

CITOSOL (1)

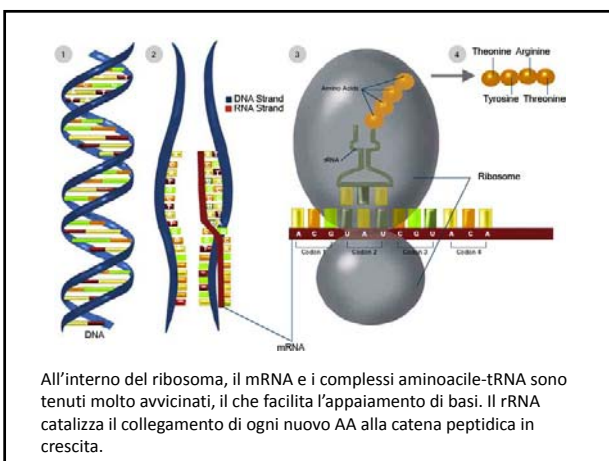
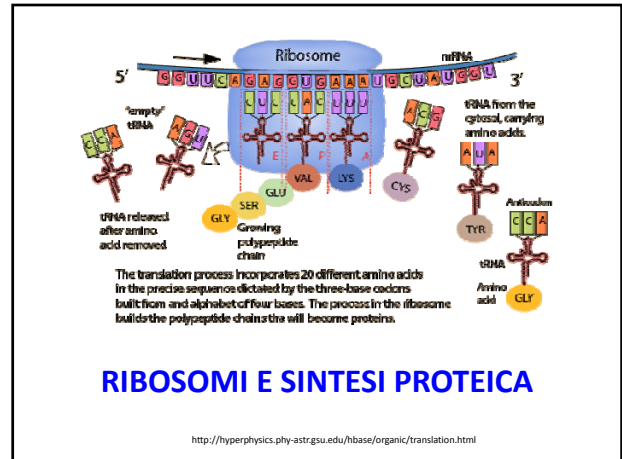
- ✚ Tutta la porzione non strutturata che costituisce la parte liquida del citoplasma. In esso si trovano in soluzione tutte le molecole necessarie per il metabolismo cellulare.
- ✚ E' una **soluzione acquosa concentrata** che occupa gli spazi tra gli organuli e il citoscheletro. Di fatto è un **gel** di base acquosa che contiene grandi quantità di molecole sia di grandi che di piccole dimensioni; nella maggior parte delle cellule è di solito il compartimento più voluminoso, in misura variabile da cellula a cellula.
- ✚ Nei **procarioti** è l'unico compartimento intracellulare

CITOSOL (2)

- ✚ E' nel **citosol** che si svolgono molte delle funzioni più importanti per il metabolismo cellulare, come le prime tappe della degradazione delle molecole nutrienti e la sintesi di molte delle macromolecole che costituiscono la cellula.
- ✚ Nonostante **molte molecole del citosol si trovino in uno stato di soluzione vera** e si **spostino rapidamente da un posto all'altro per diffusione libera**, altre si trovano in forma rigorosamente **ordinata**. Queste strutture ordinate (ad es. i **complessi multienzimatici**) conferiscono al citosol una **organizzazione interna** che costituisce una zona preferenziale per la sintesi e decomposizione di macromolecole e che canalizza molte delle reazioni chimiche cellulari lungo vie metaboliche preferenziali, impedendo che i prodotti intermediari prendano vie alternative.

Typical ion concentrations in mammalian cytosol and blood.^[4]

Ion	Concentration in cytosol (millimolar)	Concentration in blood (millimolar)
Potassium	139	4
Sodium	12	145
Chloride	4	116
Bicarbonate	12	29
Amino acids in proteins	138	9
Magnesium	0.8	1.5
Calcium	<0.0002	1.8



I tre ruoli dell'RNA nella sintesi proteica

- ✚ L'RNA messaggero (**mRNA**) porta l'informazione copiata dal DNA sotto forma di una serie di "parole" di tre basi dette **CODONI**
- ✚ L'RNA transfer (**tRNA**) decifra il codice, mediante uno specifico **ANTICODONI**, al quale è associato un particolare **amminoacido**
- ✚ L'RNA ribosomiale (**rRNA**) si associa con una serie di proteine per formare i **ribosomi**, le fabbriche che sintetizzano le proteine

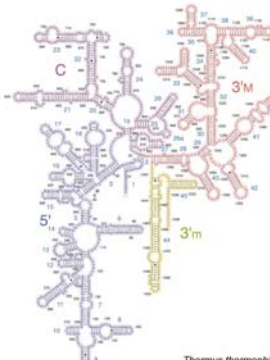
CODICE GENETICO

		Second letter				
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU Phenylalanine UUC UUA Leucine UUG	UCU Serine UCC UCA UCG	UAU Tyrosine UAC UAA Stop codon UAG Stop codon	UGU Cysteine UGC UGA Stop codon UGG Tryptophan	U C A G
	C	CUU Leucine CUC CUA CUG	CCU Proline CCC CCA CCG	CAU Histidine CAC CAA Glutamine CAG	CGU Arginine CGC CGA CGG	U C A G
	A	AUU Isoleucine AUC AUA AUG Methionine; start codon	ACU Threonine ACC ACA ACG	AAU Asparagine AAC AAA Lysine AAG	AGU Serine AGC AGA Arginine AGG	U C A G
G	GUU Valine GUC GUA GUG	GCU Alanine GCC GCA GCG	GAU Aspartic acid GAC GAA Glutamic acid GAG	GGU Glycine GGC GGA GGG	U C A G	
<small>© 2005 Sinauer Associates, Inc.</small>						

