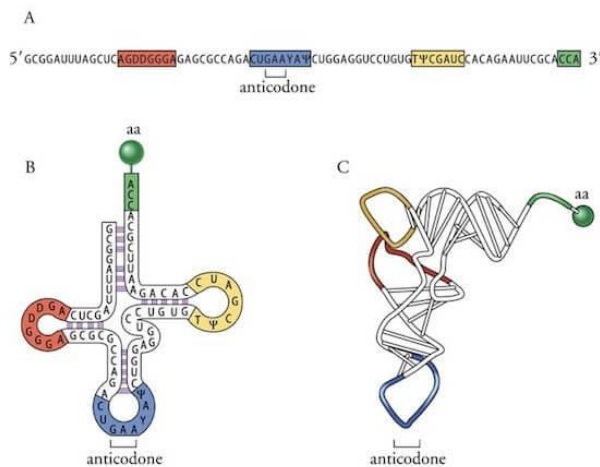
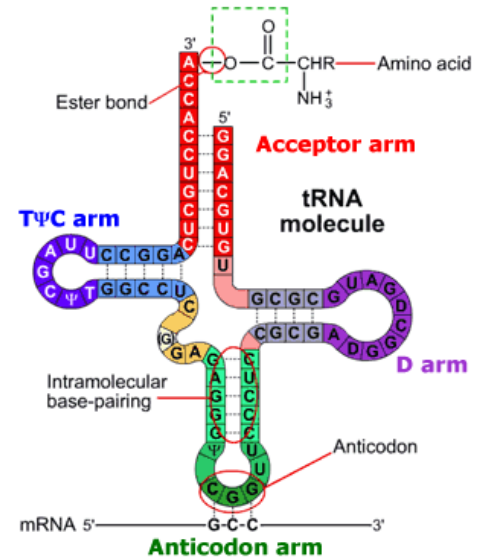


L'RNA transfer

Un fattore chiave di sintesi proteica sono gli RNA transfer. Una molecola di tRNA funziona come adattatore tra l'informazione dei codoni, e la sequenza di amminoacidi. Le sue funzioni sono:

- Carica un amminoacido;
- Si associa alle molecole di mRNA;
- Interagisce con i ribosomi.

Le cellule contengono 40 RNA transfer diversi che servono da accettori per i 20 diversi mRNA, questo significa che alcuni tRNA sono in grado di riconoscere più di un codone appartenenti all'RNA messaggero, grazie al vacillamento del codice genetico. Quindi vi è un appaiamento tra l'anticodone del tRNA e il codone dell'mRNA. I tRNA sono costituiti da una molecola a singolo filamento, cioè un'unica elica di RNA che è ripiegata a formare una struttura tridimensionale (trifoglio); costituita da 4 anse. Quindi la **struttura primaria (A)** è una sequenza di circa 70-90 nucleotidi, che presenta delle regioni complementari che vi si possono appaiare. Quindi è questa complementarietà che permette all'RNA transfer di assumere la particolare struttura a trifoglio. La **struttura secondaria (B)** si ripiega a sua volta in



una **struttura terziaria (C)**, che ha una forma di L, per il sito di legame per un amminoacido ad un'estremità; mentre all'altra estremità avremo il sito di legame dove vi si legherà il codone. Quasi tutti i tRNA hanno questa struttura: abbiamo i **bracci**, i quali includono l'**ansa e lo stelo**, avremo il **braccio accettore** che ha una seconda terminale CCA a cui si legherà l'amminoacido al ribosio dell'adenina terminale; poi avremo il braccio **TΨC**, dove avremo la presenza di una timina anomala, questo braccio interagisce con l'RNA ribosomiale maggiore; poi avremo il **braccio dell'anticodone**, dove vi è presenza la tripletta dell'anticodone al centro dell'ansa che è complementare al codone

dell'mRNA; poi vi è il **braccio D**, detto così per la base modificata diidrouridina; poi abbiamo un altro **braccio** detto **variabile**, proprio perché ha una lunghezza variabile.

Il primo nucleotide del codone 1 è quello che si appaierà con la terza base dell'anticodone. La terza base del codone è spesso variabile ed è quella che si appaierà con la terza base dell'anticodone. I primi 2 legami tra il codone e l'anticodone sono due legami forti a differenza dell'ultimo che è più debole, questo legame debole è fondamentale perché permette una rapida dissociazione del codone dall'anticodone.

AMMINOACIL-tRNA SINTETASI

Il legame estereo dell'amminoacido con il braccio accettore dell'tRNA è mediato da degli enzimi chiamati amminoacil-tRNA sintetasi; ci sono differenti tipi di enzimi, ognuno specifico per ogni amminoacido. Questi enzimi sono divisi in due classi sulla base del sito attivo: abbiamo gli enzimi di **classe 1** che in genere sono dei monomeri e catalizzano la reazione legando l'amminoacido all'2' OH del tRNA, e sono specifici per determinati amminoacidi; poi abbiamo quelli di **classe 2**, che sono dei dimeri dei tetrameri che legano l'amminoacido all'3' OH del RNA transfer. Un tRNA scarico viene amminoacilato per formare un tRNA carico.

