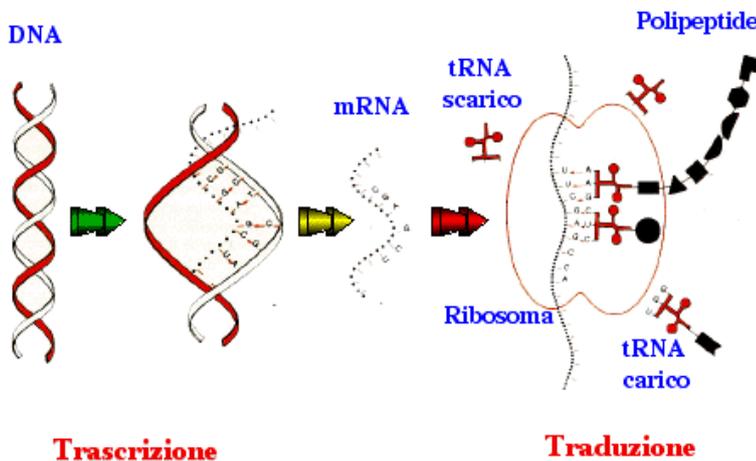


# METABOLISMO PROTEICO



Le proteine sono il prodotto finale della maggior parte delle vie dell'informazione. Una cellula ha bisogno in ogni momento di migliaia di proteine. Queste devono essere sintetizzate in risposta alle esigenze contingenti, trasportate nell'appropriata sede cellulare e degradate quando non sono più necessarie. I componenti fondamentali e i meccanismi utilizzati per la sintesi proteica sono conservati ugualmente in tutti gli organismi

viventi (procarioti ed eucarioti).

Per valutare l'importanza fondamentale della sintesi proteica, devono essere prese in considerazione la percentuale delle risorse cellulari impiegate per questo processo. La sintesi proteica può utilizzare fino al 90% dell'energia chimica necessaria alla cellula per tutte le reazioni biosintetiche. Ogni cellula procariotica, archeale ed eucariotica contiene migliaia di copie di differenti proteine e RNA. Nel complesso, fattori proteici, RNA, enzimi e ribosomi costituiscono il 35% del peso secco della cellula. Quindi i fattori che determinano il processo della sintesi proteica sono i più numerosi all'interno della cellula, cosa che fa dedurre l'estrema importanza di questo processo.

## CODICE GENETICO

Prima degli anni '50 c'era molta confusione sul metabolismo delle proteine, per esempio si pensava che le malattie genetiche fossero causate errori a livello del DNA, ma non si pensava ancora che gli errori sarebbero stati trasportati a livello delle proteine.

Tre grandi scoperte hanno posto le basi per l'attuale conoscenza della biosintesi delle proteine.

1) All'inizio degli anni '50, alcuni ricercatori hanno eseguito una serie di esperimenti volti a chiarire quale fosse la localizzazione cellulare della sintesi proteica. Essi iniettarono amminoacidi radioattivi nei ratti; quindi, a intervalli di tempo diversi dopo l'iniezione, il fegato veniva rimosso, omogeneizzato e frazionato per centrifugazione. Le frazioni subcellulari venivano poi esaminate al fine di determinare la presenza di proteine radioattive. Se si lasciavano trascorrere ore, o addirittura giorni, dall'iniezione di amminoacidi marcati, si notava che tutte le frazioni subcellulari contenevano proteine marcate; invece, quando il fegato veniva rimosso e frazionato pochi minuti dopo l'iniezione degli amminoacidi marcati, le proteine marcate si trovavano solo in una frazione contenente piccole particelle ribonucleoproteiche. Queste particelle, visibili al microscopio, furono pertanto identificate come il sito dove, a partire dagli amminoacidi, avveniva la sintesi proteica; in seguito vennero chiamate **ribosomi**. Successivamente si scoprì che i ribosomi possono essere attaccati al RER (in questo caso sintetizzano proteine che andranno a far parte della membrana plasmatica o andranno fuori dalla cellula) oppure liberi nel citosol (in questo caso sintetizzano proteine che andranno a far parte del citosol stesso).

2) Alcuni ricercatori osservarono che gli amminoacidi venivano "attivati" se erano incubati con ATP e con la frazione citosolica delle cellule epatiche. Gli amminoacidi si legavano a una forma speciale di RNA solubile e stabile al calore, in seguito chiamata **tRNA**. Gli enzimi che catalizzano questo processo sono le **amminoacil-tRNA sintetasi**.

3) Alcuni ricercatori fecero un'importante scoperta, in seguito alla domanda che si pose Crick su quale fosse il meccanismo attraverso il quale l'informazione genetica, codificata nel linguaggio a 4 lettere degli acidi nucleici, venisse tradotta nel linguaggio a 20 lettere delle proteine. Crick intuì che

un piccolo acido nucleico (RNA) poteva agire da adattatore, con una parte della sua molecola che lega un amminoacido specifico e un'altra parte che riconosce la breve sequenza dell'mRNA che codifica quell'amminoacido. Questa idea fu presto verificata. Il tRNA adattatore "traduce" la sequenza nucleotidica dell'mRNA nella sequenza amminoacidica del polipeptide. Il processo complessivo della sintesi proteica guidata dall'mRNA viene chiamato **traduzione**. L'adattatore deve avere due caratteristiche: essere specifico per un codone e per un amminoacido.

Queste scoperte portarono presto alla conoscenza dei passaggi fondamentali della sintesi proteica e infine alla decifrazione del codice genetico che specifica i singoli amminoacidi.