I ribosomi sono le «macchine» per sintetizzare le proteine

- Se i principali componenti necessari per la traduzione del mRNA dovessero interagire in soluzione nel citosol, la **probabilità delle collisioni simultanee** necessarie sarebbe così **bassa** che la velocità di polimerizzazione degli aminoacidi sarebbe bassissima.
- L'**efficienza di traduzione** viene **enormemente aumentata** dal legame del mRNA con ogni singolo aminoacil-tRNA all'interno di un **ribosoma**.
- Il ribosoma pilota l'elongazione di un polipeptide ad una velocità di 3-5 AA aggiunti al secondo.
 - Piccole proteine di 100-200 AA: sintetizzate in 1 min o meno.
 - La proteina di maggiori dimensioni nota titina, che si trova nel muscolo e ha circa 30000 AA richiede 2-3 h.

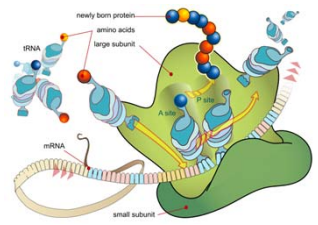
Struttura tridimensionale di un rRNA



Nonostante le sequenze primarie di nucleotidi dei vari rRNA vari in modo considerevole, le stesse parti per ogni tipo di rRNA possono in teoria formare «stem-loops» basati su appaiamento intracatenari di basi, che genererebbero una struttura tridimensionale simile per ogni rRNA in tutti gli organismi.

Thermus thermophilus
small subunit ribosomal RNA

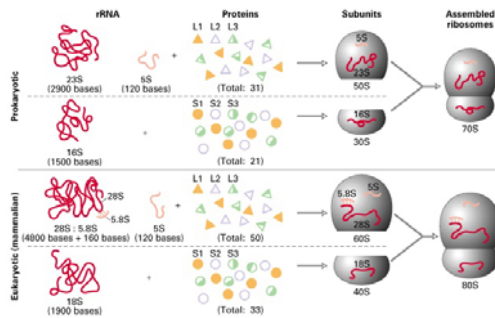
http://ma.ucsc.edu/macenter/ribosome_images.html



RIBOSOMI

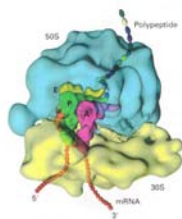
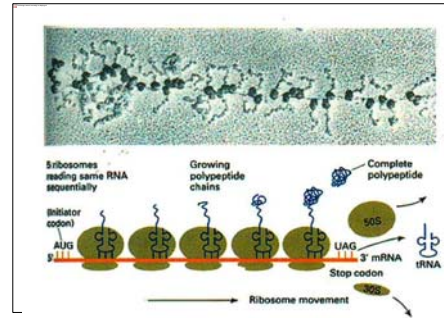
(STRUTTURE SPECIALIZZATE PER LA TRADUZIONE)

La struttura dei ribosomi nei procarioti e negli eucarioti



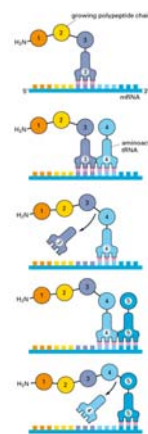
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21603/figure/A888/>

Durante la traduzione, un ribosoma si muove lungo una catena di mRNA, interagendo con diversi fattori proteici e tRNAs e subendo grandi **alterazioni conformazionali**.



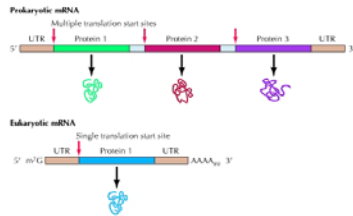
TRADUZIONE

Decodificazione di una molecola di mRNA



Ogni aminoacido aggiunto all'estremità crescente della catena polipeptidica viene selezionato mediante appaiamento complementare di basi fra l'**anticodone** nel **tRNA** a cui è legato e il **codone** successivo nella catena del **mRNA**

Inizio della Traduzione (1)



mRNAs dei procarioti e degli eucarioti

Sia gli mRNA dei procarioti che quello degli eucarioti contiene regioni non tradotte («untranslated regions», UTRs) nelle loro estremità 5' e 3'. Inoltre, gli mRNA degli eucarioti contengono un capello 5' di 7-metilguanosa (m7G) e una coda 3' di poli-A. Gli mRNA dei procarioti sono frequentemente policistronici: codificano per molteplici proteine, ognuna delle quali viene tradotta da siti di inizio («start») indipendenti. Gli mRNA degli eucarioti sono di solito monocistronici, codificando soltanto per una proteina.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9849/figure/A1176/?report=objectonly>

L'inizio del mRNA non viene tradotto (1)

- Non tutte le regioni della molecola di mRNA corrispondono ad un particolare aminoacido. In particolare, vi è una regione vicino all'estremità 5' della molecola nota come la *regione non-tradotta* («UnTranslated Region», UTR) o *sequenza "leader"*.
- Questa porzione del mRNA si trova fra il primo nucleotide che viene trascritto e il codone di inizio (AUG) della regione codificante, e non influenza la sequenza di aminoacidi della proteina.