La reazione:

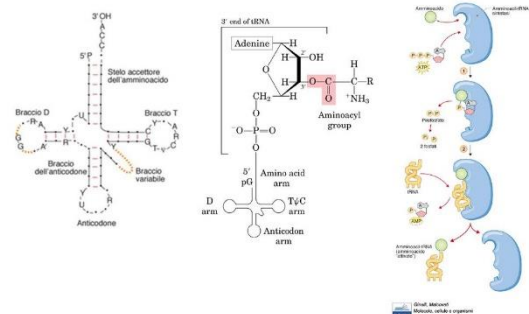
- 1) l'amminoacido viene attivato usando l'energia dell'ATP. Il prodotto della reazione è amminoacil-AMP e il sottoprodotto è pirofosfato.
- 2) L'energia dell'amminoacil-AMP viene utilizzata per trasferire l'amminoacido al 3' OH del RNA transfer per formare amminoacil-tRNA con liberazione di AMP. Queste due reazioni appena descritte vengono catalizzate dall'enzima amminoacil-tRNA sintetasi.

Questo enzima ha 3 siti di legame:

1. Uno che lega l'amminoacido
2. Uno che lega l'ATP
3. Uno che lega il tRNA

Visto ciò che abbiamo detto precedentemente degli enzimi di classe 1 che legano l'amminoacido all'estremità 2' OH, questi enzimi dovranno catalizzare un'altra reazione di trans-esterificazione che sposta l'amminoacido dall'2' OH all'3' OH.

Le amminoacil-tRNA sintetasi attaccano il corretto amminoacido ai tRNA

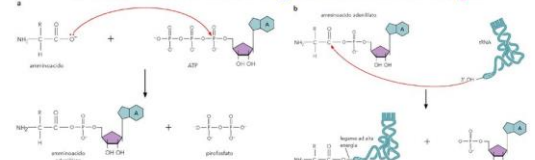


Le cellule possiedono un diverso amminoacil-tRNA sintetasi per ciascun amminoacido

La formazione dell'amminoacil-tRNA avviene ad opera delle tRNA sintetasi

Le molecole di tRNA cui è attaccato un a.a. sono dette cariche

I tRNA vengono caricati per mezzo di un a.a. che si lega all'adenosina dell'estremità 3' tramite un legame acilico ad alta energia



1) adenilazione dell'amminoacido:

l'a.a. reagisce con l'ATP
diventa adenilato e si libera il
pirofosfato
(si lega AMP)

2) Caricamento del tRNA:

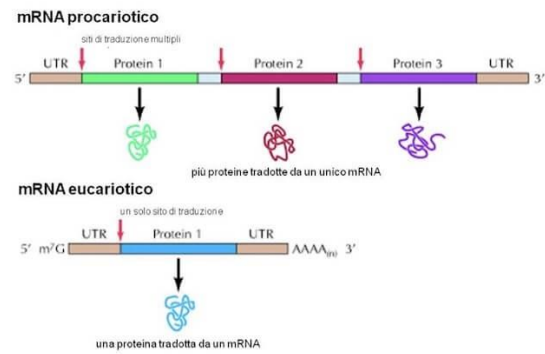
trasferimento dell'a.a. adenilato al 3'
del tRNA e formazione di un legame
estereo.
(si rilascia AMP)

L'RNA messaggero è la sequenza amminoacidica che una volta tradotto dai ribosomi diviene una proteina. L'informazione quindi viene trasferita dal **DNA all'RNA messaggero** e poi successivamente **alla proteina**. Dal filamento del DNA viene trascritto l'mRNA che è complementare al filamento stampo ed identico al filamento stampo. Quindi la sequenza di una proteina è definita dalle triplette; il processo di traduzione avviene in maniera tale che le triplette siano lette una dopo l'altra senza che ci siano delle sovrapposizioni. Quindi ci deve essere un quadro di lettura intorno all'RNA messaggero perché deve essere stabilito correttamente qual è l'inizio della traduzione. Il **codone d'inizio** della traduzione **AUG**, che codifica per la metionina, è presente in tutte le proteine.

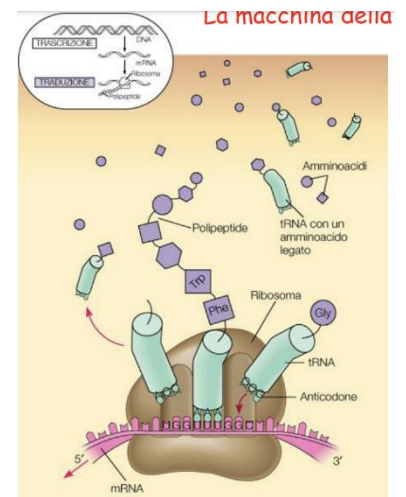
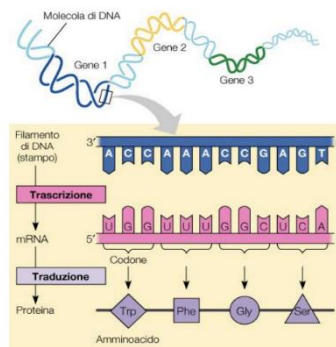
Per qualsiasi filamento di DNA o RNA messaggero ci sono 3 possibili quadri di lettura. Ognuno determina 3 diverse sequenze di codoni, ma solo uno è in grado di codificare una determinata proteina: la regione codificante di mRNA è quella che codifica per la proteina ed è caratterizzata da un ORF. Questa comincia con codone di inizio, seguito da una serie di codoni senso che codificano per gli amminoacidi e termina con un codone di stop di terminazione.

Se noi andassimo ad analizzare un RNA messaggero prima del codone di inizio e dopo il codone di terminazione vi sono delle regioni che vengono trascritte ma non tradotte definite UTR.

Gli RNA messaggeri **procariotici** hanno regioni codificanti e non codificanti. Negli RNA messaggeri **eucariotici** gli RNA messaggeri possiedono delle regioni non codificanti molto più lunghe, ed inoltre gli RNA sono caratterizzati da un cap all'estremità 5' e da una coda di poli A all'estremità 3'. La regione 5' UTR vengono chiamate anche sequenze leader perché si trovano prima del sito d'inizio della traduzione, ed in genere nei batteri questa sequenza è preceduta dalla sequenza di shine-Dalgarno. Invece la sequenza 3' UTR prendono il nome di sequenze trailer che sono posizionate dopo il codone di stop. In queste regioni si andranno a legare i microRNA.