Il codice genetico è la successione di triplette che si hanno sull'mRNA. L'mRNA è l'acido nucleico che risulta dalla copiatura di un tratto di DNA su un mRNA, in cui ci sono le basi che sono complementari a quelle del DNA. Ciascuna di queste basi del mRNA rappresenta la base complementare rispetto a quella che c'era sul DNA.

### Codone

Negli anni '60 era evidente che erano necessari almeno 3 residui nucleotidici di DNA per codificare ciascun amminoacido. Il codice a 4 lettere del DNA (A, T, G e C), a gruppi di 2, può dare solo  $4^2 = 16$  combinazioni diverse, non sufficienti a codificare 20 amminoacidi. Gruppi di 3 possono dare però  $4^3 = 64$  diverse combinazioni. Non sappiamo perché abbiamo questo eccesso di codoni rispetto al numero di amminoacidi che devono essere utilizzati, ma sappiamo che più amminoacidi sono codificati da più codoni, anche se non direttamente da tutti. Esistono codoni attivi e codoni silenti, che potrebbero codificare per uno specifico amminoacido, ma non sono attivi.

Molte delle proprietà chiave del codice genetico erano state definite in studi genetici precedenti. Un **codone** è una tripletta di nucleotidi che codifica uno specifico amminoacido. La traduzione avviene quando queste triplette di nucleotidi vengono lette in successione senza sovrapposizioni. Un primo codone specifico della sequenza determina il **quadro di lettura**, in base al quale ogni 3 residui nucleotidici inizia un nuovo codone. Non esiste punteggiatura tra i codoni di due amminoacidi in successione. La sequenza amminoacidica di una proteina è definita dalla sequenza lineare di codoni contigui costituiti da 3 nucleotidi. Secondo questo schema, ci sono 3 possibili quadri di lettura per ogni singolo filamento di DNA o di mRNA. Ognuno determina 3 diverse sequenze di codoni, ma solo uno è in grado di codificare una determinata proteina. La lettura dell'mRNA è una lettura lineare, non sovrapposta e senza punteggiatura.

Rimaneva però irrisolta la questione su quali sono le parole del codice a tre lettere che specificano i diversi amminoacidi. Alcuni ricercatori avevano incubato il poliribonucleotide sintetico poliuridilato, poli (U). Poiché il poli (U) può essere considerato come un mRNA artificiale contenente molte triplette UUU in successione, dovrebbe promuovere la sintesi di un polipeptide formato da uno solo dei 20 amminoacidi, quello codificato dalla tripletta UUU. Infatti, si formò un polipeptide contenente solo la fenilalanina. Lo stesso esperimento è stato eseguito con il poli (C), da cui si formò un polipeptide contenente solo la prolina, e il poli (A), da cui si formò un polipeptide contenente solo la lisina.

Il consolidamento dei risultati ottenuto attraverso molti altri esperimenti ha permesso di assegnare 61 dei 64 possibili codoni. Gli altri 3 sono stati identificati come codoni di terminazione, perché interrompevano la sequenza degli amminoacidi quando venivano inclusi nella sequenza di un polimero di RNA sintetico.

La decifrazione del codice genetico è ritenuta una delle più importanti scoperte scientifiche del XX secolo.

I codoni sono la chiave per la traduzione dell'informazione genetica che dirige la sintesi di specifiche proteine. Il quadro di lettura deve pertanto essere stabilito correttamente all'inizio della traduzione di una molecola di mRNA, e in seguito deve essere mantenuto quando il macchinario sintetico legge sequenzialmente da una tripletta alla successiva. Se il quadro di lettura iniziale è spostato di 1 o 2 basi, o se viene accidentalmente saltato un nucleotide dell'mRNA, tutti i codoni

successivi saranno fuori registro e porteranno alla formazione di una proteina non presente in natura, con una sequenza di amminoacidi sbagliata.

Alcuni codoni hanno funzioni specifiche:

- **Codone di inizio (AUG)**: è il segnale più comune di inizio delle catene polipeptidiche in tutte le cellule, inoltre codifica i residui di **metionina** posti all'interno dei polipeptidi.

- **Codoni di terminazione o di stop (UAA, UAG, UGA)**: segnalano la fine della sintesi della catena polipeptidica e non codificano nessun amminoacido conosciuto.

L'inizio della sintesi proteica in una cellula è un processo elaborato che ha bisogno, oltre che di un codone di inizio, anche di altri segnali presenti sull'mRNA

### Anticodone

Quando diversi codoni specificano un singolo amminoacido, la differenza tra i vari codoni generalmente riguarda la terza base (all'estremità 3'). Per esempio, l'alanina viene codificata dalle triplette GCU, GCC, GCA e GCG. I codoni di quasi tutti gli amminoacidi possono essere rappresentati simbolicamente con  $XY_G^A$  o  $XY_C^U$ . Le prime due lettere di ciascun codone sono pertanto i principali determinanti della specificità, una caratteristica che ha alcune interessanti conseguenze.

