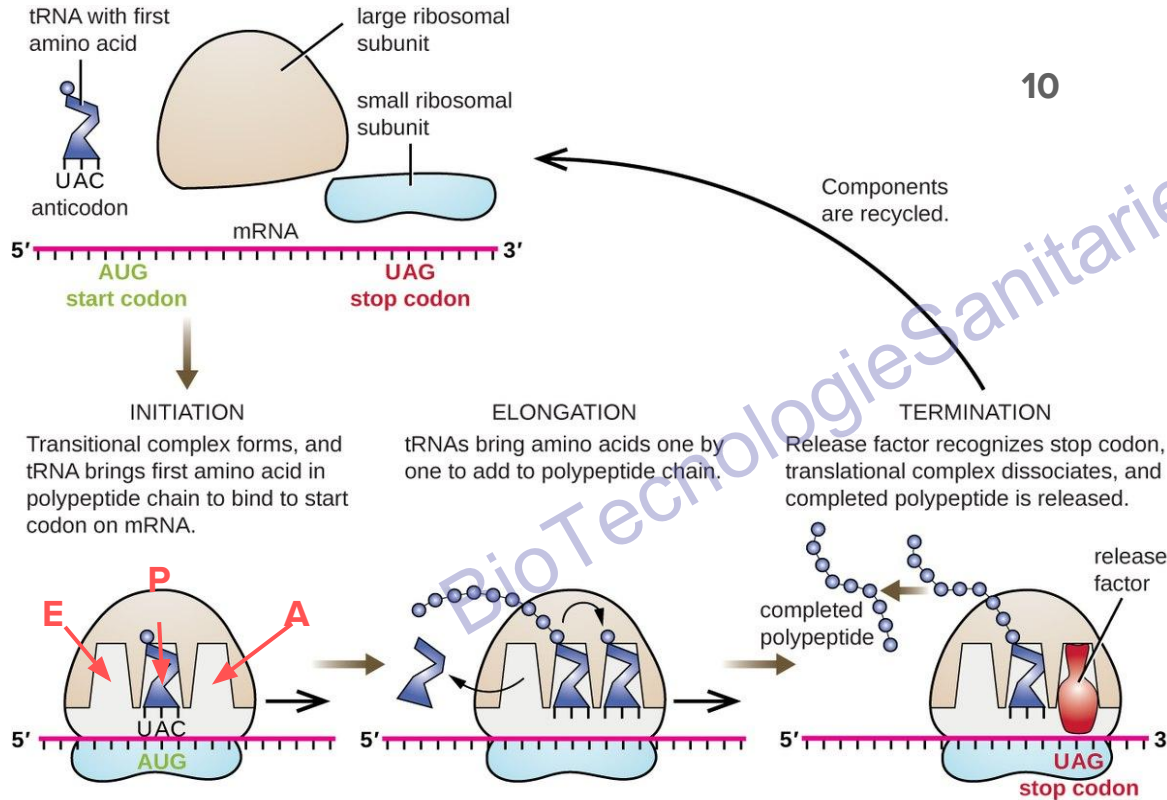
La fase di terminazione si avvia quando il sito A viene occupato da uno dei tre codoni di stop (**UAA, UAG, UGA**). Questi codoni non vengono riconosciuti dai tRNA. Ci pensano due fattori di rilascio (**Release Factor** = **RF**).

RF1: riconosce i codoni UAA e UAG.

RF2: riconosce i codoni di stop UAA e UGA

RF3: ha il compito di facilitare il legame dei due fattori precedenti al ribosoma.

Negli eucarioti esiste un solo fattore di rilascio (**eRF1**) per tutti e 3 i codoni di stop.



10

Traduzione: terminazione.

Oltre a riconoscere i vari codoni i fattori di terminazione idrolizzano il legame terminale del peptidil-tRNA. L'idrolisi ha conseguenze precise.

- Libera il polipeptide che lascia il ribosoma attraverso un canale apposito.
- L'ultimo tRNA coinvolto lascia il sito P.
- Il ribosoma si dissocia nelle sue due subunità.

Il polipeptide neoformato, che comincia a ripiegarsi già durante la sintesi, va incontro ad ulteriori modifiche.

La sintesi proteica: traduzione e antibiotici

Anche la traduzione come la trascrizione è il bersaglio molecolare di alcuni antibiotici.

Ad esempio la **streptomicina** (aminoglicoside, efficace soprattutto verso i batteri gram-negativi aerobi) agisce sui microrganismi in fase riproduttiva e si lega alla subunità ribosomiale 30S distorcendo la sua struttura e interferendo con l'inizio della traduzione.

Le **tetracicline** (altra famiglia come gli aminoglicosidi che agisce bloccando la sintesi proteica) si legano in modo reversibile alla subunità 30S impedendo all'amminoacil-tRNA di accedere al sito A. Legandosi in modo reversibile non uccidono i batteri ma ne impediscono la moltiplicazione.

La sintesi proteica: traduzione e antibiotici

Il **cloramfenicolo** (antibiotico a largo spettro ma tossico) e l'**eritromicina** (attiva contro i batteri Gram-positivi), invece, sono due antibiotici che agiscono sempre a livello della traduzione ma in fasi successive a quelle iniziali. Ambedue si legano a elementi della subunità 50S inibendo rispettivamente il trasferimento del peptide dal sito P al sito A oppure il trasferimento dei tRNA da un sito attivo al successivo.

In tutti i casi descritti si può arrivare ad un blocco irreversibile della sintesi proteica che però dipende dalla dose somministrata.

La sintesi proteica: modifiche del polipeptide

Le modifiche a cui va incontro il polipeptide **nei procarioti** in realtà sono poche e queste, naturalmente, avvengono nel citoplasma. Ricordiamo ad esempio la rimozione della formil metionina.

N.B. La formilmetionina ha un interesse particolare per il nostro sistema immunitario. Infatti viene utilizzata dal nostro organismo per discriminare tra gli antigeni self e non-self. Non essendo una molecola caratteristica degli eucarioti serve come innesco per l'avvio delle nostre difese immunitarie.

Negli **eucarioti**, invece, le modifiche post-traduzionali sono numerose e coinvolgono sia il reticolo endoplasmatico che l'apparato del Golgi.

La sintesi proteica: emivita dell'mRNA

Nei **procarioti** l'**mRNA non è molto stabile** e quindi la sua emivita si misura in secondi o in minuti.

Negli **eucarioti** la **stabilità è maggiore** e la sua emivita si misura in alcune ore o in giorni.

Velocità del processo:

- 17-21 aminoacidi/sec nei procarioti
- 6-9 aminoacidi/sec negli eucarioti

La regolazione genica

BioTechnologySanitarie.it

La regolazione genica: definizione

Abbiamo già evidenziato all'inizio di questa presentazione che non tutti i geni vengono utilizzati nello stesso momento e con uguale frequenza. I geni, infatti, sono suddivisi in **costitutivi** e **regolati**. I primi sono sempre attivi in quanto i loro prodotti molecolari sono indispensabili per le operazioni vitali. I secondi vengono attivati solo in caso di necessità, per esempio quando si verificano stress ambientali come vedremo tra poco.

La **regolazione genica** è quindi la modalità con cui vengono indirizzate le sintesi di prodotti genici, in altre parole regola l'espressione dei geni.

La regolazione genica: definizione

La necessità della regolazione genica è legata al risparmio energetico o di economia cellulare (si scelga pure la definizione più congeniale)

Perché sintetizzare mRNA e proteine da non utilizzare? È come se andassimo a fare la spesa il giovedì anche se abbiamo il frigorifero pieno solo perché per abitudine lo facciamo ogni giovedì.

I **procarioti** controllano l'espressione genica (sintesi sì o sintesi no? in altre parole geni "accesi" o "spenti"?) a livello di **trascrizione** e questo per rispondere in modo efficace ai cambiamenti ambientali. Il controllo può avvenire sia per induzione che per repressione.

La regolazione genica: controllo per induzione

Il **controllo per induzione** si verifica quando nell'ambiente si presenta un substrato che richiede nuove proteine.

Per esempio *Escherichia coli* utilizza prioritariamente il glucosio come fonte di energia ma se nell'ambiente manca e ha a disposizione il lattosio, avrà necessità di sintetizzare l'enzima che idrolizza il lattosio in glucosio e galattosio e che non fa parte delle proteine normalmente sintetizzate dai geni costitutivi.

È una specifica via catabolica (di degradazione di molecole complesse), normalmente inattiva, che viene indotta dalla presenza del lattosio da degradare.

La regolazione genica: controllo per repressione

Il **controllo per repressione**, viceversa, si ha quando una molecola durante una sintesi viene prodotta in quantità eccessiva. Non giova all'economia della cellula produrre in quantità non utilizzabili e quindi viene staccata la spina in questa attività anabolica (di sintesi).

L'esempio più utilizzato a scopo didattico e su cui si sono condotte numerosissime ricerche è senza dubbio la regolazione della sintesi dell'aminoacido triptofano in *Escherichia coli*.

Le prossime slide sono dedicate all'analisi delle due modalità di controllo. Vediamo prima però qualche dato storico.

La regolazione genica: i primi studi

I primi studi sulla regolazione genica nei procarioti furono pubblicati nel 1961 da due scienziati francesi:

Jacques Monod (1910 - 1976)
a sinistra (fig. 11)

François Jacob (1920 - 2013)
a destra (fig. 12).

Nel 1965 vinsero il premio Nobel per la medicina per le loro scoperte

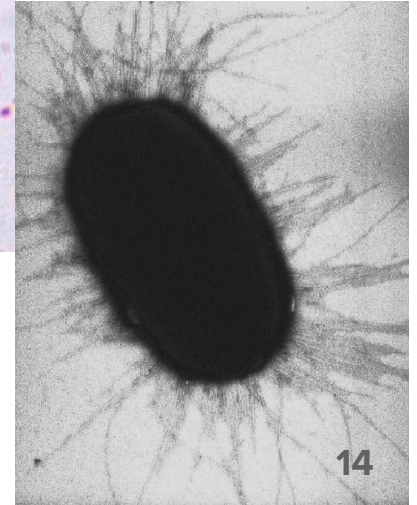


La regolazione genica: operone

I due scienziati scelsero **Escherichia coli** per le loro ricerche perché si tratta di un batterio molto diffuso che tra l'altro ospitiamo nel nostro organismo in grande quantità.



In alto. **E. coli** al microscopio ottico dopo colorazione Gram
A destra. **E. coli** al microscopio elettronico (in evidenza le fimbrie).



La regolazione genica: operone

Nelle slide 28 è stato già evidenziato che l'mRNA che si produce nella trascrizione non contiene solo le informazioni di un unico gene ma di più geni.

Nei batteri i geni codificanti per una stessa via metabolica o una specifica funzione sono sempre raggruppati e sono sotto il controllo dello stesso promotore.

Da qui il fatto che l'mRNA viene definito policistronico.

La regolazione genica: operone

Monod e Jacob furono i primi a descrivere questa unità di trascrizione tipica dei batteri in *Escherichia coli* e le diedero il nome di **operone**.