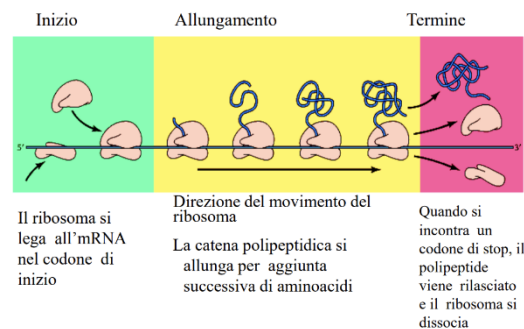
La sintesi proteica è una reazione anabolica, e come tutti i processi anabolici vi è il consumo di ATP. Infatti quasi il 30% dell'energia chimica cellulare viene utilizzata per la sintesi proteica. Durante la traduzione l'mRNA viene letto come una sequenza di triplette di basi, dette codoni. Ogni codone specifica l'amminoacido che deve essere aggiunto alla catena polipeptidica in via di accrescimento.



Nei procarioti trascrizione e traduzione avvengono contemporaneamente, perché non c'è una divisione degli ambienti. Invece negli eucarioti trascrizione e traduzione sono due processi separati. La traduzione può avvenire sui ribosomi liberi o su quelli legati al RER.

La traduzione è costituita da più fasi:

1. Inizio
2. Allungamento
3. Termine

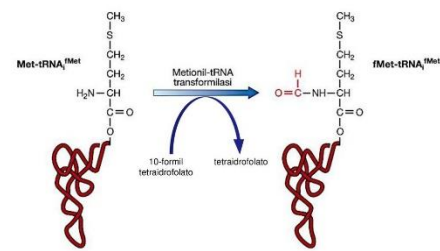


In una prima fase d'inizio l'RNA messaggero si lega alla subunità minore e poi qui si unirà la subunità maggiore, andando a formare il ribosoma funzionale. Poi abbiamo la fase di allungamento durante la quale il ribosoma che scorre lungo l'RNA messaggero. Nell'ultima fase, detta di terminazione, si raggiunge quando il ribosoma raggiunge il codone di stop. Quindi a questo punto la proteina tradotta viene rilasciata, le due subunità del ribosoma si dissociano, le quali possono riciclate e riutilizzate per un altro ciclo di traduzione.

Quindi l'RNA messaggero viene in **tradotto direzione 5'-3'**, l'estremità NH-H2-terminale della proteina è quella sintetizzata per prima, mentre ogni ciclo aggiunge un amminoacido all'estremità C-terminale della catena polipeptidica. La prima fase della traduzione è il caricamento dell'amminoacido sul RNA transfer. Questa fase è molto delicata perché si dovrà attaccare il corretto amminoacido all'RNA transfer. Anche se l'amminoacido legatosi all'tRNA fosse errato questo non ha un'importanza rilevante poiché la proteina successivamente verrà degradata.

Negli **eucarioti** la sintesi proteica inizia con la metionina. Nei **batteri** la sintesi proteica inizia con un residuo modificato di metionina (N-formilmetionina), che si ottiene attraverso una reazione di formilazione: cioè abbiamo il tRNA caricato con la metionina, che subisce una reazione di formilazione ad opera dell'enzima metionil-tRNA transformilasi che trasformerà la metionina in N-formilmetionina.

Il Met-tRNA iniziatore è formilato



Nel proseguo della lezione, verranno trattate nello specifico le fasi di inizio, terminazione e allungamento della traduzione che avvengono in procarioti ed eucarioti ma prima di questo è bene conoscere i fattori che regolano queste fasi. Sulla destra abbiamo la tabella descrivente i fattori presenti in procarioti ed eucarioti.

	Procarioti	Eucarioti
Inizio	IF-1, IF-2, IF-3	eIF-1, eIF-1A, eIF-2, eIF-2B, eIF-3, eIF-4A, eIF-4B, eIF-4E, eIF-4G, eIF-5
Allungamento	EF-Tu, EF-Ts, EF-G	eEF-1 α , eEF-1 β , eEF-2
Terminazione	RF-1, RF-2, RF-3	eRF-1, eRF-3

1. FASE DI INIZIO

La fase di inizio consiste **nel riconoscimento del codone e nell'assemblaggio di tutti i componenti**. Quindi nella fase iniziale bisogna mettere tutti i componenti insieme per l'inizio della traduzione.

Sia negli eucarioti che nei procarioti il primo passaggio della fase di inizio è il legame dell'mRNA e di un metionil-tRNA iniziatore specifico alla subunità ribosomiale minore. La subunità maggiore si legherà poi al complesso formando un ribosoma funzionale.

Quindi all'inizio della traduzione abbiamo diversi fattori traduzionali che sono diversi nei procarioti e negli eucarioti. In genere le tre fasi sono più o meno simili ma quello che differisce sono proprio il numero dei fattori, che negli eucarioti sono molto di più.

I fattori di inizio dei procarioti sono: IF-1, IF-2 e IF-3; i fattori di inizio negli eucarioti sono: eIF-1, eIF-1A, eIF-2, eIF-2B, eIF-3, eIF-4A, eIF-4B, eIF-4E, eIF-4G, eIF-5.

I fattori di allungamento si chiameranno EF per i procarioti e eEF per gli eucarioti; i fattori di terminazione RF per i procarioti e eRF per gli eucarioti.