I tRNA riconoscono i codoni grazie all'appaiamento di basi tra il codone dell'mRNA e la tripletta del tRNA chiamata **anticodone**. La prima base del codone (che viene letto sempre in direzione 5' → 3') si appaia con la terza base dell'anticodone. Se la tripletta anticodone di uno specifico tRNA riconoscesse una sola tripletta codone attraverso il classico appaiamento delle basi, le cellule dovrebbero avere un tRNA diverso per ciascun codone che specifica un amminoacido. Ma non è così, poiché gli anticodoni di alcuni tRNA presentano il nucleotide **inosinato (I)**, che contiene l'inconsueta base ipoxantina. Modelli molecolari dimostrano che l'inosinato può formare legami H con tre diversi nucleotidi (U, C e A), ma questi appaiamenti sono piuttosto deboli rispetto ai forti legami H tipici degli appaiamenti classici ( $G \equiv C$  e  $A = U$ ). Nel lievito, per esempio, un tRNA ha l'anticodone (5') ICG, che può riconoscere tre diversi codoni dell'arginina: (5') CGA, (5') CGU e (5') CGC. Le prime due basi di questi codoni sono identiche (CG) e formano forti appaiamenti con le basi complementari degli anticodoni, ma la terza base dei tre codoni (A, U e C), che corrispondono all'arginina, forma dei legami H piuttosto deboli con il residuo I posto nella prima posizione dell'anticodone.

L'esame di questi e di altri appaiamenti codone-anticodone, indussero Crick a concludere che la terza base della maggior parte dei codoni si appaia in modo piuttosto "libero" con la base complementare del proprio anticodone. In conclusione:

1) Le prime due basi di un codone di mRNA formano sempre forti appaiamenti classici con le basi complementari dell'anticodone del tRNA e conferiscono la maggior parte della specificità di codificazione.

2) La prima base di alcuni anticodoni (leggendo in direzione 5' → 3') determina il numero di codoni letti da un dato tRNA. Quando la prima base dell'anticodone è C o A, il legame è specifico e quel tRNA legge un solo codone. Quando la prima base è U o G, il legame è meno specifico e possono essere letti due diversi codoni. Quando l'inosinato (I) è il primo nucleotide di un anticodone, da quel tRNA possono venir letti tre diversi codoni. Questo è il numero massimo di codoni che può essere riconosciuto da un tRNA.

- Un codone riconosciuto:  $XYC (5') = X'Y'G (3') / XYA (5') = X'Y'U (3')$
- Due codoni riconosciuti:  $XYU (5') = X'Y'G^A (3') / XYG (5') = X'Y'U^C (3')$
- Tre codoni riconosciuti:  $XYI (5') = X'Y'G^A (3')$

3) Quando un amminoacido viene specificato da più codoni diversi, i codoni che differiscono in una delle prime basi necessitano di tRNA diversi.

4) Per la traduzione di tutti i 61 codoni sono necessari come minimo 32tRNA (31 che codificano gli amminoacidi e 1 per l'inizio).

La terza base del codone contribuisce alla specificità, ma, a causa dell'appaiamento più debole con la base corrispondente sull'anticodone, permette una dissociazione rapida del tRNA dal suo codone durante la sintesi proteica. Se tutte e tre le basi presenti sul codone formassero forti appaiamenti classici con le 3 basi sull'anticodone, il tRNA si dissocerebbe troppo lentamente e ciò limiterebbe molto la velocità della sintesi proteica. Le interazioni esistenti tra codoni e anticodoni ottimizzano la risposta alle necessità di accuratezza e di velocità

### Variazioni del codice genetico

Il **codice genetico** è al decifrazione del messaggio scritto sul DNA, che guida la sintesi delle proteine. Le proteine devono possedere una sequenza ben definita di amminoacidi, a tal caso esistono malattie genetiche che dipendono dalla sostituzione di un amminoacido con un altro. La sintesi proteica non deve commettere errori, perché gli errori commessi dalla sintesi proteica possono essere alla base di malattie estremamente gravi. La sintesi proteica è uno dei metabolismi più sottoposti a regolazione.

## **RIBOSOMA E tRNA**

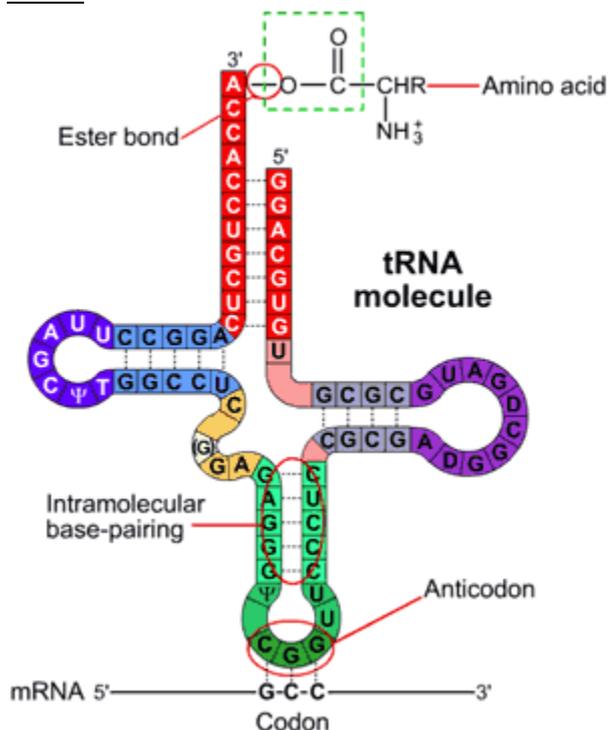
### Ribosoma

Ogni cellula di *E. coli* contiene 15 mila o più ribosomi, che costituiscono circa un quarto del peso secco della cellula. I ribosomi batterici sono formati per circa il 65% da rRNA e per il restante 35% da proteine. Questi corpuscoli hanno un diametro di circa 18nm e sono composti da due subunità non uguali, con un coefficienti di sedimentazione rispettivamente di 30S e 50S, mentre quello del ribosoma completo è 70S.