L'operone è quindi una porzione del DNA e comprende:

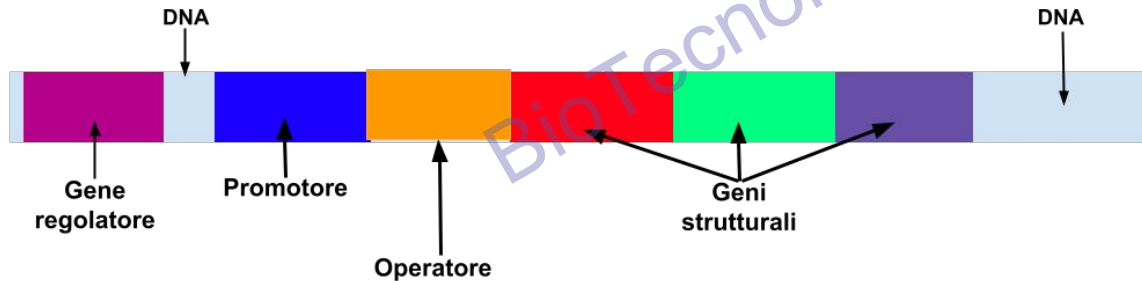
- i **geni strutturali** che codificano per tutte le proteine coinvolte nella stessa funzione;
- il **promotore**, a monte dei geni strutturali, che già conosciamo come regione del DNA a cui si lega la RNA polimerasi e non solo;
- un **operatore** che si può trovare a monte o a valle del promotore.

A questi elementi si deve aggiungere un **gene regolatore** che si può trovare anche lontano dall'operone.

La regolazione genica: operone

15

Modello di operone con 3 geni strutturali



L'operatore, come si può vedere nel disegno, è leggermente sovrapposto al promotore.

Vediamo ora, nello specifico, lo schema dell'operone coinvolto nel trasporto e nel metabolismo del lattosio (operone lac).

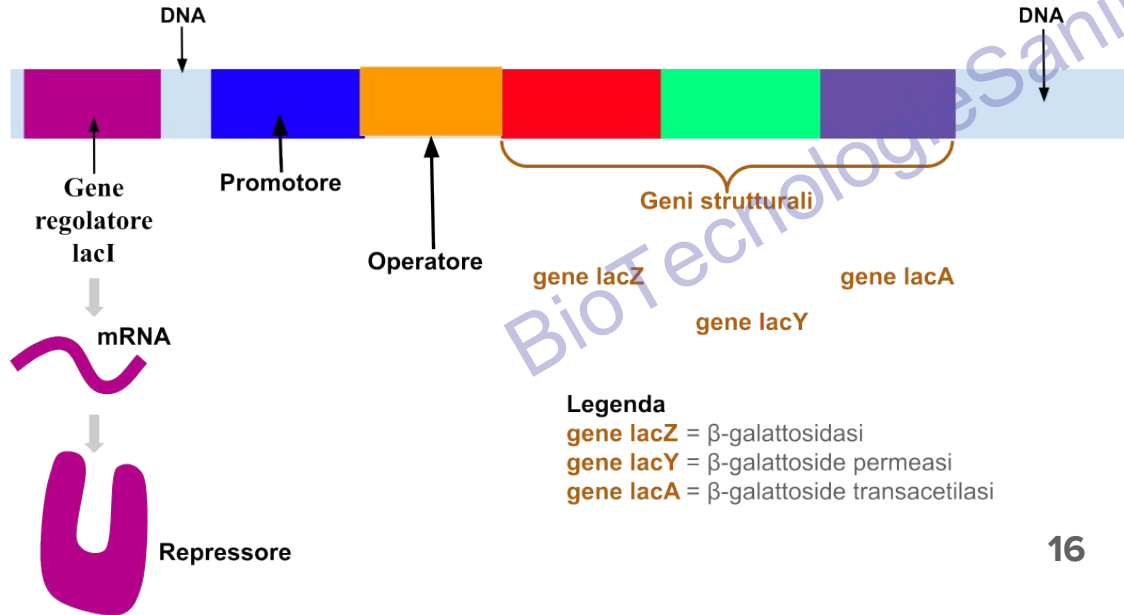
La regolazione genica: operone lac

Sappiamo già che, in assenza di glucosio e quando nel substrato c'è il lattosio (fonte alternativa di carbonio ed energia e quindi essenziale), *Escherichia coli* e molti altri enterobatteri devono sintetizzare degli enzimi specifici. Gli enzimi sono tre:

- **β -galattoside permeasi**, necessaria per introdurre all'interno della cellula il lattosio che si trova nell'ambiente extracellulare (processo di captazione);
- **β -galattosidasi** che scinde il lattosio;
- **β -galattoside transacetilasi** la cui funzione non è ancora del tutto chiara.

La regolazione genica: operone lac

Operone lac (1)

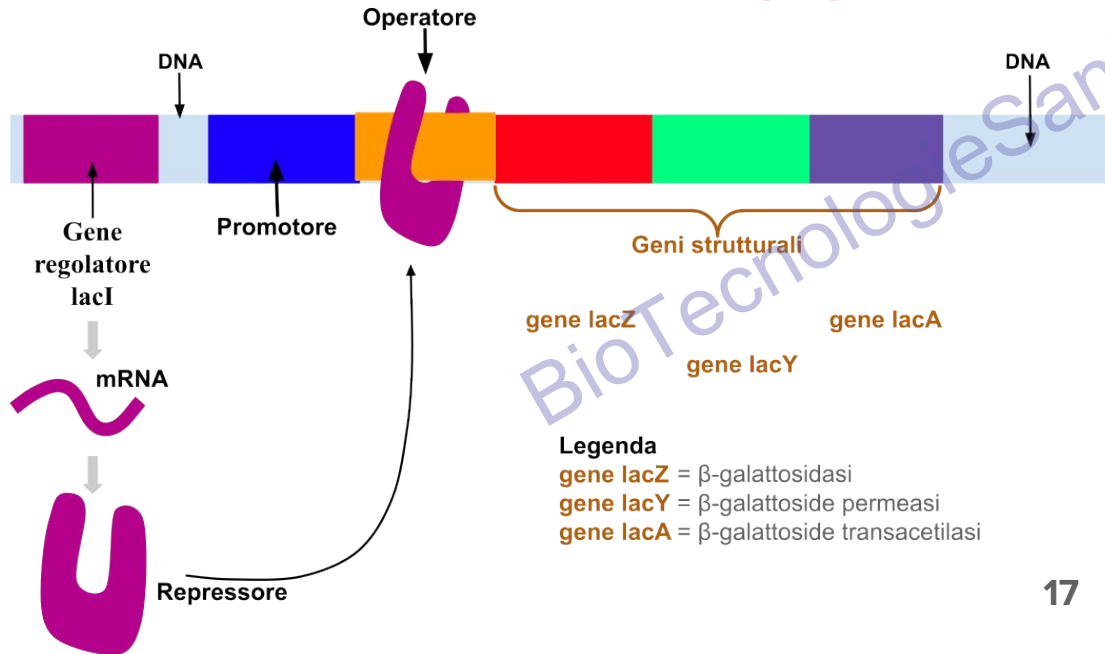


Il disegno di lato rappresenta l'**operone lac** in tutte le sue componenti, compreso il gene regolatore lacI che sintetizza in continuazione una proteina chiamata **repressore**.

Sono evidenziati anche i tre geni strutturali con le sigle con cui vengono indicati a livello internazionale e la legenda che aiuta a riconoscerli.

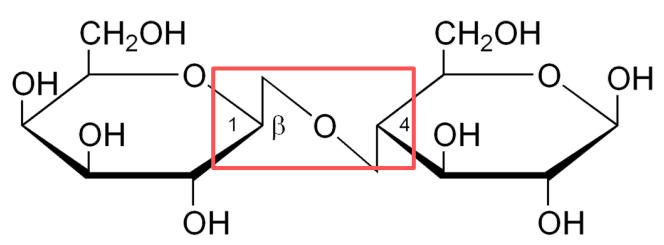
La regolazione genica: operone lac

Operone lac (2)

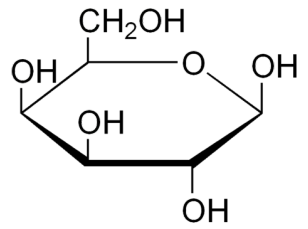


Il repressore si lega all'operatore e, grazie anche al fatto che l'operatore sormonta leggermente il promotore, di fatto questo legame impedisce alla RNA polimerasi di legarsi al promotore e la trascrizione è così impedita. Questa è la situazione di normalità, quando è disponibile il glucosio. Non si ha necessità di sintetizzare gli enzimi lacZ, lacY e lacA e quindi l'operone lac è inattivo o in altri termini represso.

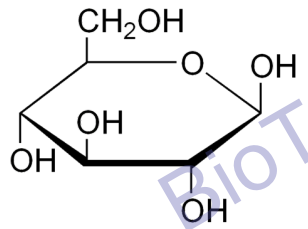
La regolazione genica: operone lac



Lactose

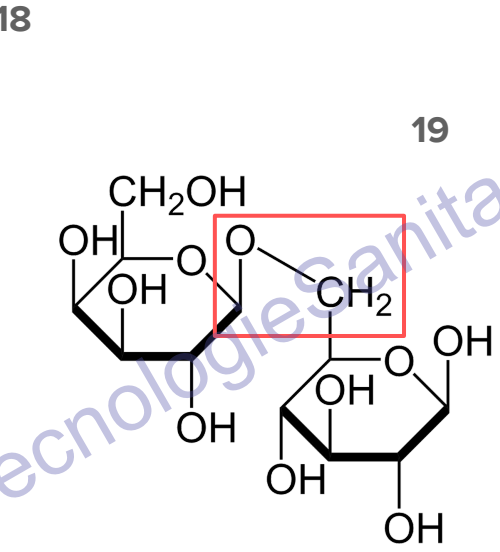


D-galactose



D-glucose

Molecola del **lattosio** in cui è evidenziato il legame β tra il carbonio 1 e il carbonio 4

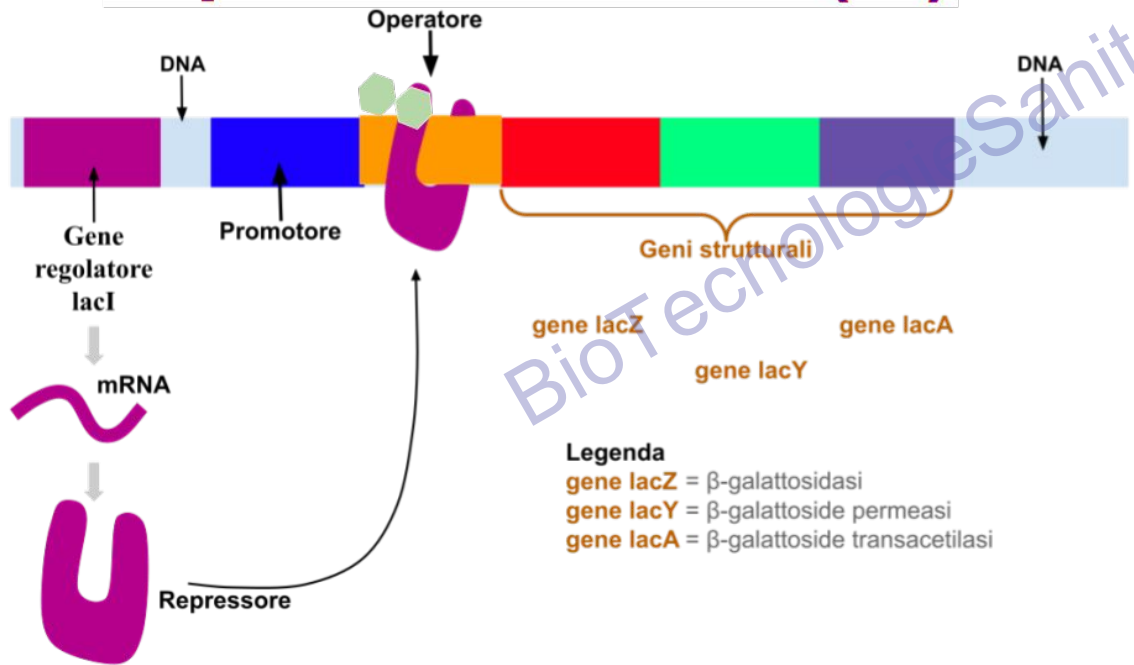


Allolattosio in cui è evidenziato il legame β tra il carbonio 1 e il carbonio 6

Nel caso in cui venga a mancare il glucosio si attiva una serie di reazioni. Una quantità molto piccola di lattosio riesce ad entrare nella cellula batterica. Alcuni enzimi lo modificano nella forma isomerizzata **allolattosio**. L'unica differenza sta nel legame che unisce i due zuccheri. Nel lattosio è di tipo β (1 \rightarrow 4) e nell'allolattosio è di tipo β (1 \rightarrow 6).