I codoni di inizio degli mRNA batterici sono preceduti da una sequenza specifica (nota come **Sequenza di Shine-Dalgarno**, AGGAGGU), che allinea l'mRNA sul ribosoma per la traduzione. Contiene un sito di legame per l'rRNA 16S. Quindi abbiamo il codone di inizio AUG e poco prima, distanziato da 8-10 basi, abbiamo la sequenza di Shine-Dalgarno. Questa sequenza riconosce e lega l'rRNA.

Invece gli mRNA eucariotici si legheranno al ribosoma attraverso il CAP al 5'.

FASE DI INIZIO NEI PROCARIOTI

Nei procarioti abbiamo la subunità ribosomiale più piccola (30S) e dei fattori IF1 e IF3. I fattori IF1 e IF3 legano la subunità 30S libera e impediscono che si riassoci alla 50S, mantenendola così disponibile per il legame all'mRNA. A questo punto l'mRNA si lega alla subunità 30S sul sito di inizio che è riconosciuto tramite appaiamento di basi tra l'estremità 3' dell'rRNA 16S e la sequenza di Shine-Dalgarno.

Quindi il codone di inizio AUG viene diretto verso la sua corretta posizione da un segnale di inizio presente sull'mRNA (sequenza di Shine-Dalgarno).

L'rRNA scorre alla ricerca della sequenza di inizio, il codone di inizio si posiziona in corrispondenza del sito P.

In corrispondenza del sito P si lega anche IF2-GTP, a cui poi si unisce il tRNA iniziatore fMet-tRNA, completando così la formazione del cosiddetto **complesso di inizio 30S**.

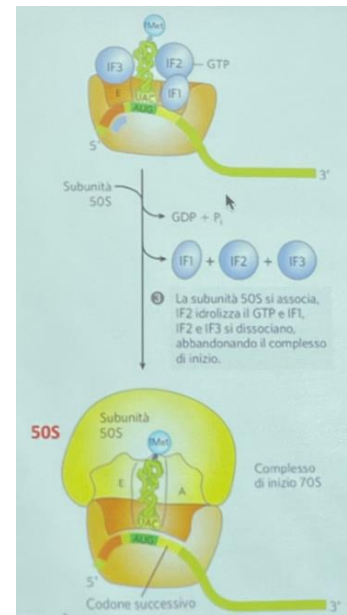
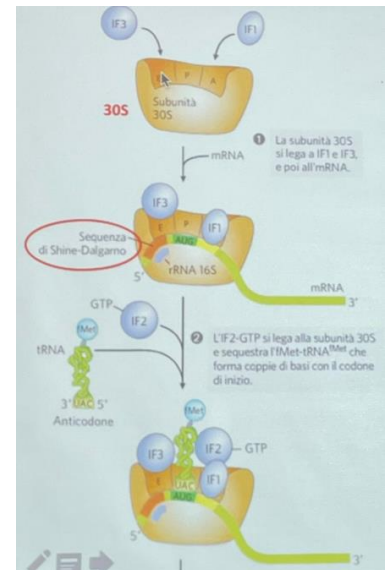
Quindi in questa fase iniziale è solo questo fMet-tRNA (tRNA formilmetionina) che si andrà a legare al sito P, perché tutti gli altri aminoacidi si andranno a posizionare al sito A e poi al sito E.

Quindi la fase di inizio nei procarioti ha questa caratteristica: il primo tRNA che porta la formilmetionina si va a legare al sito P.

A questo punto, la molecola di GTP legata a IF2 viene idrolizzata a GDP + P che vengono rilasciati dal complesso.

Tutti e tre i fattori di inizio si staccano dal ribosoma e il distacco permette il legame della subunità 50S (legame della subunità grande alla piccola). Si forma così il **complesso di inizio 70S**.

Quindi abbiamo assemblato tutti i componenti e abbiamo formato il ribosoma funzionale che contiene l'mRNA; quindi è avvenuto il legame dell'anticodone con il codone corrispondente e quindi abbiamo il primo tRNA di inizio.



FASE DI INIZIO NEGLI EUCARIOTI

In questo caso i fattori di inizio sono eIF-1 e eIF-3 che sono simili ai fattori 1 e 3 batterici.

Questi si legano alla subunità 40S e anche qui fanno sì che non si leghi la subunità grande. Il fattore eIF-1 si lega al sito E. Il tRNA iniziatore carico forma un complesso ternario che è legato ad un altro fattore che si chiama eIF-2, che a sua volta è legato al GTP. Questo complesso ternario si va a legare alla subunità 40S insieme ad altre proteine e si forma il complesso di pre-inizio.

Quindi il complesso di pre-inizio è costituito dalla subunità piccola del ribosoma che è complessata con eIF-1, eIF-3 e il complesso ternario.

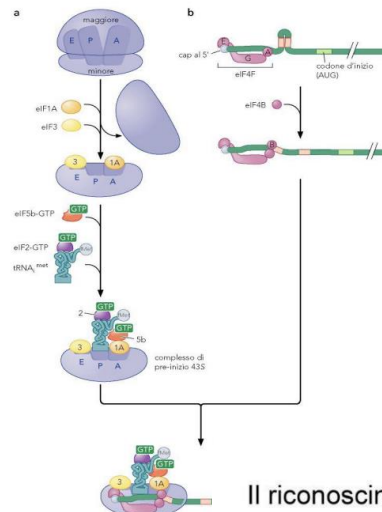
A questo punto si va a legare l'mRNA che in realtà entra legato con un altro fattore che si chiama eIF-4F, il quale media l'associazione con il complesso di pre-inizio.