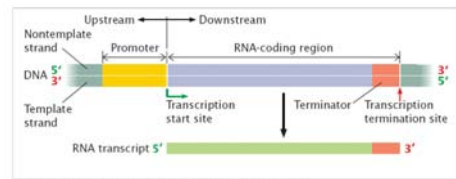
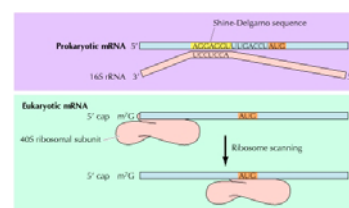


Figure 3: A transcription unit includes a promoter, an RNA-coding region, and a terminator.
<http://www.nature.com/scitable/topicpage/translation-dna-to-mrna-to-protein-393>

L'inizio del mRNA non viene tradotto (2)

- La **UTR** è importante perchè **contiene un sito di legame per il ribosoma**.
 - Nei batteri questo sito è noto come "Shine-Dalgarno box" (AGGAGG).
 - Nei vertebrati esiste un sito simile "Kozak box".
 - Nei mRNA batterici la 5'-UTR è di solito corta.
 - Negli mRNA umani la lunghezza media del 5'-UTR è di circa 70 nucleotidi.
- Quando la sequenza leader è lunga essa può contenere molte **sequenze regolatorie**, incluso i **siti di legame per proteine che possono influenzare la stabilità del mRNA o l'efficienza della sua traduzione**.

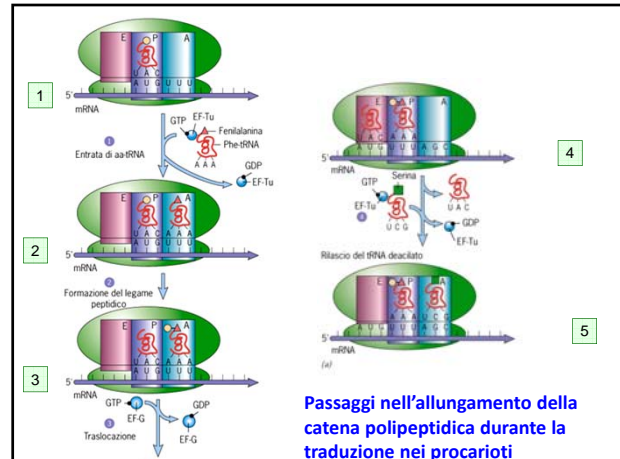
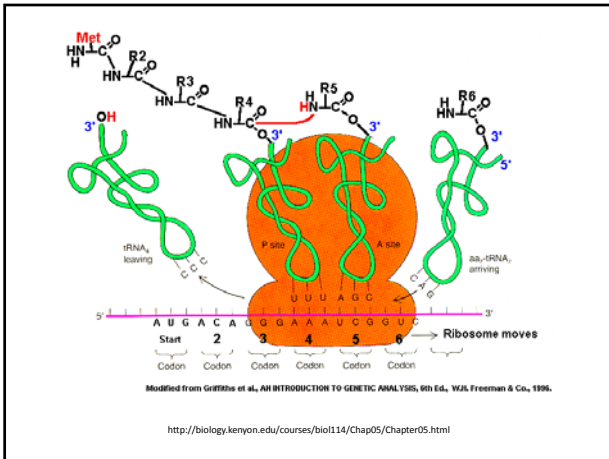


Inizio della Traduzione (3)

Segnali di inizio di traduzione

I siti di iniziazione negli mRNA dei procarioti sono caratterizzati da una **sequenza di Shine-Dalgarno** che precede il codone AUG di inizio. Un appaiamento di basi tra la sequenza di Shine-Dalgarno e una sequenza complementare vicino al terminale 3' del 16S rRNA allinea il mRNA sul ribosoma. Viceversa, gli mRNA degli eucarioti sono legati alla subunità 40S del ribosoma mediante il loro capelli di 5' 7-metilguanosa. Il ribosoma a questo punto scansa il mRNA finchè non trova il codone AUG di inizio.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9849/figure/A1177/?report=objectonly>



La traduzione inizia dopo che si è assemblata una struttura complessa (1)

- La traduzione del mRNA inizia con la formazione di un complesso sul mRNA.
- Prima tre proteine che funzionano come **fattori di iniziazione** (IF1, IF2 e IF3) **si legano alla subunità piccola del ribosoma**.
- In seguito il complesso di pre-iniziazione e un tRNA legante la metionina si legano al mRNA vicino al codone di "start" AUG, formando il complesso di iniziazione.
 - Nonostante la metionina (met) sia il primo aminoacido a venire incorporato in qualsiasi nuova proteina, non sempre è il primo aminoacido che si trova nelle proteine mature in quanto in molte proteine la metionina (o la formilmetionina nei procarioti) viene rimossa dopo la traduzione. La rimozione della metionina è condizionata dal 2° AA.

Adattato da: «Molecular Cell Biology», Lodish et al., 8ª ed., 2012.