In condizioni sperimentali appropriate, l'rRNA e le proteine si riassociano spontaneamente per formare le subunità 30S o 50S con struttura e attività praticamente identiche alle subunità native.

Le subunità ribosomiali sono enormi molecole di RNA. Nella subunità 50S, gli rRNA 5S e 23S formano il nucleo della struttura.

### tRNA



Per capire in che modo i tRNA possono funzionare come adattatori nella traduzione del linguaggio degli acidi nucleici nel linguaggio delle proteine, occorre prima esaminare la loro struttura in maniera più dettagliata. I tRNA sono relativamente piccoli e sono costituiti da una singola elica di RNA ripiegata in modo da formare una precisa struttura tridimensionale. Nei batteri e nel citosol degli eucarioti i tRNA hanno da 73 a 93 residui nucleotidici che corrispondono a masse molecolari che vanno da 24 mila a 31 mila. Le cellule contengono almeno un tipo di tRNA per ciascun amminoacido; sono necessari almeno 32tRNA per riconoscere tutti i codoni degli amminoacidi (alcuni riconoscono più di un codone), ma alcune cellule ne usano più di 32.

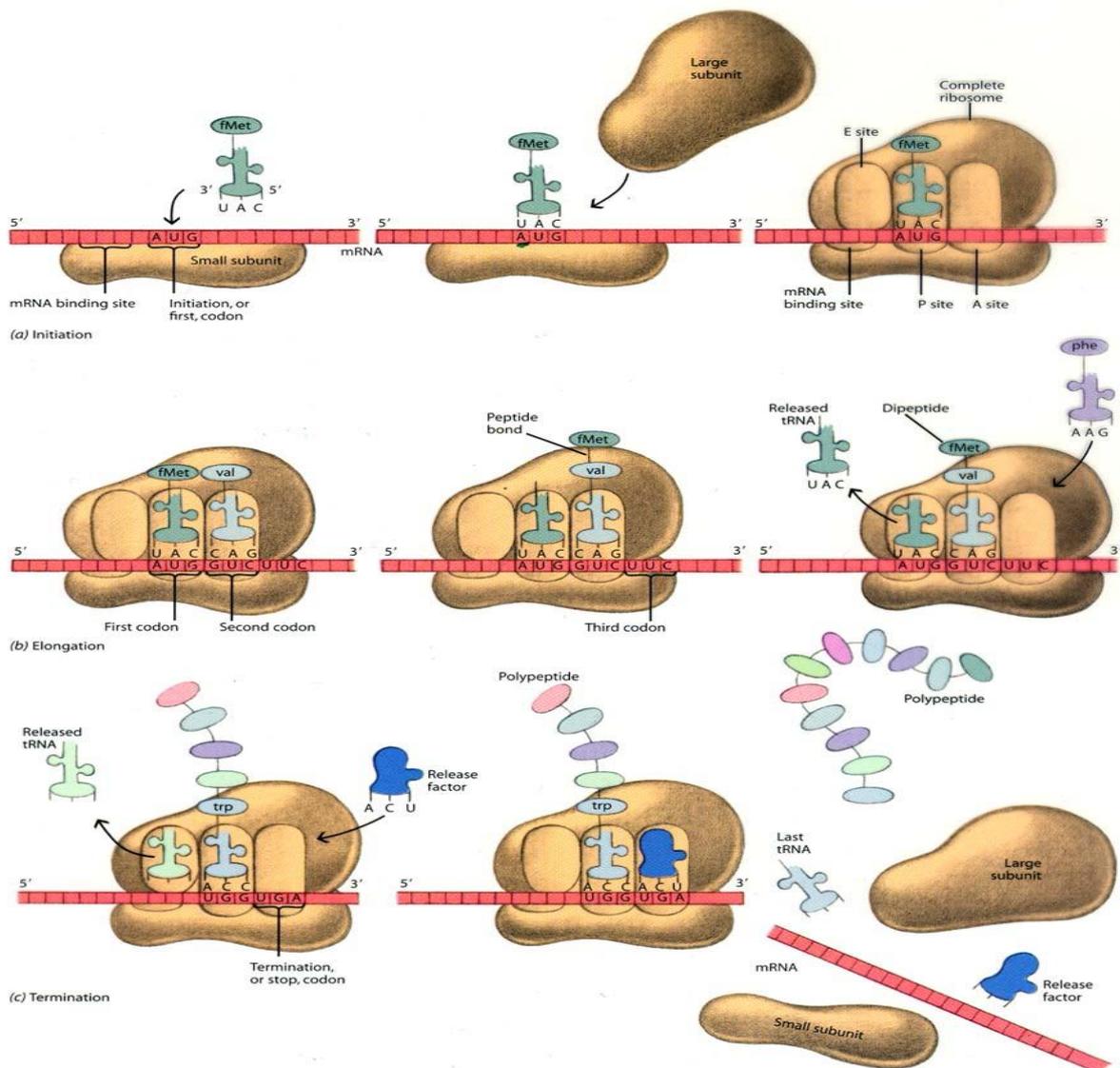
Otto o più residui nucleotidici di tutti i tRNA hanno basi e zuccheri modificati, molti dei quali sono derivati metilati delle basi principali. La maggior parte dei tRNA ha un residuo di guanilato

all'estremità 5' e tutti hanno la sequenza trinucleotidica 3'(CCA) all'estremità 3'. Se rappresentati nella forma a due dimensioni, i legami H di tutti i tRNA stabilizzano una struttura costituita da tre

anse e uno stelo, simile a un trifoglio. I tRNA più lunghi hanno anche una quinta ansa più corta, chiamata **braccio extra**.