La regolazione genica: operone lac

Operone lac (3)

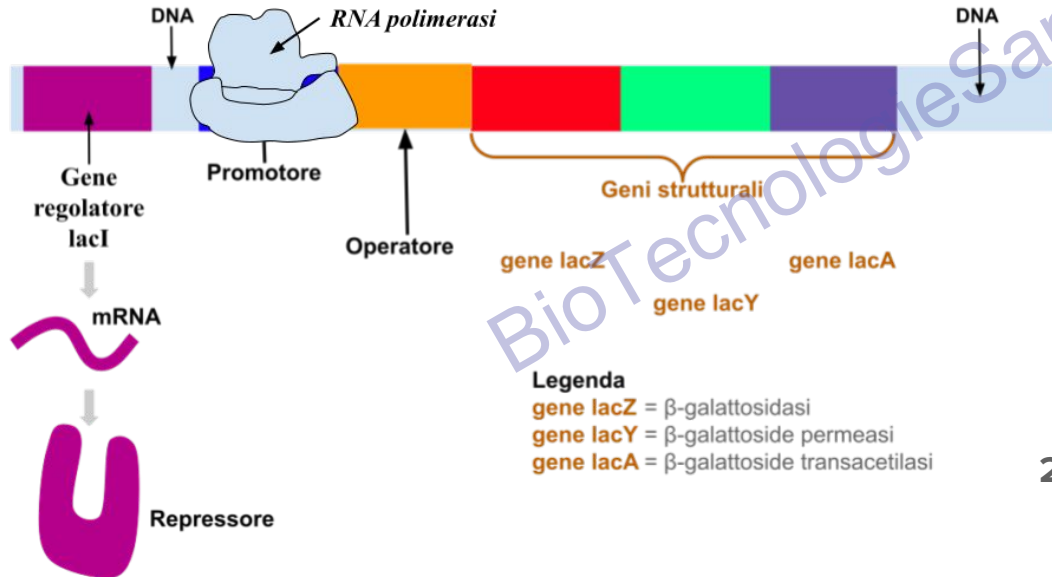


Di fatto l'allolattosio diventa l'induttore dell'operone lac. Si lega al repressore modificandone la conformazione e causando così il suo distacco dall'operatore.

- Legenda**
- gene lacZ = β -galattosidasi
 - gene lacY = β -galattoside permeasi
 - gene lacA = β -galattoside transacetilasi

La regolazione genica: operone lac

Operone lac (4)



21

A questo punto l'RNA polimerasi può legarsi al promotore ed avviare la trascrizione con tutte le tappe che conosciamo. Alla trascrizione seguirà la traduzione e la sintesi completa dei tre enzimi che permetteranno alla cellula batterica di utilizzare il lattosio come fonte di carbonio e di energia.

La regolazione genica: operone lac

Chiediamoci ora che importanza può avere la conoscenza dell'operone lac. I motivi sono diversi e tutti significativi.

- La vita è molto complessa e per arrivare a qualsiasi applicazione pratica è essenziale conoscere i principali processi dei vari organismi.
- Tra le prime applicazioni pratiche basate sull'operone lac va ricordato il processo biotecnologico che ha consentito di produrre diversi ormoni proteici umani utilizzando il piccolissimo batterio *Escherichia coli*.

La regolazione genica: operone lac

Ad esempio il gene umano dell'insulina viene inserito in un plasmide da trasferire poi nel batterio. Ma insieme al gene deve essere aggiunto qualcosa che il batterio legge come suo perché proceda nella sintesi proteica.

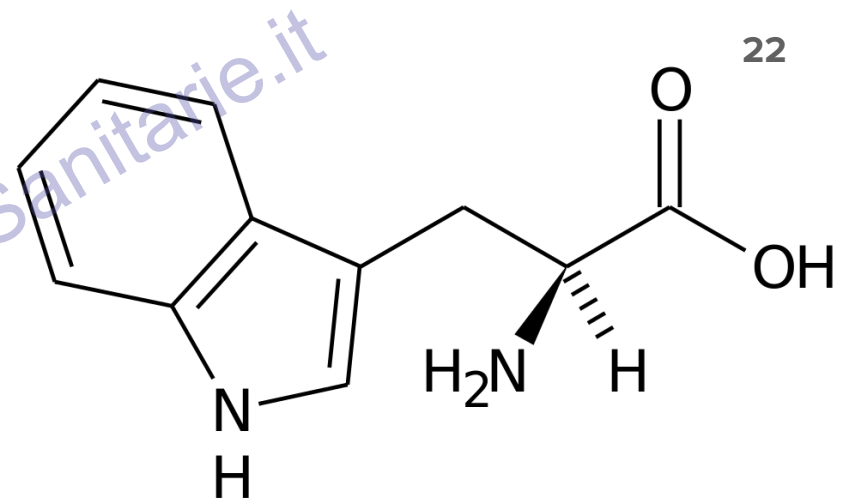
L'operone lac, ridotto da tre a un gene strutturale, è stata un'ottima idea che ha consentito di risolvere diversi problemi procedurali e che garantisce una produzione di insulina sicura per la salute umana ma anche economica.

Infatti i batteri si moltiplicano a ritmi esponenziali, possono essere coltivati in bioreattori di centinaia di litri di terreno e di coltura e costano pochissimo.

Sono tantissime le applicazioni biotecnologiche che sfruttano l'operone lac

La regolazione genica: operone triptofano

L'operone lac è un sistema di controllo inducibile ma, come abbiamo già visto, esiste anche un sistema di controllo per repressione e l'esempio che esamineremo riguarda il triptofano. Il triptofano è un aminoacido che viene utilizzato nella sintesi di numerose proteine.



Formula di struttura del triptofano

La regolazione genica: operone triptofano

L'operone triptofano ha la stessa struttura dell'operone lac. Riconosciamo:

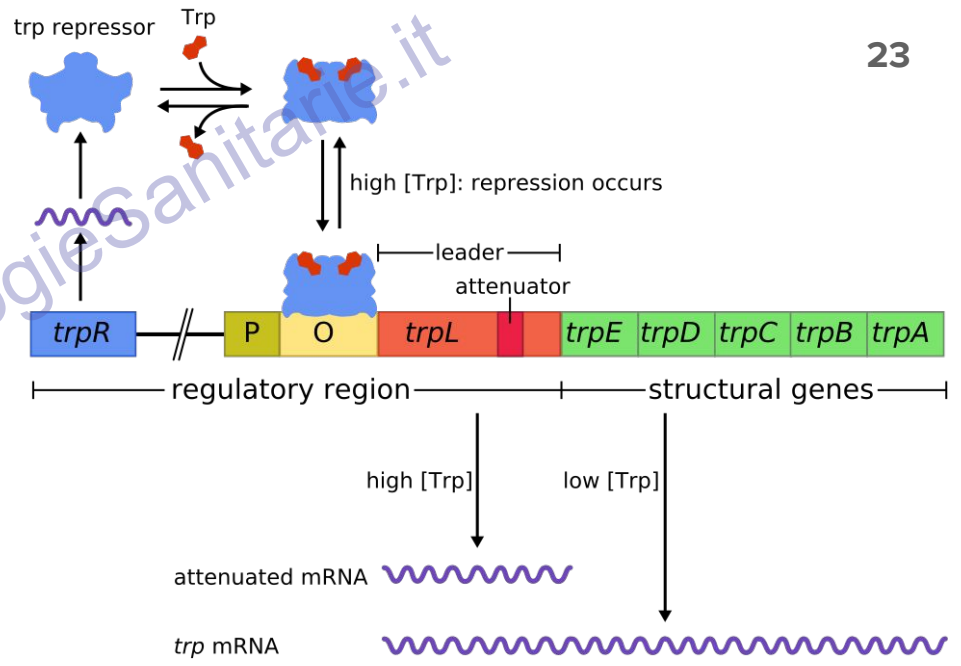
P = *promotore*

O = *operatore*

trpE, trpD, trpC, trpB, trpA

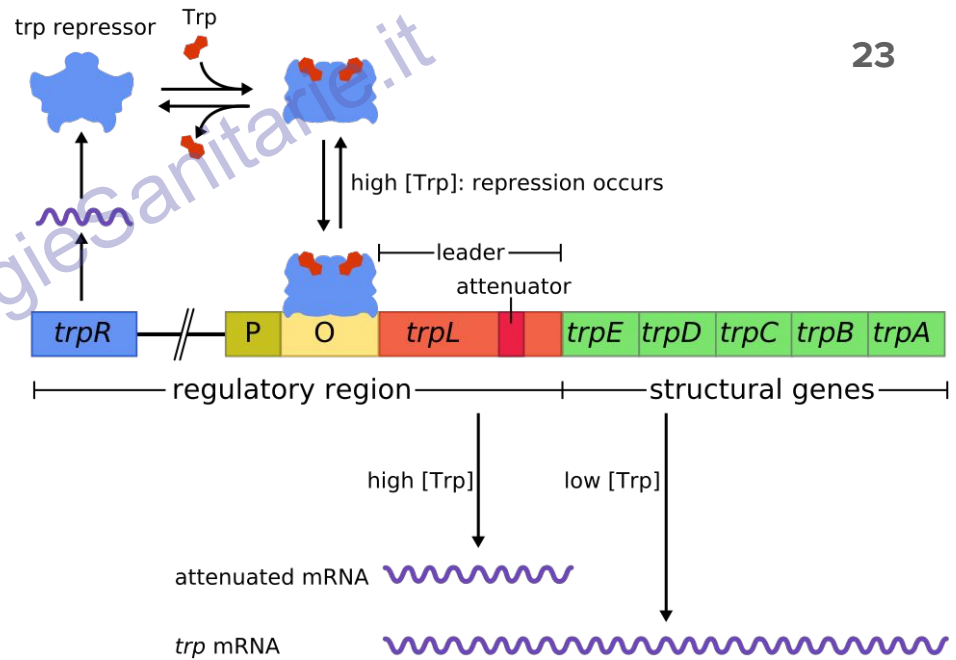
= 5 *geni strutturali*

trpR = *gene regolatore che sintetizza il repressore (trp repressor)*



La regolazione genica: operone triptofano

L'intero sistema è molto complesso. Semplificando si può dire che il repressore è normalmente inattivo, cioè incapace di legarsi all'operatore. Quando il triptofano è sintetizzato in quantità eccessiva le sue molecole si legano al repressore modificandone la conformazione e inducendo il suo legame con l'operatore. Questo blocca la trascrizione. Il processo è un ottimo esempio di feedback negativo.



La regolazione genica: procarioti vs eucarioti

BioTechnology's Sanitarie.it

La regolazione genica: procarioti vs eucarioti

Concludiamo l'argomento della regolazione genica facendo un rapido confronto tra procarioti ed eucarioti

Procarioti

- La regolazione avviene prevalentemente a livello della trascrizione
- La finalità è legata al risparmio energetico
- La conseguenza è una rapida risposta alle variazioni ambientali legata anche alla rapida crescita e al miglior utilizzo delle risorse.

La regolazione genica: procarioti vs eucarioti

Negli **eucarioti** la situazione è decisamente diversa per tanti motivi.