La traduzione inizia dopo che si è assemblata una struttura complessa (2)

- Una volta che il complesso di iniziazione si è formato sul mRNA, l'unità maggiore del ribosoma si lega al complesso; ciò provoca il rilascio degli IFs ("initiation factors").
- L'unità maggiore del ribosoma ha **tre siti dove le molecole di tRNA si possono legare**.
 - Il sito **A (amino acido)** corrisponde alla zona in cui l'**anticodone del aminoacil-tRNA si appaia con il codone del mRNA, assicurando che l'aminoacido giusto venga aggiunto alla catena peptidica**.
 - Il sito **P (polipeptidico)** è la zona in cui l'**aminoacido è trasferito dal suo tRNA alla catena peptidica in crescita**.
 - Il sito **E (exit)**, di uscita, è la **zona in cui si ferma il tRNA "svuotato" prima di venire rilasciato di nuovo nel citoplasma per legare un altro aminoacido** e ripetere il processo.
 - Il tRNA-metionina è l'unico aminoacil-tRNA che si può legare al sito P del ribosoma nella fase d'inizio della traduzione, e il sito A è allineato con il secondo codone del mRNA

Adattato da: «Molecular Cell Biology», Lodish et al., 8ª ed., 2012.

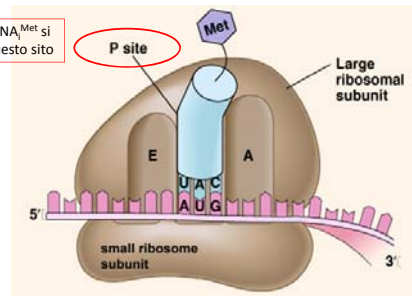
La traduzione inizia dopo che si è assemblata una struttura complessa (3)

- A questo punto il ribosoma è pronto per legare il secondo aminoacil-tRNA nel sito A; questo 2° AA verrà legato alla metionina iniziale con la formazione del primo legame peptidico.

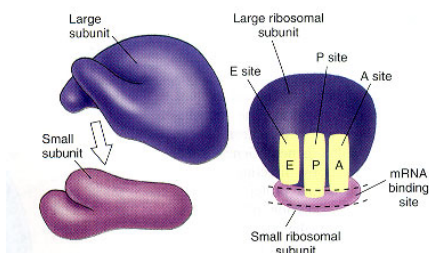
Adattato da: «Molecular Cell Biology», Lodish et al., 8° ed., 2012.

Inizio della Traduzione (1)

Solo il tRNA^{Met} si lega a questo sito



<http://sgugenetics.pbworks.com/f/1269663451/1269891067/ribosome.jpg>



Ribosome Subunits

The smaller subunit fits into a depression on the surface of the larger one. The A, P, and E sites on the ribosome play key roles in protein synthesis.

<http://www.nvo.com/jin/homepage21/>

Inizio della Traduzione (2)

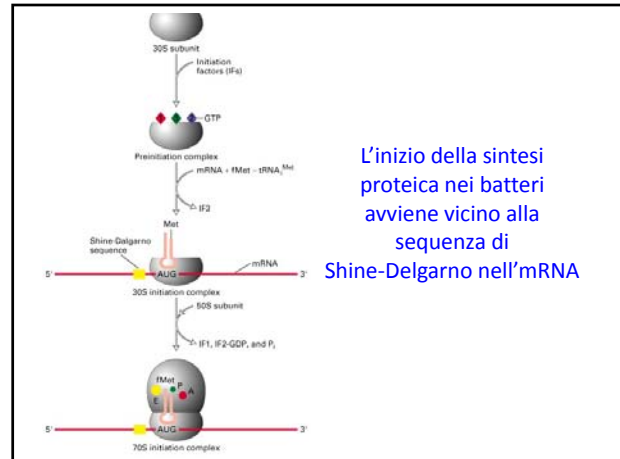
- Il codone **AUG** funziona come **codone di inizio** per la gran maggioranza degli mRNA.
- Sia i procarioti che gli eucarioti contengono due diversi tRNAs per la metionina: **tRNA^{Met}** può iniziare la sintesi proteica, mentre il **tRNA^{Met}** può incorporare la metionina soltanto in una catena peptidica in crescita.
- La stessa aminoacil tRNA sintetasi carica entrambi gli tRNA con la metionina.
- Soltanto il **tRNA^{Met}** è in grado di entrare nel sito appropriato della subunità ribosomiale piccola, il **sito P** per iniziare la sintesi di una catena polipeptidica.

Adattato da: «Molecular Cell Biology», Lodish et al., 8° ed., 2012.

Fasi Della Traduzione: inizio

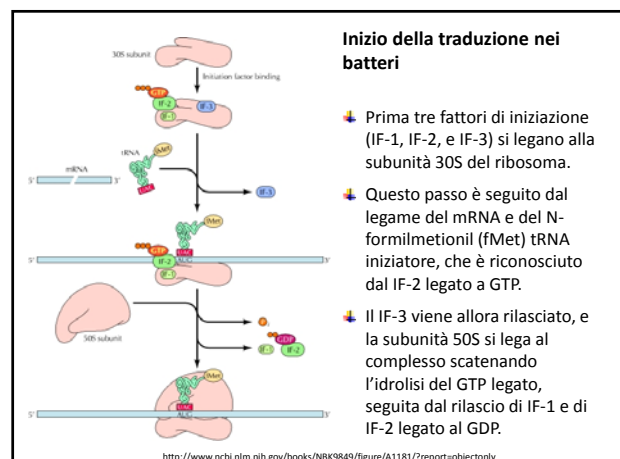
- Attacco delle subunità ribosomali e del primo a.a. portato dal tRNA iniziatore all'mRNA
- Posizionamento sul primo codon da tradurre