Due regioni di tRNA sono di importanza fondamentale per la funzione di adattatore. Lo **stelo** (o **braccio**) **accettore dell'amminoacido** trasporta uno specifico amminoacido, legato mediante un legame estere tra il gruppo carbossilico dell'amminoacido e il gruppo ossidrilico 2' o 3' del residuo di adenosina all'estremità 3' del tRNA. L'**ansa** (o **braccio**) **dell'anticodone** contiene l'anticodone. Le altre due regioni principali sono l'**ansa D**, che contiene l'inusuale nucleotide diidrouridina (D), e l'**ansa T $\psi$ C**, che contiene ribotimidina (T), di solito assente negli RNA perché c'è l'uracile, e pseudouridina ( $\psi$ ), che possiede un legame C-C tra la base e il ribosio.

## SINTESI PROTEICA



La sintesi delle biomolecole polimeriche può essere suddivisa in stasi di inizio, allungamento e terminazione. Questi processi fondamentali sono di norma preceduti e seguiti da due ulteriori stadi: l'attivazione dei precursori degli amminoacidi, prima della sintesi, e le modificazioni post-sintetiche del polimero completato. L'attivazione degli amminoacidi prima della loro incorporazione nei polipeptidi e le modificazioni post-traduzionali svolgono un ruolo particolarmente importante nell'assicurare sia la fedeltà della sintesi, sia la funzione appropriata della proteina prodotta. I componenti cellulari coinvolti nelle **cinque fasi della sintesi proteica** nell'E. coli e in altri batteri

sono molto simili a quelli necessari alle cellule eucariotiche, sebbene il numero dei componenti sia a volte più grande.

### Attivazione degli amminoacidi

Tutti gli anabolismi necessitano di energia libera che vada a trasformare le reazioni endoergoniche tra i reagenti in reazioni esoergoniche. La sintesi di un polipeptide con una sequenza definita necessita di due fondamentali requisiti chimici:

- Il gruppo carbossilico di ciascun amminoacido deve essere attivato per facilitare la formazione del legame peptidico.
- Deve essere stabilita una corrispondenza tra ciascun nuovo amminoacido e l'informazione contenuta nell'mRNA che lo codifica.

Entrambi questi requisiti vengono ottenuti tramite l'attacco dell'amminoacido al tRNA nella prima fase della sintesi proteica. L'attacco del corretto amminoacido al corrispondente tRNA costituisce il punto cruciale. Questa fase avviene nel citosol, non sui ribosomi. Ciascuno dei 20 amminoacidi è legato covalentemente a uno specifico tRNA, utilizzando energia fornita dall'ATP ad enzimi attivatori  $Mg^{2+}$ -dipendenti, chiamati **amminoacil-tRNA sintetasi**. Quando sono attaccati ai loro amminoacidi, i tRNA vengono definiti "carichi".

Il riconoscimento è cruciale ed è il primo punto di controllo della sintesi proteica. L'amminoacido ha un tRNA, il quale tRNA porta legati dei segnali che sono rappresentati dall'anticodone che lo trasportano sul un punto preciso dell'mRNA. Il riconoscimento tra ciascuno di questi 20 amminoacidi e l'enzima che lo lega al tRNA deve essere un riconoscimento altamente specifico. Se l'enzima lega a un tRNA l'amminoacido sbagliato, questo tRNA trasporterà l'amminoacido sbagliato in un posto sbagliato (es. se il tRNA della serina lega la treonina, nella sequenza degli amminoacidi delle proteine ci sarà un treonina al posto di una serina, da cui possono derivare malattie genetiche). Questo è uno dei punti di maggiore criticità della sintesi proteica. Le tRNA sintetasi sono enzimi molto particolari e hanno anch'essi la possibilità di sbagliare. Le tRNA sintetasi, oltre che avere un sito catalitico molto molto specifico, hanno anche un sito idrolitico. Se viene inserito un amminoacido sbagliato, questo errore viene riconosciuto dal sito idrolitico, il quale rompe il legame appena formato dall'amminoacido inserito. Quindi, la cellula inserisce un amminoacido, ma poi c'è il sito idrolitico che controlla che tutto sia andato bene. Se l'inserimento è giusto non succede nulla, ma se non è giusto, il sito idrolitico idrolizza il legame, lo rompe e potrà essere reinserito un nuovo tRNA con l'amminoacido corretto.

### Inizio

L'inizio della sintesi proteica nei batteri richiede:

- Subunità ribosomiale **30S**
- **mRNA** che codifica il polipeptide che deve essere sintetizzato
- **fMet-tRNA<sup>fMet</sup>** di inizio
- Fattori di inizio **IF-1, IF-2 e IF-3**
- **GTP**
- Subunità ribosomiale **50S**
- **Mg<sup>2+</sup>**

L'mRNA che contiene il codice del polipeptide da sintetizzare si lega alla subunità minore del ribosoma e all'amminoacil-tRNA di inizio (nei batteri è la formil metionina). A questo punto si lega la subunità ribosomiale maggiore (come un panino) e si forma un complesso di inizio. L'amminoacil-tRNA di inizio si appaia al codone AUG dell'mRNA che segnala l'inizio della catena polipeptidica. Questo processo richiede GTP e viene promosso da specifiche proteine citosoliche chiamate fattori di inizio (nei procarioti sono 3, ma negli eucarioti sono molti di più). La chiusura del panino consente all'mRNA di muoversi fino a che non va incontro al codone di stop. L'mRNA si lega alla subunità minore del ribosoma direttamente col codone AUG, quindi non dall'inizio dell'estremità 5', ma un po' più spostato.