- Il genoma è di maggiori dimensioni, più complesso e compartimentato. Anche la sua struttura è organizzata in modo diverso.
- L'mRNA, come abbiamo visto, è più stabile.
- Ci sono da tenere in debito conto le modificazioni post-trascrizionali e post-traduzionali delle proteine.
- Il turnover delle proteine (degradazione e sintesi) è diverso.
- Mancano, a quanto si sa fino ad oggi, gli operoni, salvo qualche rara eccezione.

La regolazione genica: procarioti vs eucarioti

Negli eucarioti quindi ci sono molteplici livelli di regolazione genica che parte fin dal livello di avvolgimento del DNA per passare poi attraverso la trascrizione, le modifiche post trascrizionali, il passaggio dell'mRNA dal nucleo al citoplasma, la traduzione e le modifiche post-traduzionali. Per quanto riguarda il primo punto il DNA nel nucleo è controllato da precisi meccanismi epigenetici che sono legati all'ambiente. Tra tutti ricordiamo la metilazione del DNA (aggiunta di un gruppo metile alla base azotata citosina) e il controllo del livello di avvolgimento del DNA che porta alla situazione dei geni switch on (acetilazione degli istoni) e switch off (metilazione della citosina). Tutti argomenti trattati nella pagina “[Dal nucleo ai ribosomi: la sintesi proteica](#)” (slide 15→21).

La regolazione genica: procarioti vs eucarioti

Negli eucarioti la trascrizione si può avviare solo quando intervengono i **fattori di trascrizione** e i **fattori accessori** grazie ai quali l'RNA polimerasi è in grado di riconoscere la sequenza precisa del DNA e legarsi ad essa. Spesso poi intervengono anche altri fattori (**enhancer**), a volte decisamente lontani dal tratto di DNA coinvolto nel processo, che provocano dei ripiegamenti ad ansa del DNA; ciò rende il lavoro dell'RNA polimerasi più veloce.

Il trascritto primario è un pre-mRNA che subisce diverse modificazioni.

Il primo passo è l'eliminazione degli introni (**splicing**) con l'aiuto di piccole particelle ribonucleoproteiche (**snRNP** → pronuncia snarp) che riconoscono le estremità di questi frammenti e, dopo averle piegate, riescono ad allontanarle.

La regolazione genica: procarioti vs eucarioti

In qualche caso il taglio degli introni porta a più mRNA che a loro volta daranno origine a prodotti proteici diversi (**splicing alternativo**).

Dell'inserimento del cappuccio (molecole di guanina trifosfato) all'estremità 5' dell'mRNA e della poliadenilazione all'estremità opposta abbiamo parlato nelle slide 45 e 46 dedicate alla sintesi proteica in questa presentazione; ulteriori informazioni nella presentazione a cui porta il link riportato nella slide 91.

Sappiamo anche la finalità per cui vengono effettuate negli eucarioti.

La regolazione genica: procarioti vs eucarioti

Un ulteriore controllo può essere fatto sull'mRNA maturo prima che venga utilizzato nella traduzione.

Per diverse ragioni nell'economia cellulare può essere necessario degradarlo. A questo pensano delle piccole molecole di RNA non codificanti che sono state trovate in molti organismi.

Sono costituite da 18-22 nucleotidi e denominate **miRNA** (micro RNA). Hanno il compito di riconoscere frammenti particolari di mRNA da cui avviare la degradazione. Sono ancora in fase di studio. Alcuni di questi potrebbero essere coinvolti in alcune patologie tra cui i tumori.

La regolazione genica: procarioti vs eucarioti

Un'altra categoria interessante di molecole di RNA, questa volta a doppio filamento e costituite da 19-21 nucleotidi sono i **siRNA** (dall'inglese short o small interfering RNA, cioè RNA interferente breve). Anch'essi degradano l'mRNA dopo la trascrizione impedendo così la traduzione. In altre parole inducono il silenziamento genico. Sono oggetto di numerosi studi. Per il momento si è accertata la loro presenza in alcuni meccanismi antivirali e nella determinazione dello stato della cromatina.

La regolazione genica: procarioti vs eucarioti

Interessante è anche ciò che avviene dopo la traduzione.

Abbiamo accennato al turnover delle proteine. Le proteine hanno un'emivita (da mezzo minuto a molti giorni) molto diversa che dipende da molti fattori. Inoltre esistono proteine difettose La loro degradazione è affidata a diversi meccanismi. Tra questi vale la pena citare quello che si basa sull'**ubiquitina** che si attiva soprattutto con le proteine a brevissima emivita come la p53 o quelle difettose. L'ubiquitazione è una modifica post-traduzionale.

La regolazione genica: procarioti vs eucarioti

La molecola di ubiquitina si lega in più unità (coda poliubiquitina) alla proteina che deve essere degradata.

Il complesso che si forma viene riconosciuto dal **proteasoma**.

Il proteasoma è un complesso enzimatico di grosse dimensioni, senza alcuna membrana biologica delimitante, che si incarica della degradazione della proteina dopo aver liberato le molecole di ubiquitina. L'ubiquitina funziona quindi da marcatore.

Gli aminoacidi liberati possono essere a questo punto riutilizzati.

La regolazione genica: procarioti vs eucarioti

La molecola dell'ubiquitina è stata molto studiata nei diversi regni e si è notato che è sempre la stessa sia nei lieviti che nell'uomo. Praticamente ha attraversato tutta l'evoluzione senza modifiche.

Le biotecnologie sono il settore in cui tutto ciò che si conosce sulla regolazione genica trova il suo campo di applicazione, dalla terapia genica all'editing genomico.

La ricombinazione genica

BioTechnologySanitarie.it

La ricombinazione genica

I procarioti, sia i batteri che gli archeobatteri, si riproducono per via **asessuata**. Non godono quindi della classica ricombinazione che si verifica negli eucarioti a riproduzione sessuata (meiosi tra i cromosomi omologhi).

Ogni cellula procariote dividendosi per scissione binaria da origine ad una popolazione di individui identici dal punto di vista genetico.

Nonostante questo, nel corso del tempo, i procarioti hanno sviluppato diverse modalità con cui si scambiano i geni con un **trasferimento orizzontale** (HGT = horizontal gene transfer) da una cellula ad un'altra e non alla progenie (verticale): trasduzione, trasformazione e coniugazione.

La ricombinazione genica: trasformazione

Trasformazione

In natura la trasformazione si verifica quando un batterio acquisisce DNA di un altro batterio che si è liberato dopo la sua morte.

In genere il processo si verifica tra individui della stessa specie.

Attualmente sono più di 60 le specie batteriche in cui è stata dimostrata la trasformazione tra cui *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*.

Esiste un limite alla trasformazione ed è la **competenza**. In che cosa consiste? essa viene indotta da un'alta densità della popolazione o da limiti nella disponibilità di nutrienti. I due aspetti si manifestano in genere nella fase stazionaria di crescita.

La ricombinazione genica: trasformazione

Trasformazione

La trasformazione può essere vista come l'interazione di due DNA omologhi di due individui per arrivare ad un DNA ricombinante da trasferire alla progenie.

La trasformazione in natura è stata attentamente studiata e applicata in laboratorio nella tecnologia del DNA ricombinante. Tanto è vero che il termine trasformazione viene utilizzato per indicare il trasferimento del gene di interesse in una cellula ospite.

La ricombinazione genica: coniugazione

Coniugazione

Nella coniugazione il trasferimento del materiale genetico avviene per contatto diretto tra due cellule batteriche. Vi sono quindi una cellula donatrice e una cellula ricevente. Sono coinvolti **da uno a più pili** attraverso cui la cellula batterica donatrice trasferisce un suo elemento genetico che può essere un **plasmide** o un **trasposone**. La maggior parte dei plasmidi è dotata di sistemi che garantiscono che la cellule ricevente non abbia già elementi simili.

La ricombinazione genica: coniugazione

Coniugazione

La coniugazione è spesso favorevole per il ricevente perché trasferisce la resistenza agli antibiotici, la tolleranza agli xenobiotici, la possibilità di utilizzare nuovi metaboliti ...

Perché si possa realizzare la coniugazione il batterio donatore deve avere un plasmide particolare, detto **plasmide F**. In questo plasmide sono presenti geni che codificano per le proteine necessarie a:

- costruire il pilo o i pili sessuali;
- trasferire una copia del plasmide;
- replicare i plasmidi.

Le cellule che possiedono il plasmide F sono dette **cellule F⁺**, quelle senza **F⁻**. Vediamo ora il processo nei dettagli in due situazioni diverse.

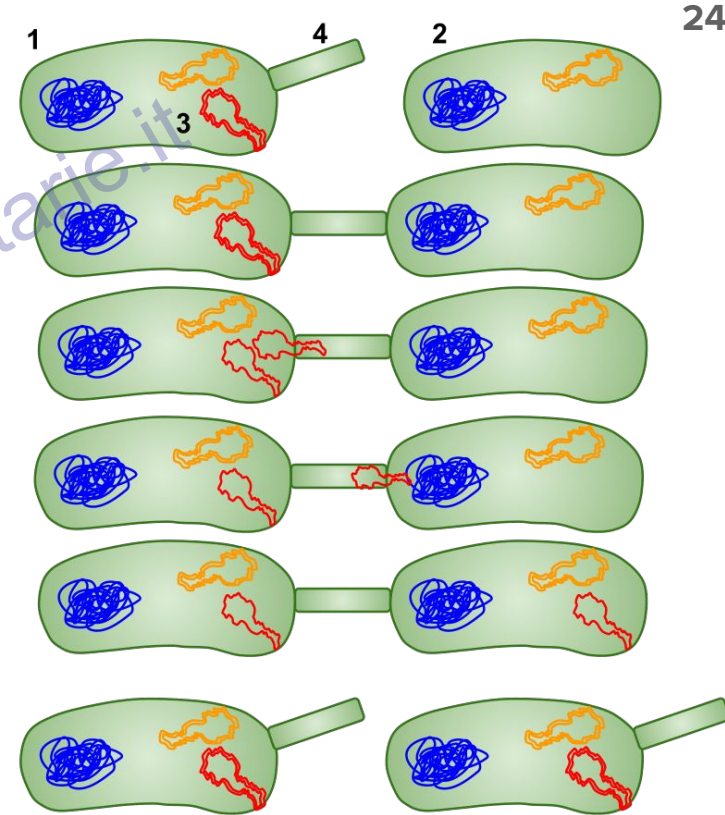
La ricombinazione genica: coniugazione

Coniugazione

Prima di tutto ci occupiamo della **coniugazione cosiddetta classica** in cui si ha il passaggio del plasmide F da una cellula F^+ ad una cellula F^- . Seguiamo il disegno accanto dall'alto verso il basso.

Il numero **1** indica il **donatore**. Al suo interno si può vedere il plasmide F (in rosso, numero **3**). Il numero **4** segnala il pilo.

Il numero **2** è relativo al **ricevente** in cui si possono notare il genoma (blu) e un plasmide generico (entrambi presenti anche nel donatore).