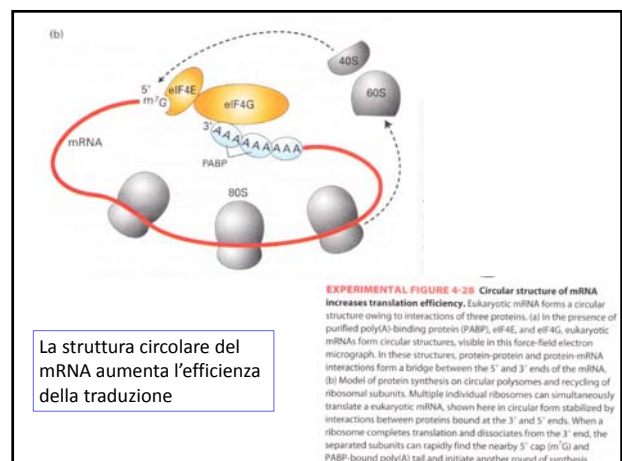
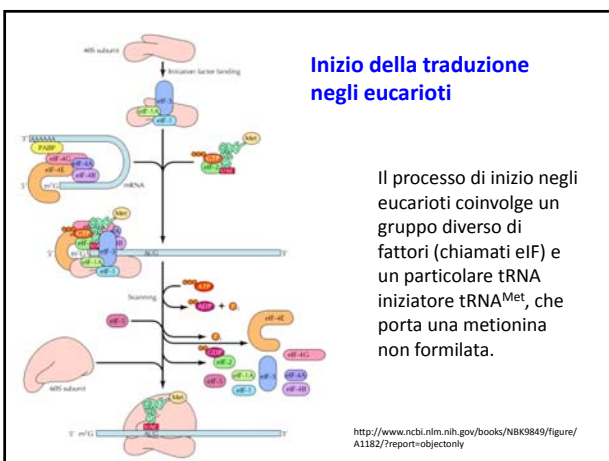
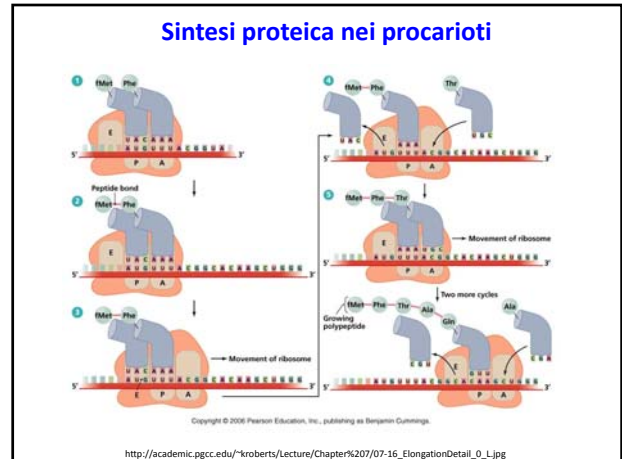
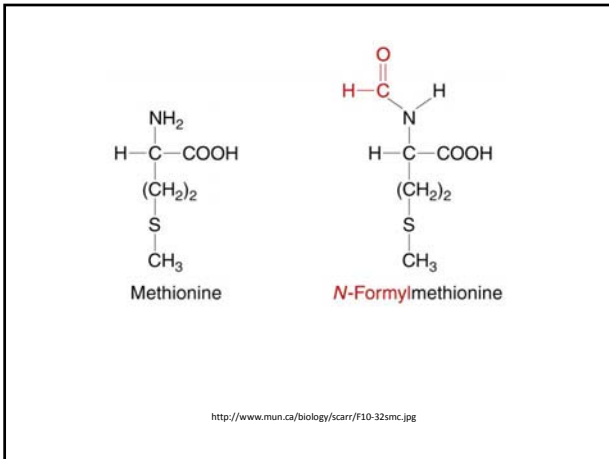
	PROCARIOTI	EUCARIOTI
Subunità	30S/ 50S	40S/60S
Fattori d'inizio	Si	Si
tRNA iniziatore	formilmethionina	metionina
Fonte di Energia	GTP	ATP/GTP



Fattori di iniziazione (eIFs)

- Nel 1° passo della traduzione, le subunità piccola e grande del ribosoma si assemblano attorno ad un mRNA che ha un tRNA iniziatore attivato posizionato correttamente sul codone di inizio nel sito P del ribosoma.
- Negli eucarioti questo processo è mediato da un set di proteine noti come **fattori di iniziazione della trascrizione degli eucarioti (eIFs)**.
- Man mano ogni singolo componente raggiunge il complesso viene guidato dall'interazione con Ifs specifici.
- Diversi di questi eIFs **legano il GTP e l'idrolisi del GTP a GDP funziona come in interruttore con funzione di correttore di bozze** che permette che il passo successivo abbia luogo soltanto quando il precedente è avvenuto correttamente.