La subunità ribosomiale 30S si lega ai due fattori di inizio IF-1 e IF-3. Il fattore IF-3 impedisce l'assemblaggio prematuro delle subunità 30S e 50S. a questo punto ha luogo il legame dell'mRNA alla subunità 30S. Il codone di inizio (5')AUG viene diretto verso la sua corretta posizione da un segnale di inizio presente sull'mRNA chiamato **sequenza di Shine-Dalgarno**. Questa sequenza è un segnale di inizio costituito da 4-9 residui purinici situato 8-13 coppie di basi prima del codone di inizio, in direzione 5'. La sequenza di Shine-Dalgarno viene riconosciuta da una sequenza complementare ricca di pirimidine vicino all'estremità 3' dell'rRNA 16S della subunità 30S, con la quale si appaia. Questa interazione mRNA-rRNA immobilizza l'mRNA in modo che (5')AUG sia posizionato correttamente sulla subunità 30S per l'inizio della traduzione. Lo specifico codone (5')AUG al quale si deve legare l' $fMet$ -tRNA<sup>fMet</sup> viene così individuato rispetto ai codoni delle metionine interne grazie alla sua vicinanza alla sequenza di Shine-Dalgarno sull'mRNA.

I ribosomi batterici hanno tre siti che legano i tRNA:

- **Sito A** (amminoacilico)
- **Sito P** (peptidilico)
- **Sito E** (uscita, da *exit*)

I siti A e P legano gli amminoacil-tRNA, mentre il sito E si lega solo ai tRNA scarichi che hanno svolto la loro funzione sul ribosoma. Sia la subunità 30S che la subunità 50S contribuiscono alle caratteristiche dei siti A e P, mentre il sito E è in gran parte confinato sulla subunità 50S. il codone di inizio (5')AUG si posiziona nel sito P, l'unico sito a cui si lega  $fMet$ -tRNA<sup>fMet</sup>.  $fMet$ -tRNA<sup>fMet</sup> è l'unico amminoacil-tRNA che si lega prima al sito P; durante la successiva fase di allungamento, tutti gli altri amminoacil-tRNA entranti si legano dapprima al sito A, e solo successivamente ai siti P ed E. Il sito E è il sito dal quale escono i tRNA scarichi durante l'allungamento. Il fattore IF-1 si lega al sito A e impedisce il legame del tRNA in questo sito durante la fase di inizio.

### Allungamento

Il terzo stadio della sintesi delle proteine è l'allungamento. L'allungamento richiede:

- **Complesso di inizio**
- **Amminoacil-tRNA**
- Fattori di allungamento **EF-Tu, EF-Ts** ed **EF-G**
- **GTP**

La catena polipeptidica nascente si allunga per unione covalente di unità amminoacidiche successive, ciascuna trasportata verso il ribosoma e correttamente posizionata dal rispettivo tRNA, che si appaia al codone corrispondente sull'mRNA. L'allungamento viene coordinato da proteine citosoliche chiamate fattori di allungamento. Il legame di ciascun amminoacil-tRNA e lo scorrimento del ribosoma lungo l'mRNA sono facilitati dall'idrolisi di GTP per ogni residuo aggiunto alla catena nascente.

Anche questa è una fase critica, perché una volta fatto il legame peptidico, essendo un legame covalente, non si rompe più. C'è un punto di controllo in cui si verifica che il tRNA, che porta l'amminoacido, porti quello giusto. Tutto questo avviene in frazioni di secondo, dato che una proteina di 100 amminoacidi viene sintetizzata in circa 5 secondi. Tutti questi processi di controllo e correzione dovrebbero richiedere del tempo, invece è questa operazione è velocissima. La proteina subisce un controllo di qualità per quanto riguarda la struttura. Se la proteina ha un amminoacido sbagliato, la proteina viene distrutta. Se qualcosa è sfuggito ai controlli intermedi, c'è un controllo finale che elimina la proteina.

L'attività enzimatica che catalizza la formazione del legame peptidico è stata chiamata **peptidil trasferasi**.

### Terminazione e riciclo del ribosoma

L'allungamento prosegue finché il ribosoma aggiunge l'ultimo amminoacido codificato dall'mRNA. La terminazione, la quarta fase della sintesi proteica, è segnalata da uno dei tre codoni di terminazione dell'mRNA (UAA, UAG e UGA), che fa immediatamente seguito al codone

dell'ultimo amminoacido. Nei batteri, quando un codone di terminazione occupa il sito A sul ribosoma, tre fattori di terminazione o fattori di rilascio, le proteine **RF-1**, **RF-2** e **RF-3**, provvedono a effettuare:

- 1) Idrolisi del legame terminale del peptidil-tRNA
- 2) Rilascio del polipeptide libero e dell'ultimo tRNA, ora scarico, dal sito P
- 3) Dissociazione del ribosoma 70S nelle sue subunità 30S e 50S, rendendo così possibile l'inizio di un nuovo ciclo di sintesi proteica.