Negli eucarioti però c'è il riconoscimento del CAP al 5', quindi l'associazione avviene tramite il fattore eIF-4F. Quest'ultimo in realtà non è un fattore ma un complesso di proteine che sono E, G e A.

E andrà a riconoscere il CAP al 5', la **A** ha un'attività di ATPasi ed elicasi e la **G** si va a legare alla coda di PoliA.

Questa coda di PoliA ha delle proteine che si chiamano PABP che legano proprio la coda di PoliA. Andandole a legare si forma l'mRNA circolare, cioè l'mRNA, grazie al legame con questo fattore, avvicina le due estremità dell'mRNA e va ad assumere una forma circolare. Questo aumenta la velocità del processo e facilita quindi il processo di traduzione. Questo perché nel momento in cui siamo traducendo e arriviamo alla fine, ci ritroveremo di nuovo all'inizio per ricominciare già una nuova sintesi della proteina (un nuovo ciclo) e quindi l'apparato è facilmente disponibile per un nuovo ciclo di traduzione.

Negli eucarioti il riconoscimento avviene sia a livello della sequenza 5' sia a livello 3' tramite il complesso spiegato precedentemente che rende l'mRNA circolare. A questo punto avviene una fase di scansione, cioè questo complesso che si è formato scansiona l'mRNA partendo dal CAP 5' fino a che non incontra un codone AUG e lo trova perché poi ci si va a legare; quindi si appaia l'anticodone con l'mRNA. Quindi il ribosoma, che ha il tRNA attaccato, scorre l'mRNA fino a che non trova il codone di inizio. Una volta incontrato il codone di inizio la subunità 60S si associa al complesso, quindi abbiamo il rilascio di tutti gli altri fattori e si forma il complesso di inizio 80S.

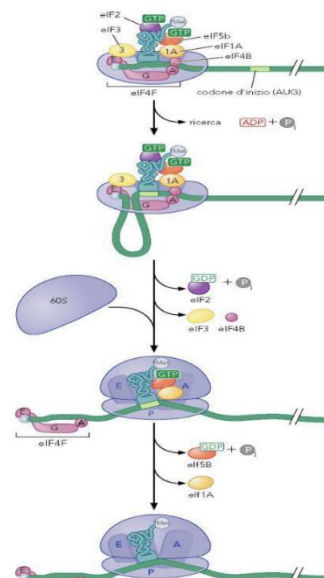
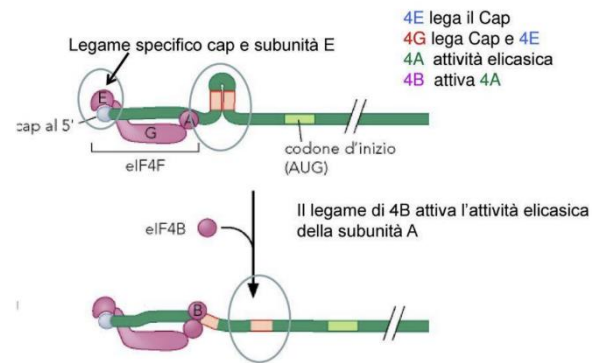


L'inizio della traduzione negli eucarioti adotta un meccanismo simile a quello dei procarioti. **Il cambiamento più rilevante riguarda la modalità di riconoscimento dell'mRNA e del codone iniziatore.**

La subunità minore si lega al cap e scorre lungo l'mRNA sino a quando non trova il codone iniziatore. Tale processo richiede molti fattori proteici (più di 30) compresi quelli già descritti nei procarioti. Il tRNA iniziatore, carico con **Metionina**, si lega alla subunità minore prima dell'mRNA. Il fattore eIF5B-GTP (analogo di IF2) media il corretto posizionamento del tRNA iniziatore nel sito P, formando il **complesso di preinizio 43S**.

Il complesso 43S si lega al cap dell'mRNA mediante l'interazione tra IF3 e eIF4F.

Il riconoscimento dell'mRNA in eucarioti è mediato dal fattore eIF4



Lo scanning dell'mRNA, che utilizza l'energia fornita dall'idrolisi di ATP, termina quando il tRNA iniziatore si posiziona correttamente in corrispondenza del codone di inizio. Il corretto riconoscimento induce il distacco di eIF2 e eIF3, che permette l'associazione della subunità maggiore.

Il legame della subunità maggiore porta a sua volta al distacco dei rimanenti fattori di inizio (eIF5B e eIF1A) formando il complesso di pre-inizio 80S dove il Met-tRNA_{Met} è correttamente posizionato nel sito P, e il sito A è libero e può accogliere gli altri tRNA carichi per proseguire la traduzione.

Quindi, man mano che scansiona fino a trovare l'AUG, si forma una specie di ansa e, una volta trovato AUG ci si va a legare la subunità ribosomiale maggiore.

RICAPITOLANDO:

- Nei **procarioti** si ha un inizio interno dipendente dalla presenza della sequenza di Shine-Dalgarno (SD), quindi il riconoscimento avviene grazie a questa sequenza, poco a monte (poco prima) dell'AUG di inizio.
- Negli **eucarioti** in genere la subunità piccola lega il CAP all'estremità 5' dell'mRNA e poi procede nella scansione della 3'UTR fino a trovare l'AUG di inizio.
Quindi, la subunità ribosomiale piccola scorre sull'mRNA fino a quando non trova il codone di inizio AUG, dopodiché la maggiore si associa alla minore e forma un ribosoma funzionale (quindi abbiamo questa fase di scansione).
- Per alcuni **virus** e **mRNA** eucariotici si ha un meccanismo di inizio cap-indipendente in cui la subunità piccola lega una sequenza IRES interna (IRES sta per sito interno del ribosoma) e da lì procede per scansione fino all'AUG di inizio.