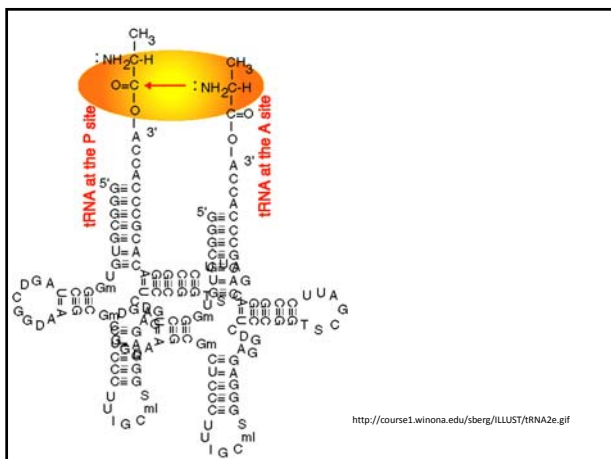
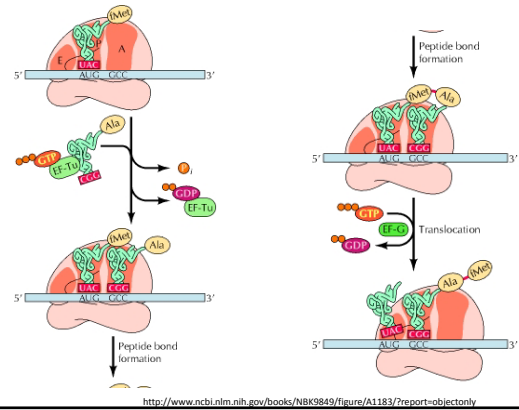
Fasi Della Traduzione: allungamento

Allungamento della catena polipeptidica mediante attacco di aminoacil-tRNA e sintesi del legame peptidico.

PROCARIOTI **EUCARIOTI**

Subunità	30S/50S	40S/60S
Fattori di Allungamento	Sì	Sì
tRNA	tutti	tutti
Fonte di energia	GTP	GTP

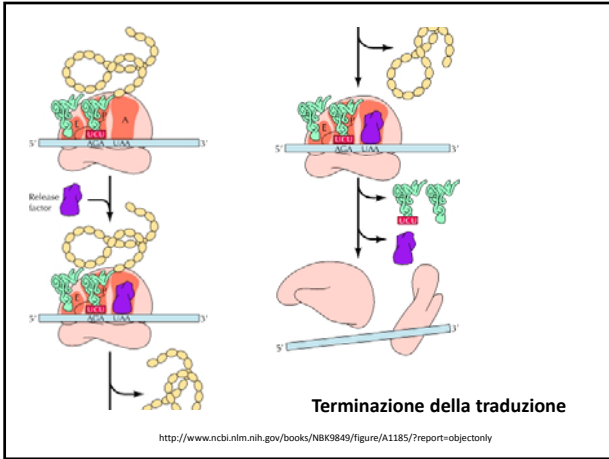
Fase di allungamento della traduzione



Fasi Della Traduzione: terminazione

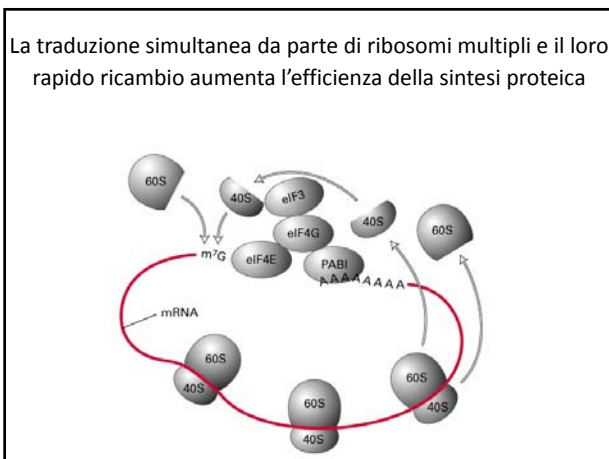
- Avviene quando il ribosoma arriva ad un codone di stop (UAA, UAG, UGA) che si colloca nel sito A
- Rilascio della catena polipeptidica e rilascio delle due subunità ribosomali

	PROCARIOTI	EUCARIOTI
Subunità	30S/50S	40S/60S
Fattori di terminazione	3	1
Fonte di energia	GTP	GTP



POLIRIBOSOMI

Diversi ribosomi possono attaccarsi ad un mRNA e sintetizzare proteine, ciascuno producendo un filamento polipeptidico. Questi aggregati sono detti **poliribosomi**. Se si trovano liberi nel citoplasma, sono chiamati **poliribosomi liberi** (legati dal mRNA). Oppure, possono **legarsi al reticolo endoplasmatico ruvido**.