RF-1 riconosce i codoni di terminazione UAG e UAA, ed RF-2 riconosce UGA e UAA. RF-1 o RF-2 si lega a un codone di terminazione e induce la peptidil transferasi a trasferire la catena polipeptidica a una molecola d'acqua invece che a un altro amminoacido. Questi fattori di rilascio contengono domini la cui funzione sembra essere quella di riprodurre la struttura del tRNA, come si è visto per il fattore di allungamento EF-G. Il riciclo del ribosoma porta alla dissociazione dei componenti della traduzione. I fattori di rilascio si dissociano dal complesso post-terminazione (con un tRNA non carico nel sito P) e sono sostituiti da EF-G e da una proteina chiamata **fattore di riciclo del ribosoma**. L'idrolisi di GTP da parte di EF-G porta alla dissociazione della subunità 50S dal complesso tRNA 30S-mRNA. EF-G e RRF sono sostituiti da IF-3, che promuove la dissociazione del tRNA. Viene infine rilasciato mRNA. Il complesso di IF-3 e della subunità 30S è così pronto per iniziare un altro ciclo di sintesi proteica.

Il completamento di una catena polipeptidica è segnalato da un codone di terminazione nell'mRNA. La nuova catena polipeptidica è quindi rilasciata dal ribosoma, con l'aiuto di proteine chiamate fattori di rilascio e il ribosoma è utilizzato per un altro ciclo di sintesi. La proteina cresce fino a raggiungere il numero predestinato di amminoacidi e la predestinazione del numero viene determinata dal fatto che a un certo punto nel ribosoma si presenta un codone che è un codone di stop.

### Ripiegamento e modificazione post-traduzionali

Per acquisire la sua forma biologicamente attiva, il nuovo polipeptide deve ripiegarsi nella sua conformazione tridimensionale. Primo o dopo il ripiegamento, nuovo polipeptide può subire modificazioni da parte degli enzimi, come la rimozione di uno o più amminoacidi, generalmente dall'estremità ammino-terminale; l'aggiunta di gruppi acetile, fosfato, metile, carbossile o altri a determinati residui amminoacidici; la scissione proteolitica della proteina; e/o l'attacco di oligosaccaridi o di gruppi prostetici. La glicosilazione della proteina fa sì che essa sia destinata a diventare una proteina di riconoscimento molecolare; la fosforilazione fa sì che essa sia destinata a diventare una proteina strutturale.

Nell'ultima fase della sintesi proteica, la catena polipeptidica in formazione si ripiega su se stessa e viene modificata per essere alla fine biologicamente attiva. A un certo punto, durante o dopo la sua sintesi, la catena polipeptidica assume spontaneamente la sua conformazione nativa, che permette la formazione del corretto numero di legami H, di interazioni deboli e di interazioni ioniche e idrofobiche. In questo modo il messaggio genetico lineare o unidimensionale presente nell'mRNA viene convertito nella struttura tridimensionale della proteina. Alcune proteine appena sintetizzate, sia nei procarioti sia negli eucarioti, non raggiungono la loro conformazione biologicamente attiva finché non sono state alterate in una o più reazioni di modificazione chiamate **modificazioni post-traduzionali**:

- Modificazioni ammino-terminali e carbossi-terminali
- Perdita delle sequenze di segnale
- Modificazioni di singoli amminoacidi
- Aggiunta di catene laterali di carboidrati
- Aggiunta di gruppi isoprenilici
- Aggiunta di gruppi prostetici
- Modificazioni proteolitiche
- Formazione di legami disolfuro

## **TARGETING E DEGRADAZIONE DELLE PROTEINE**

Il corretto indirizzamento delle proteine è dovuto alla presenza di etichette molecolari nella sequenza della catena polipeptidica nascente. Le etichette sono definite sequenze segnale o leader sequence (LS). In alcuni casi la sequenza segnale non è rappresentata dalla sequenza di specifici amminoacidi, ma è importante la sua composizione chimico-fisica e la sua lunghezza.

Le sequenze segnale sono necessarie e sufficienti per determinare il destino di una proteina. Esistono due vie principali di smistamento delle proteine: la via co-traduzionale o secretoria e la via post-traduzionale o citoplasmatica.

### Via co-traduzionale o secretoria

La LS per il RER si trova generalmente all'estremità N-terminale della proteina nascente. La LS interagisce con una particella presente nel citoplasma chiamata SRP che svolge un ruolo importante nell'importazione co-traduzionale. La SRP oltre a legare la LS, è in grado di legarsi ai ribosomi e questo porta all'interruzione della sintesi proteica. Inoltre, la SRP riconosce uno specifico recettore, detto recettore per l'SRP, presente sulla membrana del RER. Dopo il legame della SRP al suo recettore si ha la connessione delle sub-unità maggiori del ribosoma a particolari proteine dette riboforine, le quali permettono l'avvicinamento e l'adesione del ribosoma alla membrana del RER. A questo punto, la LS si stacca dalla SRP e la SRP viene staccata dal suo recettore e riciclata. Con il distacco della SRP riprende la sintesi proteica e la proteina viene trasferita nel lume del RER attraverso un complesso di proteine transmembranarie detto traslocone. Alla fine, un enzima specifico, la peptidasi del segnale, taglia la porzione N-terminale contenente l'LS e la proteina viene rilasciata nel lume del RER. Le proteine che vengono riconosciute dalla peptidasi del segnale ed entrano nel lume del RER, diventeranno proteine secrete o proteine destinate a rimanere nel lume del RER, del Golgi, dei lisosomi e degli endosomi. Alcune proteine formeranno proteine intrinseche transmembranarie che andranno a far parte della membrana plasmatica o delle membrane degli organelli. In questo caso le proteine non vengono rilasciate nel lume del RER, ma vengono trasportate alla loro destinazione finale come componenti di membrana.