2. FASE DI ALLUNGAMENTO: sintesi del polipeptide

FASE DI ALLUNGAMENTO NEI PROCARIOTI:

Nei procarioti il secondo amminoacil-tRNA entra nel sito A del ribosoma legato ad EF-tu, a sua volta legato al GTP. Il legame del secondo amminoacil-tRNA al sito A del ribosoma è accompagnato dall'idrolisi del GTP a GDP+P, seguita dal rilascio del complesso EF-Tu-GDP dal ribosoma.

Solo se l'accoppiamento codone-anticodone è corretto avviene l'idrolisi del GTP in GDP, altrimenti c'è un'attività di proofreading per cui non viene legato il tRNA.

Ovviamente questo complesso EF-Tu-GDP amminoacil-tRNA deve essere, ad ogni processo, rigenerato e questa rigenerazione richiede a sua volta altri fattori che sono: EF-Ts e un'altra molecola di GTP.

Come avviene la formazione del legame peptidico? La formilmetionina si trova nel sito P del ribosoma e deve essere trasferito sul gruppo amminico (formazione del legame peptidico) del secondo amminoacido e si forma il di-peptidil-tRNA. Questo tRNA che ha ceduto l'amminoacido si sposta con l'estremità verso il sito E.

Quindi, l'attività enzimatica che catalizza la formazione del legame peptidico è chiamata peptidil transferasi e risiede nell'rRNA 23S.

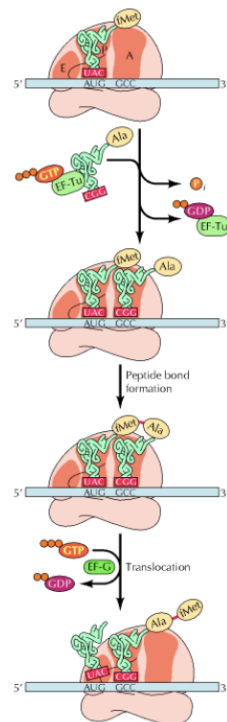
Quindi abbiamo nel sito A l'amminoacido, il gruppo NH₂ fa attacco nucleofilo al gruppo carbossilico, si forma il legame peptidico e quindi rimane "scarico" il tRNA (perché non ha più legato l'amminoacido).

A questo punto abbiamo formato il legame peptidico e deve avvenire la traslocazione e il ribosoma si sposta di 3 nucleotidi (un codone) verso l'estremità 3' dell'mRNA usando sempre l'idrolisi del GTP. Quindi abbiamo il fattore che si chiama EF-G che è una traslocasi legata al GTP e avviene l'idrolisi che fa spostare il ribosoma.

Quindi, il dipeptidil-tRNA si sposta dal sito A al sito P e il sito A rimane libero per il legame con un terzo tRNA. Il tRNA scarico (che è passato dal sito P al sito E) viene rilasciato e il fattore EF-G-GTP verrà riattivato per poter essere riutilizzato in un altro ciclo.

Quindi alla fine il ciclo di allungamento ricomincia. Inoltre, per ogni amminoacido correttamente aggiunto, vengono impiegate due molecole di GTP idrolizzate.

Per riassumere: in generale la fase di allungamento consiste nella formazione del legame peptidico e nella fase di traslocazione in cui si ha il passaggio dal sito A al sito P e dal sito P al sito E.



Allungamento nei procarioti

La fase di allungamento include tre eventi chiave:

- 1) l'inserimento del corretto tRNA carico nel sito A;
- 2) formazione del legame peptidico tra l'amminoacido (sito A) e il peptide (sito P) ad opera della peptidiltransferasi;
- 3) traslocazione del peptidil-tRNA dal sito A al sito P. Questo processo è coadiuvato da due fattori di allungamento e richiede energia fornita dall'idrolisi di GTP.

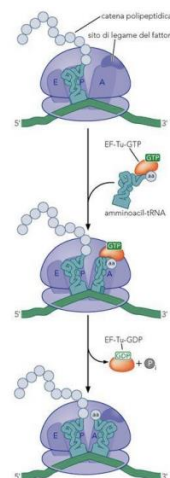
L'idrolisi del GTP coadiuva il completamento della traslocazione, in quanto EF-G-GDP ha un dominio che mima la struttura del tRNA e legandosi al sito A induce lo spostamento del peptidil-tRNA (associato all'mRNA) e del tRNA deacilato.

Il meccanismo di allungamento è estremamente conservato tra procarioti ed eucarioti.

FASE DI ALLUNGAMENTO NEGLI EUCARIOTI:

Il ciclo di allungamento negli eucarioti è simile a quello che avviene nei batteri però cambiano i fattori. Infatti abbiamo eEF-1 α , eEF-1 $\beta\gamma$, eEF-2. Quindi abbiamo tre fattori di allungamento che hanno funzioni analoghe a quelle dei fattori di allungamento batterici. Anche qui quando avviene l'idrolisi del GTP avviene un cambiamento funzionale.

Questo è quello che avviene negli eucarioti, che è la stessa cosa che avviene nei procarioti solo che cambiano i fattori.



La fase di allungamento

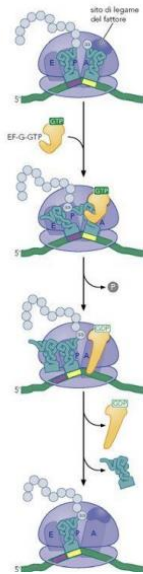
Il meccanismo di allungamento è estremamente conservato tra procarioti ed eucarioti.