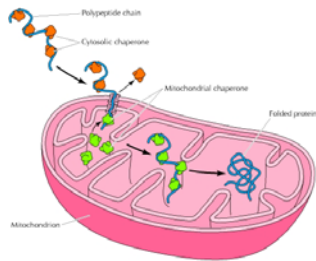


Ripiegamento delle proteine tradotte su ribosomi liberi

Azione dei chaperones durante la traduzione

I chaperones si all'N-terminale di una catena polipeptidica in crescita, stabilizzandola in una configurazione non ripiegata finché la sintesi del polipeptide non è completata. La proteina completata viene rilasciata dal ribosoma ed è in grado di ripiegarsi nella sua conformazione tridimensionale corretta.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9843/figure/A1201/?report=objectonly>



Azione dei chaperones durante il trasporto delle proteine

Un peptide parzialmente piegato viene trasportato dal citosol ad un mitocondrio. Proteine chaperones citosoliche stabilizzano la configurazione parzialmente ripiegata. I chaperones mitocondriali facilitano il trasporto e ulteriore ripiegamento di una catena polipeptidica all'interno dell'organello.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9843/figure/A1202/?report=objectonly>

Table 7.2 Molecular Chaperones

Chaperone proteins		
Protein family	Prokaryotes	Eukaryotes
Hsp70	DnaK	Hsc73 (cytosol)
		BIP (endoplasmic reticulum)
		SSC1 (mitochondria)
		ctHsp70 (chloroplasts)
Hsp60	GroEL	TriC (cytosol)
		Hsp60 (mitochondria)
		Cpn60 (chloroplasts)
Hsp90	HtpG	Hsp90 (cytosol)
		Grp94 (endoplasmic reticulum)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9843/table/A1203/?report=objectonly>

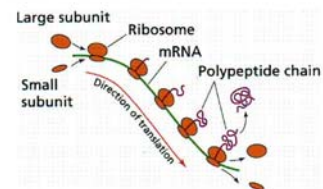
TIPI E LOCALIZZAZIONE DEI RIBOSOMI

TIPO E LOCALIZZAZIONE DEI RIBOSOMI

I ribosomi si trovano nelle cellule i due modi: **liberi** o **legati**.

Ribosomi liberi

- ◆ Si trovano nel **citiosol**
- ◆ Possono trovarsi o come ribosomi singoli o in gruppi noti come **poliribosomi** o **polisomi**



Ribosomi liberi, segue

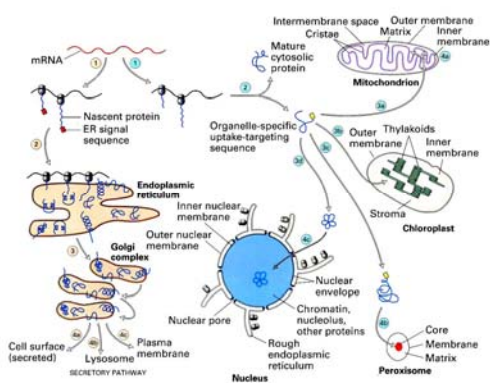
- ✦ Si trovano in numero maggiore rispetto ai ribosomi legati in quelle cellule che trattengono la maggior parte delle proteine che fabbricano.
- ✦ Sono responsabili delle **proteine che non funzioneranno nel sistema delle endomembrane o saranno secrete**, ma di quelle che vanno in **soluzione**, o formano **strutture citoplasmatiche** di grandi dimensioni o elementi mobili (ad es. il citoscheletro), oppure vanno nel **nucleo** o nei **mitocondri, cloroplasti** o **perossisomi**.

Ribosomi legati

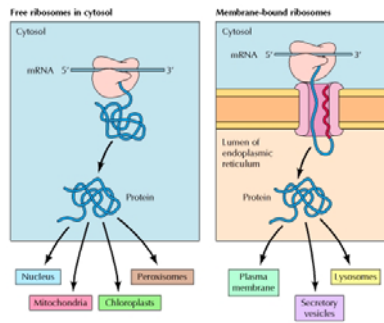
- ✦ Si trovano legati all'esterno del reticolo endoplasmatico (RE) costituendo il reticolo endoplasmatico ruvido/rugoso (RER).
- ✦ Sono coinvolti nella sintesi di proteine di secrezione o che lavorano entro il sistema delle endomembrane.
- ✦ Sono presenti in numero maggiore a quello dei ribosomi liberi nelle cellule che secernono le proteine sintetizzate (ad es. nelle cellule pancreatiche che producono enzimi digestivi).

Altre localizzazioni dei ribosomi

- ✦ Si trovano inoltre nei mitocondri e nei cloroplasti delle cellule eucariotiche.
- ✦ Questi ribosomi hanno sempre minori dimensioni rispetto ai ribosomi citoplasmatici e sono paragonabili ai ribosomi dei procarioti sia in dimensioni che in sensibilità agli antibiotici.



PANORAMICA DELLO SMISTAMENTO DELLE PROTEINE



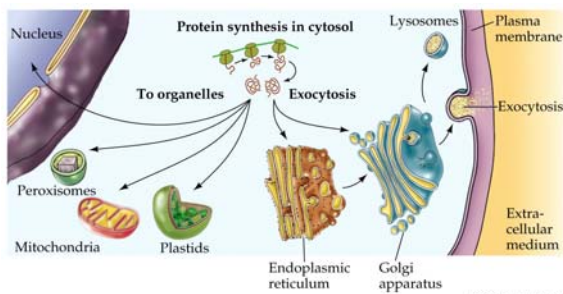
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9889/figure/A1470/>