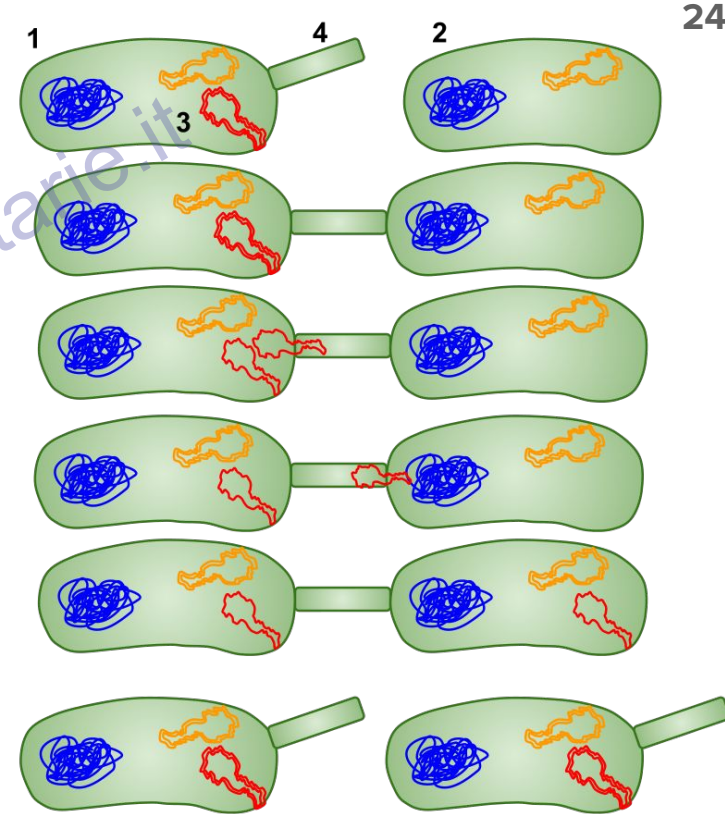


La ricombinazione genica: coniugazione

Coniugazione

La sequenza delle immagini evidenzia i vari step. Il pilo del donatore prende contatto con una proteina specifica di membrana del ricevente e si forma il **tubo di coniugazione** (una struttura cava in cui è presente citoplasma).

Attraverso questo tubo passa solo uno dei due filamenti di DNA del plasmide F; in questo modo il donatore non perde geni. Una volta raggiunto il ricevente il filamento del plasmide F si autoreplica. L'autoreplicazione si verifica anche nel donatore. La cellula ricevente in questo modo diventa anch'essa F^+ .

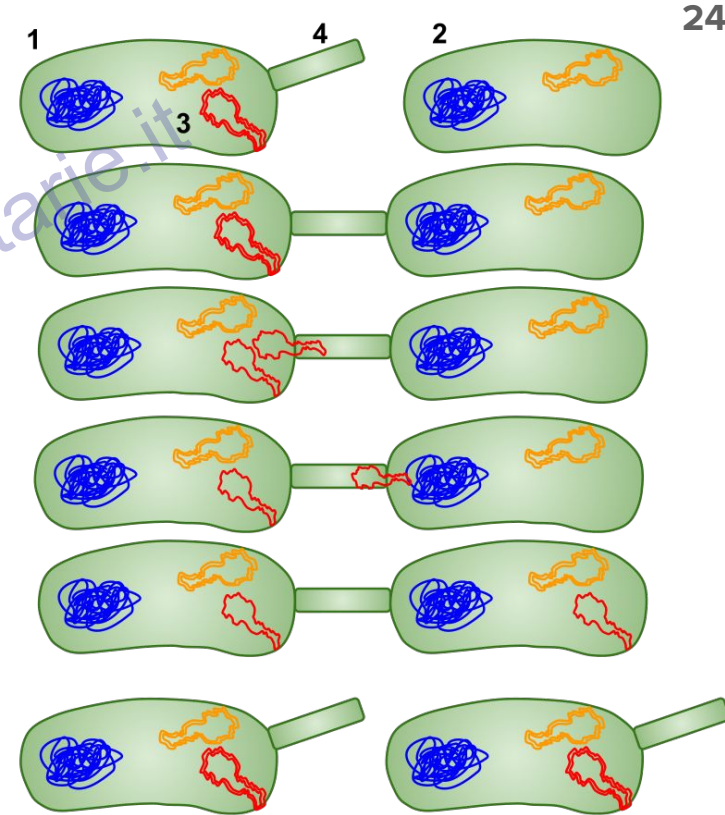


La ricombinazione genica: coniugazione

Coniugazione

Il disegno non è del tutto preciso perché in realtà il filamento che passa attraverso il tubo di coniugazione non è circolare.

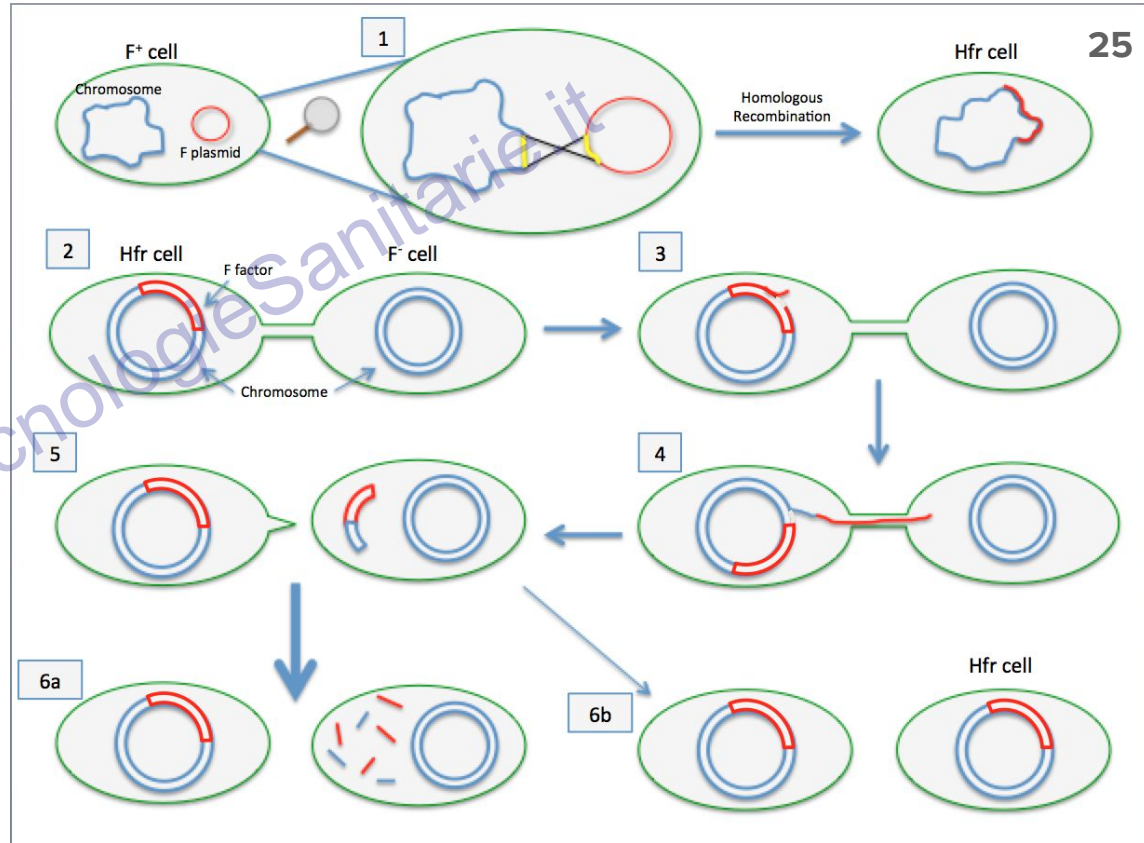
I batteri possiedono diversi enzimi che tagliano e cuciono il DNA per cui ciò che transita da una cellula all'altra è un filamento di DNA lineare. Il DNA circolare del plasmide F infatti apre uno dei suoi due filamenti in corrispondenza dell'inizio del gene per il trasferimento. Il filamento lineare passa attraverso il tubo di coniugazione e, una volta all'interno del ricevente, si circularizza e si autoreplica.



La ricombinazione genica: coniugazione

Coniugazione

Passiamo ora ad esaminare un processo leggermente più complesso. Il plasmide F della cellula donatrice in realtà è un **episoma**, cioè un plasmide che si può integrare nel cromosoma batterico con un meccanismo di ricombinazione omologa analogo a quello che si verifica nella profase della meiosi I negli eucarioti. Nella figura 25 la parte ① mette in evidenza questa integrazione. In giallo vengono indicate le sequenze di basi identiche tra cromosoma e plasmide

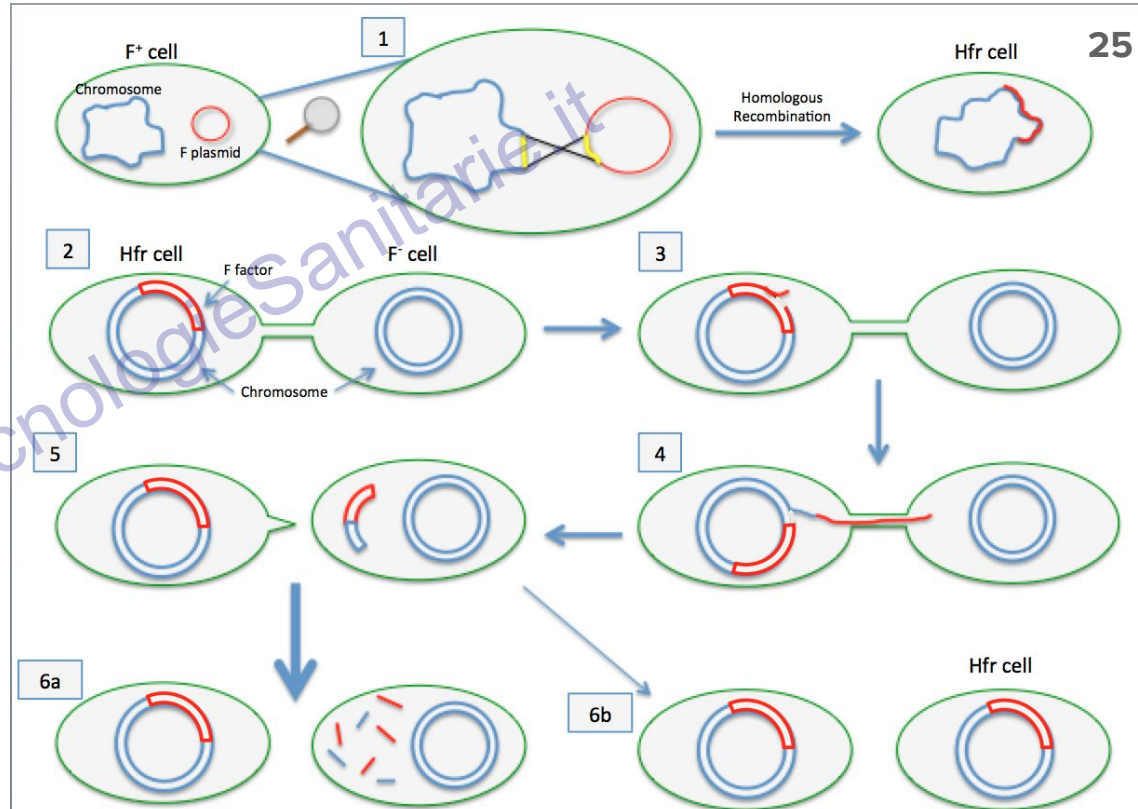


La ricombinazione genica: coniugazione

Coniugazione

Si crea così una **cellula Hfr** (alta frequenza di ricombinazione), che viene indicata dopo la freccia blu nella parte ① della fig. 25

Vediamo, a questo punto, cosa succede quando la coniugazione si verifica tra una cellula **Hfr** ed una cellula **F⁻**.