- 1) l'inserimento del corretto tRNA carico nel sito A ad opera del fattore EF-Tu legato a GTP;
- 2) formazione del legame peptidico tra l'amminoacido (sito A) e il peptide (sito P) ad opera della **peptidiltransferasi**

Si forma il legame peptidico

Anche negli eucarioti quindi abbiamo un centro di decodifica dove avviene l'inserimento dell'amminoacido al tRNA, la rigenerazione del fattore, la formazione del legame peptidico e infine abbiamo la fase di traslocazione.

Quindi, ripetendo ancora, per gli eucarioti il meccanismo è simile: abbiamo sempre l'inserimento dell'amminoacido, la formazione del legame peptidico, la traslocazione e l'idrolisi del GTP per il cambiamento conformazionale ma cambiano i fattori.



Traslocazione

Una volta formato un nuovo legame peptidico deve aver luogo la traslocazione nella quale:

- il tRNA deaccilato deve spostarsi nel sito E
- il peptidil-tRNA deve spostarsi dal sito A al sito P
- l'mRNA deve spostarsi di tre nucleotidi per esporre il successivo codone.

3. FASE DI TERMINAZIONE

Il processo di allungamento e traslocazione si ripete tante volte con il tRNA che esce dal sito E mentre il sito A è libero e aggancia sempre un nuovo tRNA.

Quando il ribosoma, che sta scorrendo, raggiunge un codone di stop o di terminazione la sintesi proteica si conclude e quindi il polipeptide viene rilasciato.

La fase di terminazione è segnalata da uno dei tre codoni di terminazione che sono UAG, UGA e UAA.

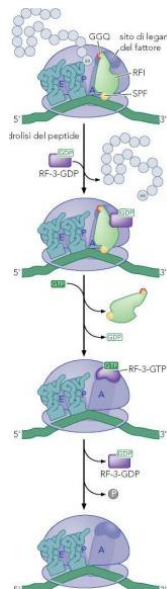
FASE DI TERMINAZIONE NEI PROCARIOTI:

In questo caso abbiamo il fattore di rilascio RF che si lega al sito A (quindi abbiamo nel sito P la catena polipeptidica che si sta formando (che è finita)).

Ciò porta all'idrolisi del legame estere tra il polipeptide nascente e il tRNA nel sito P, e al rilascio del polipeptide completato.

L'mRNA, il tRNA deaccilato e il fattore di rilascio abbandonano il ribosoma, che si dissocia nelle sue subunità 30S e 50S, aiutato dal fattore di riciclo dei ribosomi (RRF), da IF3 e dall'energia liberata dell'idrolisi del GTP mediata da EF-G. In realtà quindi abbiamo una fase di terminazione e una fase di post-terminazione in cui il complesso viene disassemblato grazie al fattore di rilascio.

A questo punto le subunità e i fattori sono pronti per iniziare un nuovo ciclo di traduzione.



TERMINAZIONE

-Quando sul sito A si trova un codone di STOP, a cui non corrisponde nessun tRNA, la sintesi si arresta.

-Inoltre esistono fattori di rilascio che si legano al sito A impedendo comunque l'attacco dei tRNA.

-La catena polipeptidica si stacca dall'ultimo tRNA grazie ad un enzima (idrolasi) con consumo di una molecola di GTP.

-Le due subunità ribosomiali si disassemblano.

Dopo l'idrolisi del legame del peptidil-tRNA il fattore di rilascio di classe I viene rimosso dal ribosoma ad opera di un fattore di classe II (RF3 o eRF3). RF3-GDP si lega al ribosoma in presenza di RF1. Il rilascio idrolitico del peptide induce uno scambio GDP-GTP, con formazione di RF3-GTP che avendo maggiore affinità per il ribosoma produce il rilascio di RF1. Infine, l'idrolisi di GTP induce anche il rilascio di RF3-GDP.

Figura 1

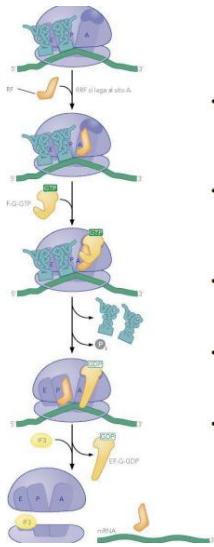


Figura 2

- Perché il ribosoma possa essere utilizzato in un nuovo ciclo di traduzione si deve avere il rilascio dei 2 tRNA deaccilati (nel sito P e nel sito E), il rilascio dell'mRNA e la dissociazione delle due subunità del ribosoma.
- Questo processo richiede l'intervento di un fattore di riciclaggio (**RRF, ribosome recycling factor**) che agisce insieme a EF-G e IF3 per completare il riciclaggio del ribosoma.
- RRF, assumendo una struttura 3D simile a quella di un tRNA, si lega al sito A nella regione della subunità maggiore del ribosoma.
- Il successivo legame di EF-G-GTP stimola il rilascio dei tRNA deaccilati mediante l'idrolisi di GTP e la traslocazione di RRF dal sito A al sito P.
- Infine, il legame di IF3 induce la dissociazione delle due subunità ribosomiali, di RRF e dell'mRNA.