### Via post-traduzionale o citoplasmatica

Dopo che la traduzione sui ribosomi liberi è completata, alcune proteine sono importate in maniera selettiva al nucleo, ai mitocondri, ai cloroplasti o ai perossisomi. Anche in questo caso intervengono etichette molecolari che indirizzano le proteine alla loro giusta destinazione. Esistono alcune proteine che vengono traslocate al RER dopo la loro sintesi nel citoplasma. In questi casi, le catene polipeptidiche sono associate a delle chaperonine nel citoplasma che le mantengono in una conformazione distesa.

### Modifiche post-traduzionali nel RER

Le proteine sintetizzate nel RER vanno incontro a varie modifiche post-traduzionali prima di raggiungere la loro destinazione finale. Solo le proteine che avranno assunto la corretta conformazione potranno uscire dal RER e raggiungere la loro destinazione finale, altrimenti verranno degradate attraverso diversi meccanismi. Le modificazioni post-traduzionali sono:

- Formazione di appropriati ripiegamenti
- Formazione di ponti disolfuro
- Assemblaggio in proteine multimeriche
- Glicosilazione delle proteine

Il corretto ripiegamento è facilitato dall'azione di chaperoni molecolari. Oltre a ciò è anche accompagnato dalla formazione di ponti disolfuro fra le cisteine in diverse regioni della catena polipeptidica. Questo è permesso nel lume del RER grazie alla presenza dell'enzima PDI (proteina disolfuro isomerasi). Molte proteine prodotte nel RER si assemblano a formare dei complessi multimerici. Un'altra importante modifica post-traduzionale è rappresentata dalla glicosilazione, cioè l'aggiunta di catene oligosaccaridi alla catena polipeptidica che si va costruendo a livello di

specifici residui di asparagina. Queste glicoproteine sono quindi trasportate nel Golgi, tramite vescicole di trasporto, dove la porzione zuccherina subirà ulteriori rimaneggiamenti. La glicosilazione è fondamentale perché rappresenta un controllo di qualità delle proteine e permette di raggiungere un folding corretto.

### Degradazione delle proteine

La degradazione delle proteine impedisce la formazione di proteine anomale o non necessarie e permette il riciclo degli amminoacidi. L'emivita delle proteine eucariotiche varia da 30 secondi a molti giorni. Il turnover della maggior parte delle proteine è rapido rispetto al tempo di vita delle cellule, anche se alcune proteine (come l'emoglobina) durano per l'intera vita della cellula. Le proteine che vengono degradate più rapidamente includono quelle difettose per l'inserimento di amminoacidi sbagliati o per danneggiamenti occorsi durante il normale funzionamento. Anche gli enzimi che agiscono in punti di regolazione chiave sono sottoposti a un rapido turnover.

Sia nei batteri sia negli eucarioti, le proteine difettose e quelle con emivita particolarmente breve sono generalmente degradate da sistemi citosolici ATP-dipendenti. Nei vertebrati, un secondo sistema agisce nei lisosomi e serve a riciclare gli amminoacidi delle proteine di membrana, delle proteine extracellulari e delle proteine con emivita particolarmente lunga.

Negli eucarioti la via ATP-dipendente è diversa, poiché coinvolge la proteina ubiquitina. L'**ubiquitina** (76 residui amminoacidici) è una delle proteine note più conservate ed è essenzialmente identica in organismi molto diversi tra loro come i lieviti e l'uomo. L'ubiquitina viene legata covalentemente alle proteine in fase di degradazione attraverso una via ATP-dipendente che utilizza tre enzimi distinti chiamati gli enzimi che attivano E1, gli enzimi che legano E2 e le ligasi E3. Le proteine ubiquitinate vengono degradate da un grande complesso chiamato **proteasoma 26S**. Il proteasoma eucariotico consiste di due copie, ciascuna formata da almeno 32 subunità diverse, la maggior parte delle quali è altamente conservata, dai lieviti all'uomo. Il proteasoma contiene due tipi principali di sub-complessi: una particella centrale (core), a forma di barile, e particelle regolatrici in ambedue le estremità del barile. Il nucleo 20S della particella è composto da quattro anelli: i due anelli alle estremità sono formati da 7 subunità  $\alpha$ , mentre quelli interni da 7 subunità  $\beta$ . Tre delle 7 subunità in ciascun anello  $\beta$  hanno attività proteasica, ciascuna con differente specificità di substrato. Gli anelli impilati della particella centrale formano la struttura a barile, all'interno della quale vengono degradate le proteine. Su ciascuna estremità del nucleo vi è una particella regolatrice 19S che contiene approssimativamente 18 subunità, comprese alcune che riconoscono e legano le proteine ubiquitinate. Sei subunità sono AAA + ATPasi e probabilmente hanno un ruolo nel processo di disavvolgimento delle proteine ubiquitinate e nella traslocazione del polipeptide disavvolto nella particella centrale dove viene degradato. La particella 19S deubiquitina le proteine appena vengono degradate nel proteasoma.

La proteolisi ubiquitina-dipendente è importante per la regolazione dei processi cellulari come l'eliminazione delle proteine difettose. Molte proteine, necessarie solo durante una fase del ciclo cellulare eucariotico, vengono rapidamente degradate dalla via ubiquitina-dipendente, dopo aver terminato la loro funzione. La distruzione delle cicline ubiquitina-dipendente è fondamentale per la regolazione del ciclo cellulare. I componenti E1, E2 ed E3 della via dell'ubiquitina sono in realtà due grandi famiglie proteiche. Differenti enzimi E1, E2 ed E3 hanno diverse specificità per le proteine bersaglio e quindi regolano i processi cellulari diversi. Alcuni di questi enzimi E1, E2 ed E3 sono specificamente localizzati in alcuni compartimenti cellulari, a indicare una funzione specializzata.