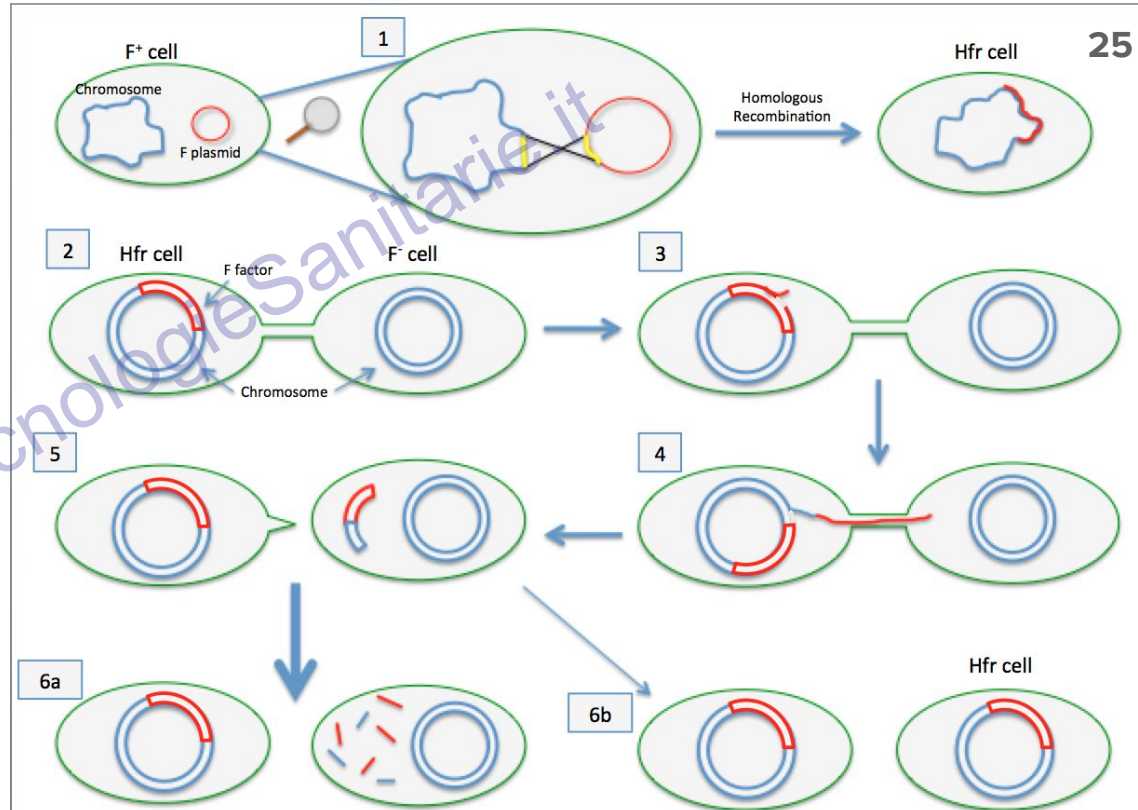
La ricombinazione genica: coniugazione

Coniugazione

② La cellula **Hfr** forma un pilo e si collega alla cellula ricevente **F⁻**

Tra le due cellule si forma il ponte citoplasmatico che già conosciamo come **tubo di coniugazione**.

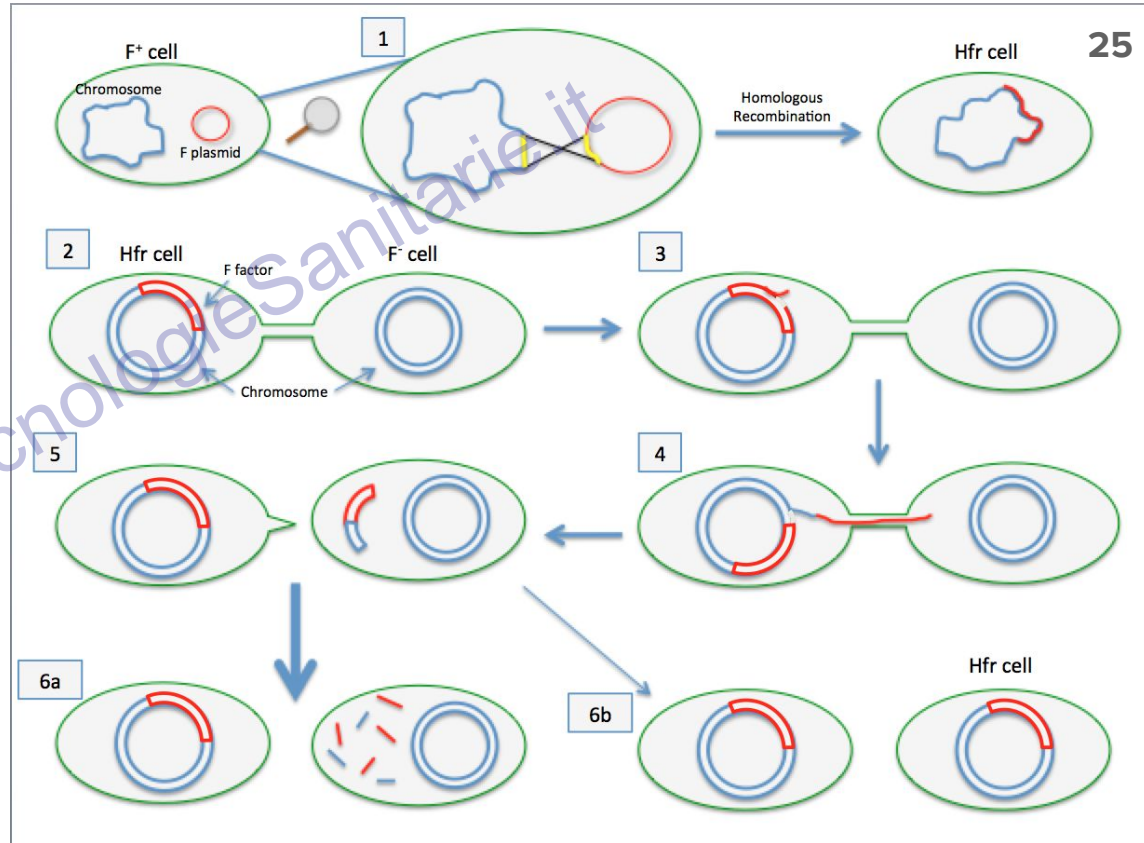
③ Uno dei due filamenti dell'episoma integrato nel DNA viene tagliato in corrispondenza dei geni per il trasferimento.



La ricombinazione genica: coniugazione

Coniugazione

④ Il filamento tagliato inizia a essere trasferito dalla cellula Hfr alla cellula ricevente mentre il secondo filamento viene replicato. In questo modo la cellula donatrice non perde geni. Nel trasferimento però in questo caso sono coinvolti anche geni del cromosoma batterico in prossimità del plasmide F integrato. Ecco perché la cellula donatrice è detta Hfr, ad alta frequenza.



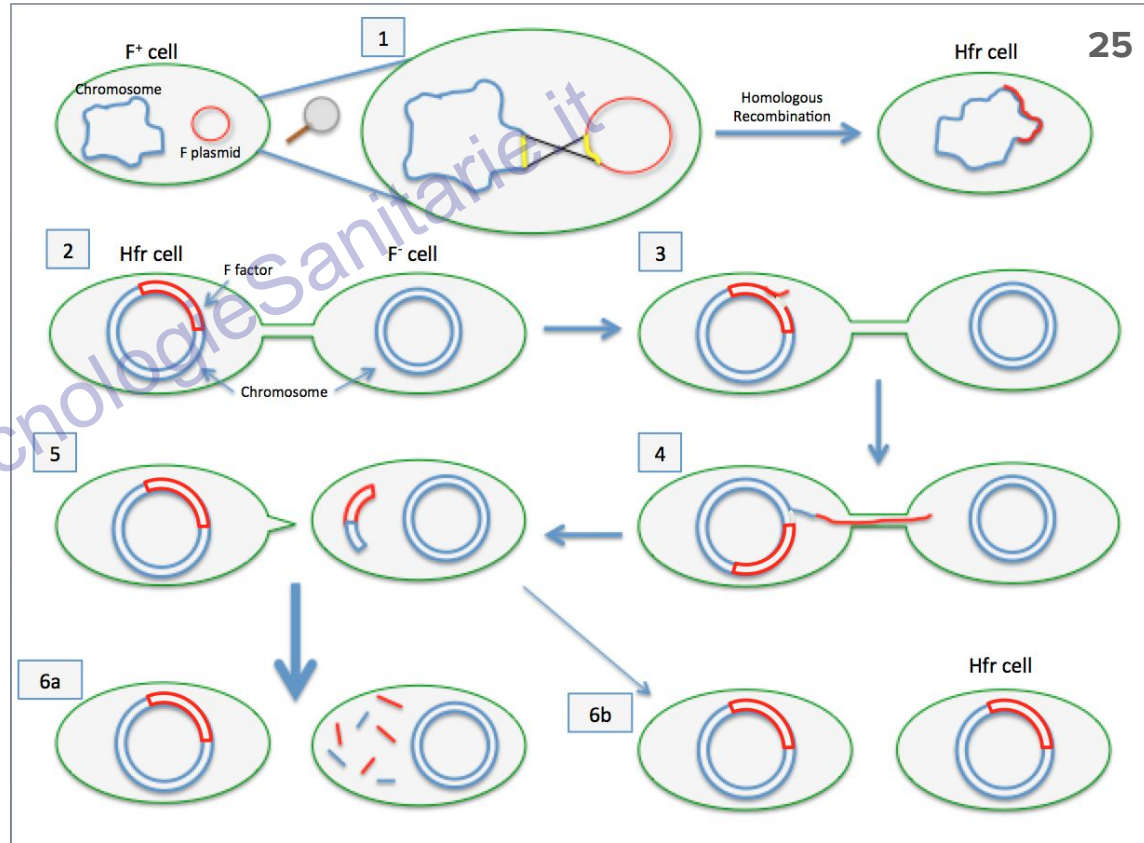
La ricombinazione genica: coniugazione

Coniugazione

Teoricamente il cromosoma del donatore potrebbe essere trasferito integralmente ma questo non succede mai perché il tempo del processo è molto limitato e il tubo di coniugazione non è stabile.

Inoltre i geni del plasmide F non sempre vengono trasferiti completamente.

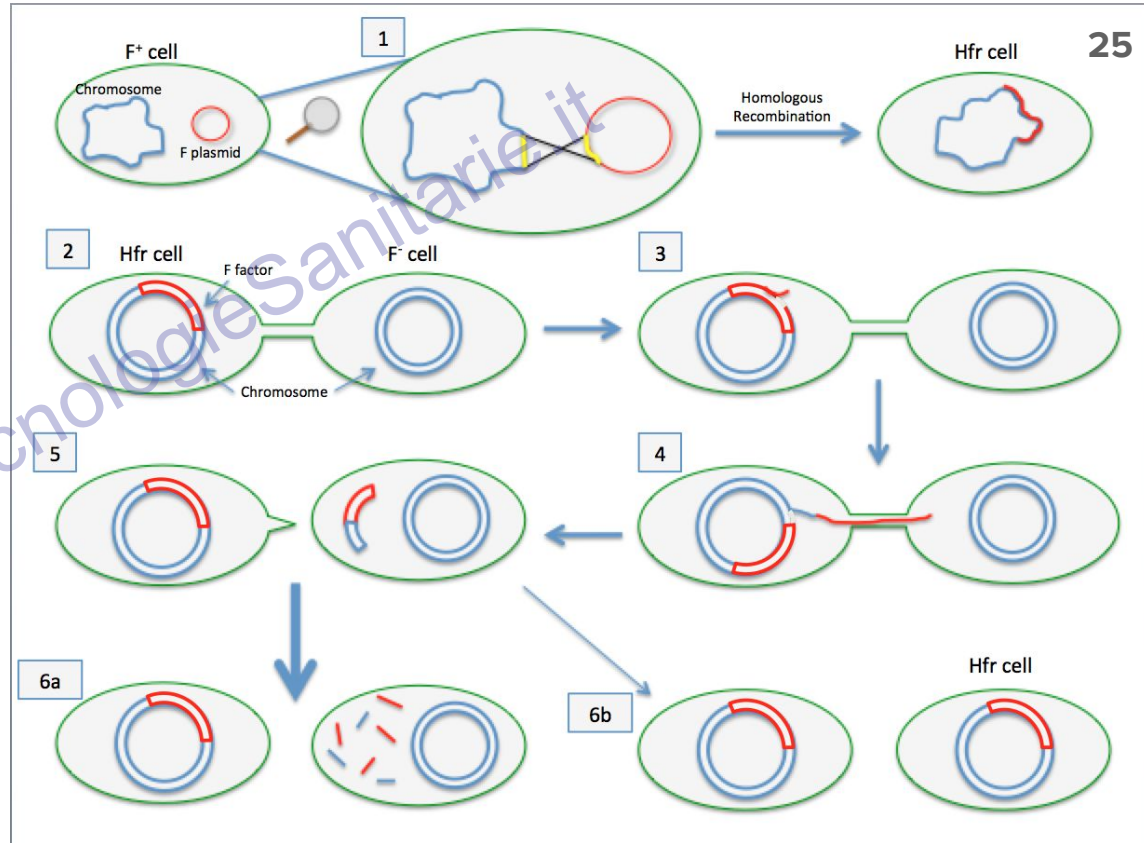
⑤ Il pilo sessuale si stacca dalla cellula ricevente e si ritrae.