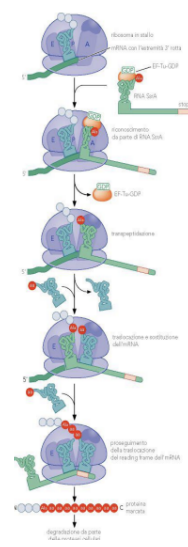


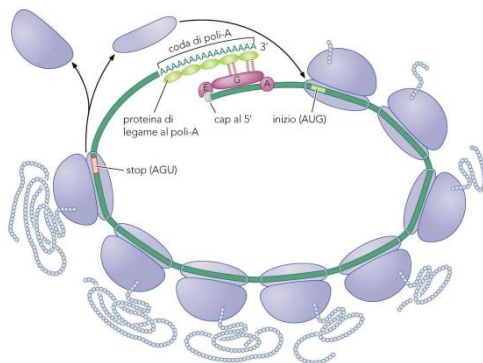
Figura 3

- L'assenza di codoni di stop su mRNA tronchi o mutati potrebbe portare allo stallo dei ribosomi impegnati nella loro traduzione. In questo caso la dissociazione del ribosoma dall'mRNA è resa possibile dall'intervento di molecole chimeriche costituite in parte da tRNA ed in parte da mRNA (tmRNA) denominato RNA SsrA.
- L'RNA SsrA è una molecola di 457 nt che all'estremità 3' possiede una regione simile ad un tRNA^{Ala}. Tale somiglianza consente il caricamento di Ala e il legame di EF-Tu-GDP.
- Il tmRNA si sostituisce all'mRNA, nell'apposito canale nel ribosoma, e continua la traduzione fino a che non viene raggiunto un codone di stop sul tmRNA.
- La proteina tronca presenta all'estremità 10 Ala, e questa marcatura la indirizza all'immediata degradazione da parte di specifiche proteasi cellulari.

FASE DI TERMINAZIONE NEGLI EUCARIOTI:

Negli eucarioti abbiamo due fattori invece di tre che riconoscono i codoni. Questi fattori di rilascio sono responsabili dell'idrolisi del peptide con il tRNA (quindi rompono il legame peptidico che lega la catena polipeptidica), rilasciano il polipeptide libero e dissociano le subunità ribosomiali.

L'interazione tra la **polyA-binding protein** e i fattori di inizio mantiene l'mRNA in una conformazione circolare che aumenta l'efficienza della traduzione.



Termine della traduzione

La traduzione termina quando uno dei tre codoni di stop entra nel sito A del ribosoma.

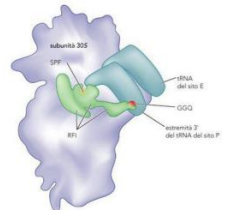
I codoni di stop vengono riconosciuti da proteine dette fattori di rilascio (RF, releasing factors) che determinano il rilascio della catena polipeptidica.

I fattori di classe I riconoscono i codoni di stop e innescano l'idrolisi della catena polipeptidica.

I fattori di classe II (regolati da GTP) stimolano la dissociazione dei fattori di classe I dal ribosoma.

Classe I Procarioti: RF1 (UAG, UAA), RF2 (UGA)
Eucarioti: eRF1 (UAG, UAA, UGA)

Classe II Procarioti: RF3
Eucarioti: eRF3



REGOLAZIONE DELLA TRADUZIONE

La regolazione gioca un ruolo chiave nella modulazione della traduzione.

La traduzione dell'mRNA può essere regolata da proteine repressori della traduzione. Quindi ci sono delle molecole che vanno a interagire con i fattori di inizio della traduzione eucariotici che si legano al CAP e impediscono o allentano la traduzione.

Oppure può essere modulata attraverso dei microRNA non codificanti. Quindi queste proteine si legano a siti specifici precisamente nella regione 3' UTR dell'mRNA.

La traduzione può essere regolata soprattutto attraverso i fattori di inizio, come eIF-2. eIF-2 è un fattore di inizio che si lega alla metionil-tRNA portandola al ribosoma. Quindi abbiamo l'idrolisi del GTP che poi lascia eIF-2 legato al GDP. Per far sì che la fase di inizio ricominci, è necessario che questo fattore venga rigenerato cioè che GDP sia scambiato con il GTP e quindi si rigeneri il fattore.

Nelle cellule, in condizioni di stress (ipossia, shock termico, stress ossidativo, carenza di fattori nutritivi/di crescita), si ha la sintesi di chinasi. Le chinasi vanno a fosforilare il fattore di inizio.

Una volta fosforilata, questa proteina, non è più in grado di favorire lo scambio cioè di legare il GTP e il GDP e quindi si ha il blocco della traduzione.

Quindi la traduzione viene controllata regolando l'attività dei fattori di inizio eIF2 tramite fosforilazioni che inibiscono l'inizio della sintesi proteica.

Riassumendo la sintesi proteica più o meno abbiamo cinque fasi:

1. **ATTIVAZIONE DEGLI AMMINOACIDI:** il tRNA viene amminoacilato;
2. **INIZIO:** l'mRNA e il tRNA amminoacilato si legano alla subunità minore del ribosoma. Si lega poi la subunità maggiore;
3. **ALLUNGAMENTO:** i cicli successivi di legame dell'amminoacil-tRNA e della formazione del legame peptidico proseguono fino a che il ribosoma non raggiunge un codone di stop;
4. **TERMINAZIONE:** la traduzione si ferma a livello di un codone di stop. L'mRNA e la proteina si dissociano e le subunità ribosomiali vengono riciclate;
5. **RIPIEGAMENTO DELLA PROTEINA** e modifiche post-traduzionali.

La sintesi proteica è una funzione centrale nella fisiologia della cellula e per questo è il principale bersaglio di una grande varietà di **antibiotici** e **tossine** presenti in natura (tossina difterica).

Ad esempio:

- Acido fusidico: inibisce il fattore di allungamento G, coinvolto nella sintesi della catena polipeptidica;
- Streptomicina: causa un'errata lettura del codice genetico e blocca la sintesi proteica;
- Tetraciclina: blocca il Sito A del ribosoma e impedisce il legame degli amminoacil-tRNA.