PANORAMICA DELLO SMISTAMENTO DELLE PROTEINE

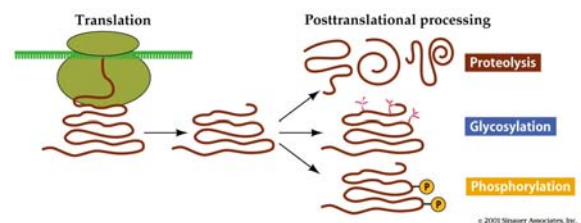
- Nelle cellule eucariotiche superiori, lo smistamento iniziale delle proteine mediato dal reticolo endoplasmatico ha luogo ancora durante il processo della traduzione.
- Le **proteine sintetizzate sui ribosomi liberi** o rimangono nel **citosol** oppure sono trasportate al **nucleo**, **mitocondri**, **cloroplasti** o **perossisomi**.
- Viceversa, le **proteine sintetizzate sui ribosomi legati alla membrana del RE** sono traslocati verso l'ER ancora nel corso della loro traduzione. Esse possono essere sia **trattenute all'interno del RE** oppure trasportate **all'apparato del Golgi** e da qui ai **lisosomi**, alla **membrana plasmatica** o **all'esterno della cellula** mediante vescicole di secrezione.

Eventi post-traduzionali

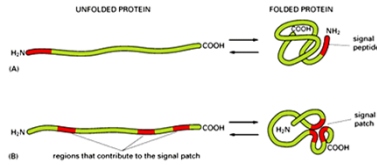
Specifici segnali, contenuti nella sequenza amminoacidica delle proteine, le dirigono alle loro destinazioni cellulari finali



Le modificazioni covalenti delle proteine dopo la traduzione includono: proteolisi, glicosilazione e fosforilazione.

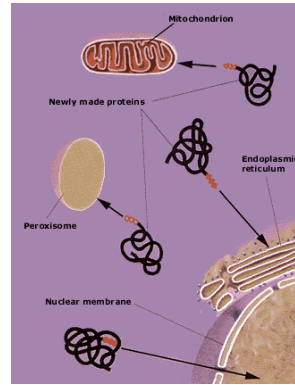


Due modi per costruire un segnale di smistamento ("sorting") in una proteina:



Il segnale risiede in un singola e ristretta sequenza lineare di aminoacidi, detta "peptide segnale" che è esposta nella proteina ripiegata. I peptidi segnali spesso si trovano all'estremità di una catena polipeptidica (come illustrato), ma possono anche trovarsi in un'altra zona.

Un "patch" segnale (pezza, toppa) si può formare mediante giustapposizione di aminoacidi di regioni che sono separate fisicamente prima che la proteina si ripieghi (come illustrato); in alternativa, "patches" separati sulla superficie della proteina ripiegata distanziati in modo fisso potrebbero formare il segnale. In qualsiasi caso, il segnale di trasporto dipende dalla conformazione tridimensionale della proteina, il che rende difficile localizzare il segnale con precisione.



In 1980 Blobel propose che le proteine di nuova sintesi siano indirizzate ("targeted") verso e importate nei vari organelli all'interno della cellula mediante sequenze segnale incorporate. I segnali sono corte sequenze di aminoacidi codificate dal gene che specifica la proteina. Esse possono essere localizzate in qualsiasi delle estremità (N-terminale o C-terminale) della proteina o da qualche parte al suo interno.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6100124>

SIGNAL SEQUENCES of AUTONOMOUS ORGANELLES

ORGANELLE	SIGNAL... TO	Description
MITOCHONDRIA	mitoplasm	a mitochondrial-targeting signal sequence in proteins that is a short sequence @ N-terminal with + charged aa's (LYS & ARG). Signal sequence folds into α -helix with +s on one side of helix
	outer membrane	a mitochondrial-targeting sequence, followed by a stop transfer sequence that prevent entry through outer membrane porin channel
	Inter-membrane space	a mitochondrial-targeting sequence, followed by a cleavage site that results in release of protein into peri-mitochondrial space
	Inner-membrane space	a mitochondrial-targeting sequence, with one of more transmembrane aa domain regions
CHLOROPLAST	Chloroplasm	contains - an uncharged α -helix with polar aa's along one side
	Outer membrane	may be a chloroplast-targeting aa signal sequence and a stop transfer sequence ???
	Inter-membrane space	may be a chloroplast-targeting aa signal sequence and a cleavage site that releases protein into peri-chloroplast space ???

<http://porrax.bio.miami.edu/~cmalfery/150/cells/organelle.htm>

Antibacterial Drugs

Drug	Description and Mode of Action	Clinical Considerations	Method of Resistance
Antibacterial Drugs That Alter Cytoplasmic Membranes			
Gramicidin	Short polypeptide that forms pore across cytoplasmic membrane, allowing single-charged cations to cross freely	Spectrum of action: G ⁺ bacteria Route of administration: Topical Adverse effects: Toxic (also forms pores in eukaryotic membranes)	Not known
Polymyxin	Produced by <i>Bacillus polymyxa</i> ; destroys cytoplasmic membranes of susceptible cells	Spectrum of action: Effective against G ⁻ bacteria, particularly <i>Pseudomonas</i> , and some amoebae Route of administration: Topical Adverse effects: Toxic to kidneys	Results from changes in cell membrane that prohibit entrance of the drug
Pyrazinamide	Disrupts membrane transport	Spectrum of action: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Route of administration: Oral Adverse effects: Malaise, nausea, diarrhea	Results from point mutations in bacterial gene for enzyme necessary to activate drug

http://www.pcc.maricopa.edu/Biology/crotter/BIO%20205/LessonBuilders/Chapter%2012%20L8/RevisedCh12LessonBuilder_print.html