La ricombinazione genica: coniugazione

Coniugazione

Per tutto quanto è stato detto, alla fine, si possono verificare due casi. Il primo, il più frequente, è mostrato dalla prima parte della figura ⑥. Questa cellula ricevente non si trasformerà in **Hfr** e quindi non potrà, a sua volta, diventare donatrice perché non ha ricevuto tutti i geni necessari. Cosa che invece si verifica nel secondo caso, figura ⑥ parte b



La ricombinazione genica: trasduzione

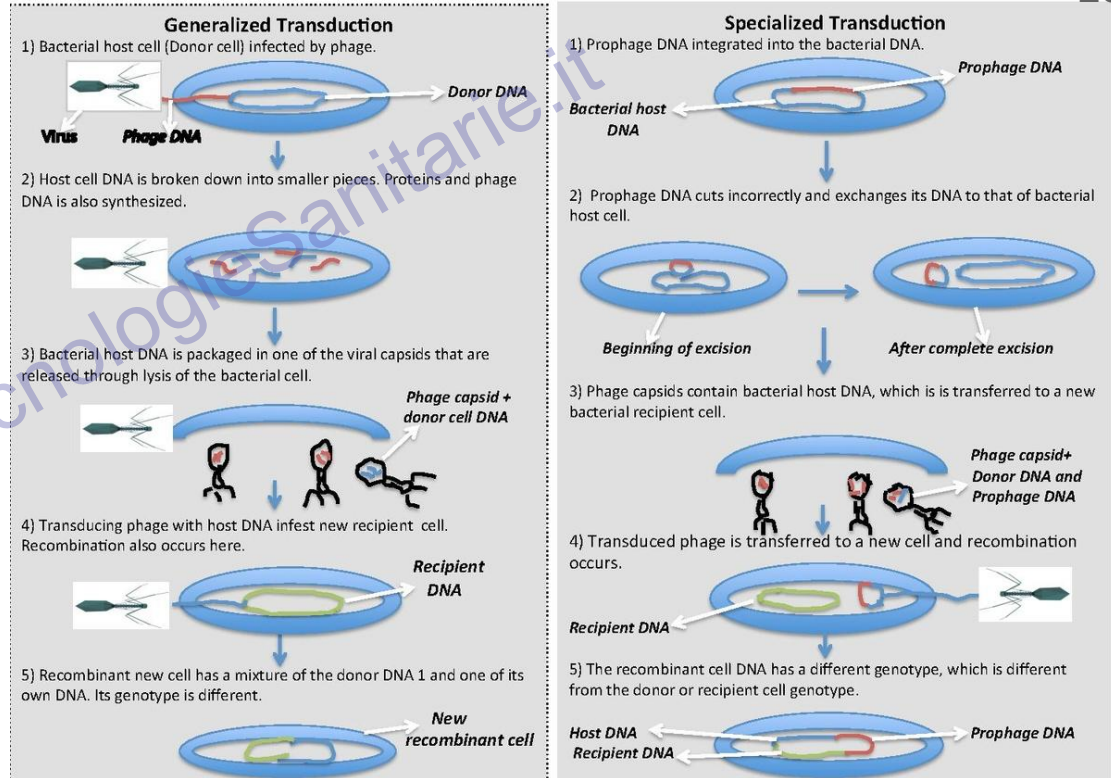
Trasduzione

La trasduzione comporta il trasferimento di geni da un batterio ad un altro grazie ai virus tipici dei batteri cioè i batteriofagi o fagi.

Durante il ciclo litico i fagi producono separatamente i capsidi e il loro DNA. I capsidi vengono sintetizzati sempre prima e può capitare che in capsidi vuoti venga inglobato un frammento più o meno grande del DNA del batterio ospite.

TRANSDUCTION PROCESS

26



La ricombinazione genica: trasduzione

Trasduzione

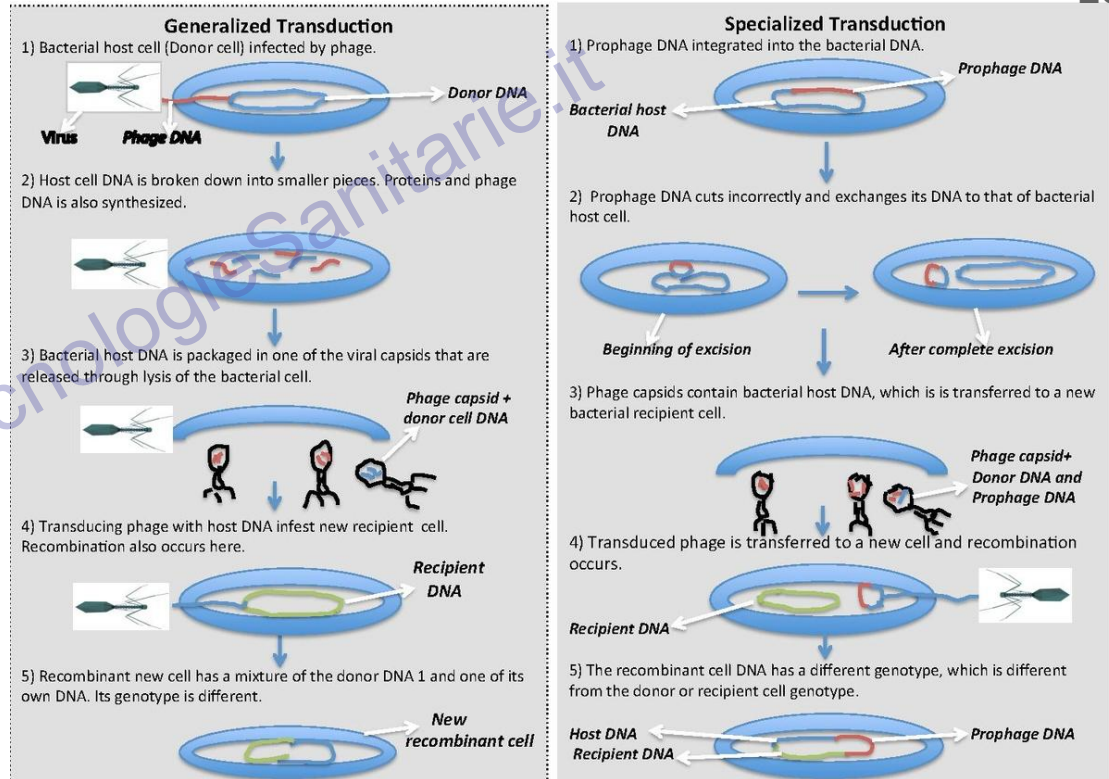
Il capside con il frammento di DNA batterico nella successiva infezione potrà così trasferire i geni batterici in un altro individuo contribuendo alla ricombinazione genica.

Questo tipo di **trasduzione** è detta **generalizzata**.

Esiste anche un meccanismo di **trasduzione specializzata** che coinvolge i **profagi**.

TRANSDUCTION PROCESS

26



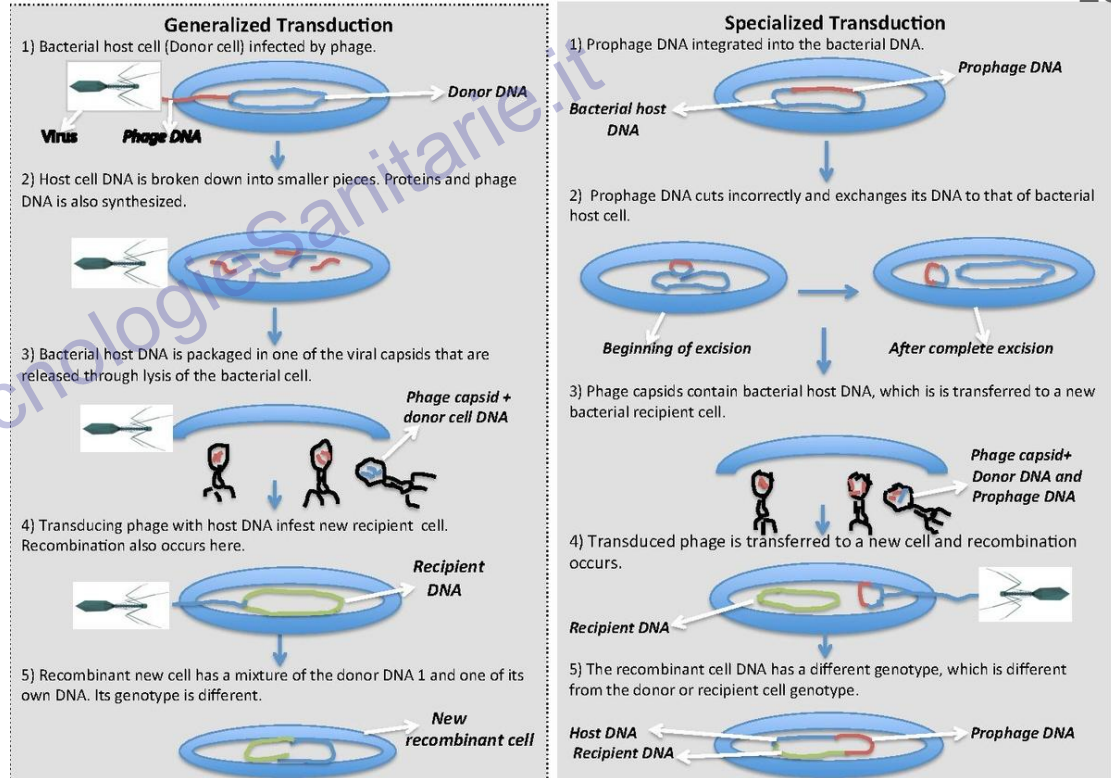
La ricombinazione genica: trasduzione

Trasduzione

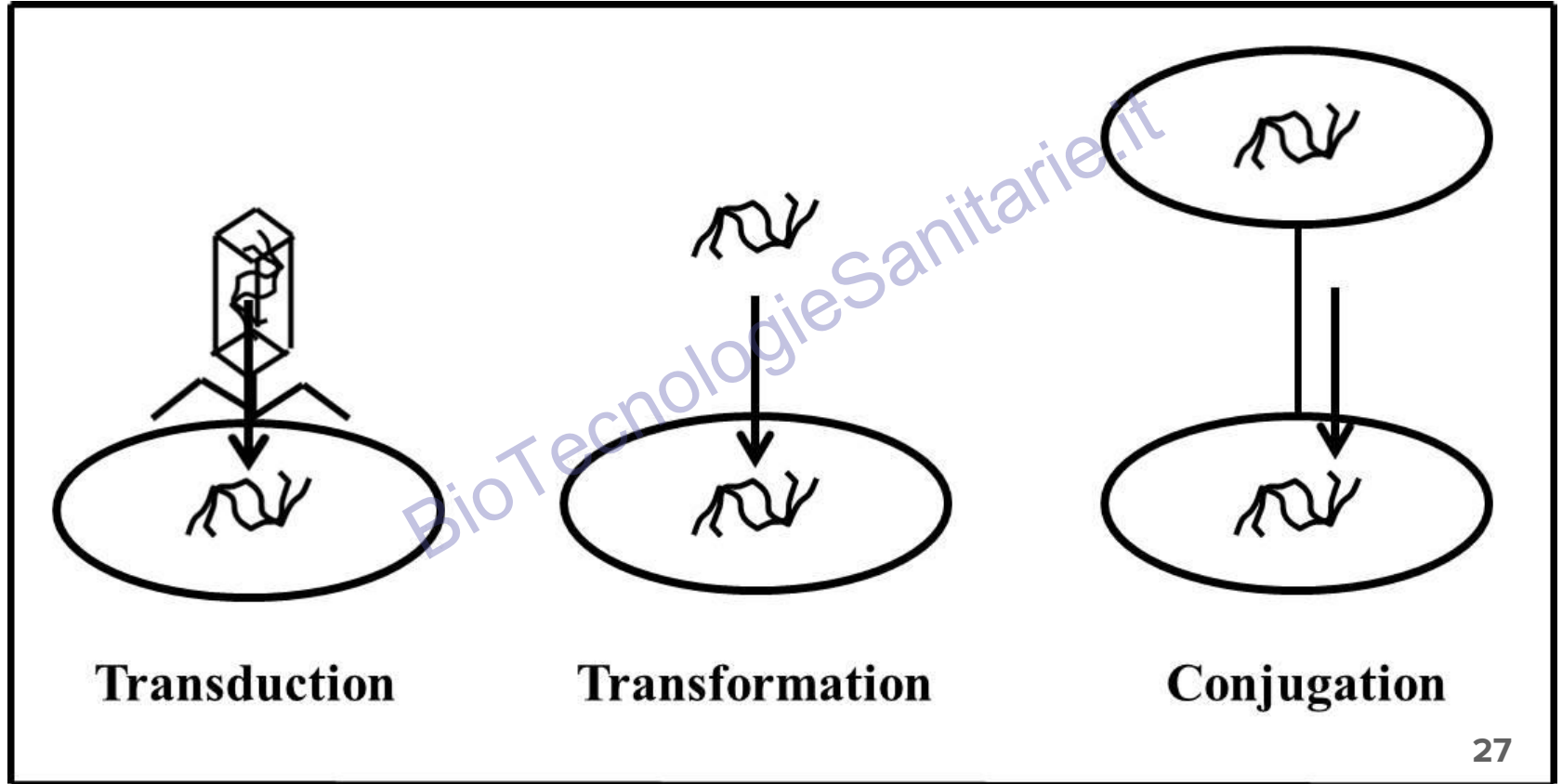
Il profago è in pratica il genoma di un fago lisogeno integrato nel cromosoma del batterio infettato. Quando il profago si stacca dal cromosoma batterico stacca un frammento contiguo di cromosoma batterico. Quindi il frammento non è casuale. Da qui il nome di trasduzione specializzata.

TRANSDUCTION PROCESS

26



La ricombinazione genica: schema conclusivo



La ricombinazione genica: conclusioni

Vista la mancanza di riproduzione sessuale la ricombinazione genica ha una notevole importanza per la sopravvivenza in un ambiente che cambia continuamente.

Un altro processo che garantisce l'adattamento è la mutazione casuale ma la frequenza con cui le mutazioni si verificano nei batteri è pari a

$$10^{-7} - 10^{-11} / n \text{ bp}$$

Frequenza bassa anche se costante. Quindi l'acquisizione di nuove caratteristiche attraverso il trasferimento orizzontale di geni diventa una strategia vincente.

L'evoluzione batterica si è basata e si basa sulla diffusione di geni di resistenza, di geni di virulenza e di scambi di geni metabolici.

Author credits

- 1 Rappresentazione del numero di geni nei vari Regni** - By Thomas Shafee - Own work from references:↑ Watson, JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. (2004). “Ch9-10”, Molecular Biology of the Gene, 5th ed., Peason Benjamin Cummings; CSHL Press.↑ Integr8 - A.thaliana Genome Statistics:↑ Understanding the Basics. The Human Genome Project. Retrieved on 26 April 2015.↑ WS227 Release Letter. WormBase (10 August 2011). Retrieved on 2013-11-19.↑ (5 April 2002). "A Draft Sequence of the Rice Genome (Oryza sativa L. ssp. indica)",. Science 296 (5565): 79–92. DOI:10.1126/science.1068037.↑ (9 April 1981). "Sequence and organization of the human mitochondrial genome",. Nature 290 (5806): 457–465. DOI:10.1038/290457a0.↑ (24 March 2000). "The Genome Sequence of Drosophila melanogaster",. Science 287 (5461): 2185–2195. DOI:10.1126/science.287.5461.2185. ↑ (2010). "Between a chicken and a grape: estimating the number of human genes",. Genome Biology 11 (5): 206. DOI:10.1186/gb-2010-11-5-206., CC BY 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=39784224>

Author credits

2	Genoma minimo di Syn3 - By Thomas Shafee - Own work, CC BY 4.0, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=48343444
3	Cellula eucariote e procariote a confronto - https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Figure_14_02_06_new.jpg
4	RNA polimerasi al lavoro durante la trascrizione in un batterio - By Genomics Education Programme - Process of transcription, CC BY 2.0, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=50542917
5	RNA polimerasi in E. coli - https://www.rcsb.org/structure/7MKP
5a 5b	Disegni schematici della RNA polimerasi di E. coli in forma inattiva e attiva - di Loretta Sebastiani - R&D Studio Associato
6	Fattore sigma 70 in E. coli - By Jawahar Swaminathan and MSD staff at the European Bioinformatics Institute - http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/images/entry/2h27600.png , displayed on http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/2h27/summary , Public Domain, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=5900363

Author credits

7	Fattore B negli Archaea - By Boghog - Own work, CC BY-SA 4.0, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=70944913
8	Fattore di trascrizione II B negli eucarioti - By Emw - Own work, CC BY-SA 3.0, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=8814666
9	Trascrizione nei procarioti - Disegno di Loretta Sebastiani - R&D Studio Associato
10	Traduzione nei procrioti - https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6e/OSC_Microbio_11_04_TlnInit.jpg
11	Jacques Monod - Di Sconosciuto - http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/196(/ , Pubblico dominio, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=18346872

Author credits

12	François Jacob - Di Sconosciuto - http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1965/ , Pubblico dominio, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=18346825
13	Escherichia coli al microscopio ottico dopo colorazione Gram - Von Y_tambe - Eigenes Werk, CC BY-SA 3.0, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=49533
14	Escherichia coli al microscopio elettronico - Von (Image: Manu Forero) - Bacterial Fimbriae Designed to Stay with the Flow. Gross L, PLoS Biology Vol. 4/9/2006, e314. doi:10.1371/journal.pbio.0040314, CC BY 2.5, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1479172
15	Modello di operone - Disegno di Loretta Sebastiani - R&D Studio Associato
16	Operone lac (1) - Disegno di Loretta Sebastiani - R&D Studio Associato

Author credits

17	Operone lac (2) - Disegno di R&D Studio Associato
18	Struttura molecolare del lattosio - By Telliott at English Wikipedia - Transferred from en.wikipedia to Commons., Public Domain, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=511801
19	Struttura molecolare dell'allolattosio - https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Allolactose%28lac%29.png
20	Operone lac (3) - Disegno di Loretta Sebastiani - R&D Studio Associato
21	Operone lac (4) - Disegno di Loretta Sebastiani - R&D Studio Associato
22	Formula di struttura del triptofano - Di L'utente che ha caricato in origine il file è stato Paginazero di Wikipedia in italiano - Trasferito da it.wikipedia su Commons., Pubblico dominio, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2903407

Author credits

23	Struttura dell'operone triptofano - By Histidine - Own work, CC BY-SA 3.0, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=13443283
24	Coniugazione classica - By KeeperGirl12 - Own work, CC BY-SA 4.0, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=59292718
25	Schema della coniugazione batterica con integrazione del plasmide F nel genoma del donatore - By Ac.shrader - Own work, CC BY-SA 4.0, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=64576675
26	Trasduzione generalizzata e specializzata a confronto - https://en.wikipedia.org/wiki/File:Transduction_illustration.pdf
27	Schema del trasferimento genico orizzontale - https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bacterial_horizontal_gene_transfer.jpg

Sitografia

1	Deinococcus radiodurans: genoma https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC99018/
2	Genetica dei procarioti - www.dsv.unisi.it/sites/st15/files/allegatiparagrafo/07-04-2016/lezione_6.pdf
3	Transposable elements - https://microbiologynotes.org/transposable-elements/
4	Virologia di base - https://www.unife.it/medicina/dietistica/insegnamenti/microbiologia-igiene-e-radioprotezione/modulo-di-microbiologia-e-microbiologia-clinica/a-a-2015-2016/virologia-base
5	Genetica dei procarioti - www.dsv.unisi.it/sites/st15/files/allegatiparagrafo/04-03-2016/genpro_1.pdf

Sitografia

6	Genomi - https://docente.unife.it/silvia.fuselli/dispense-corsi/2.BAG_2015_Genomi.pdf
7	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome
8	Corso di biologia molecolare - www.dir.uniupo.it/pluginfile.php/158165/mod_resource/content/1/lezione_1.pdf
9	Genoma Escherichia coli - https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/prokaryotes/167/
10	Topologia del DNA. Struttura terziaria - https://moodle2.units.it/pluginfile.php/161197/mod_resource/content/1/6-Topologia%20del%20DNA%20BS.pdf
11	Cenni di genomica microbica/batterica - https://elearning.unimib.it/pluginfile.php/589685/mod_folder/content/0/LEZIONE%2032%20-%20genomica%20microbica_batterica_TG_O.pptx.pdf?forcedownload=1

Sitografia

12	The complete sequence of human genome - https://www.science.org/doi/10.1126/science.abj6987
13	https://www.nature.com/scitable/topicpage/genome-packaging-in-prokaryotes-the-circular-chromosome-9113/
14	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17338437/#:~:text=Abstract,through%20modulatory%20effects%20on%20transcription.
15	Principles and concepts of DNA replication in Bacteria, Archaea and Eukarya - https://cshperspectives.cshlp.org/content/5/7/a010108.full
16	Replicazione e ricombinazione del DNA - www.mantorlab.unimi.it/mantorlab/sito/Teaching_files/Lezione%209-%20Replicazione%20e%20ricombinazione%20DNA.pdf
17	Evolution of replicative DNA polymerases in archaea and their contributions to the eukaryotic replication machinery https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4104785/

Sitografia

18	When DNA Polymerases Multitask: Functions Beyond Nucleotidyl Transfer - https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.815845/full
19	Bacterial RNA Polymerase-DNA Interaction—The Driving Force of Gene Expression and the Target for Drug Action https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2016.00073/full
20	RNA polymerase - https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/rna-polymerase
21	Il dogma centrale della biologia molecolare - www.docenti.unina.it/webdocenti-be/allegati/
22	https://didattica-2000.archived.uniroma2.it//MICROGEN/deposito/1213_MG_-13.pdf