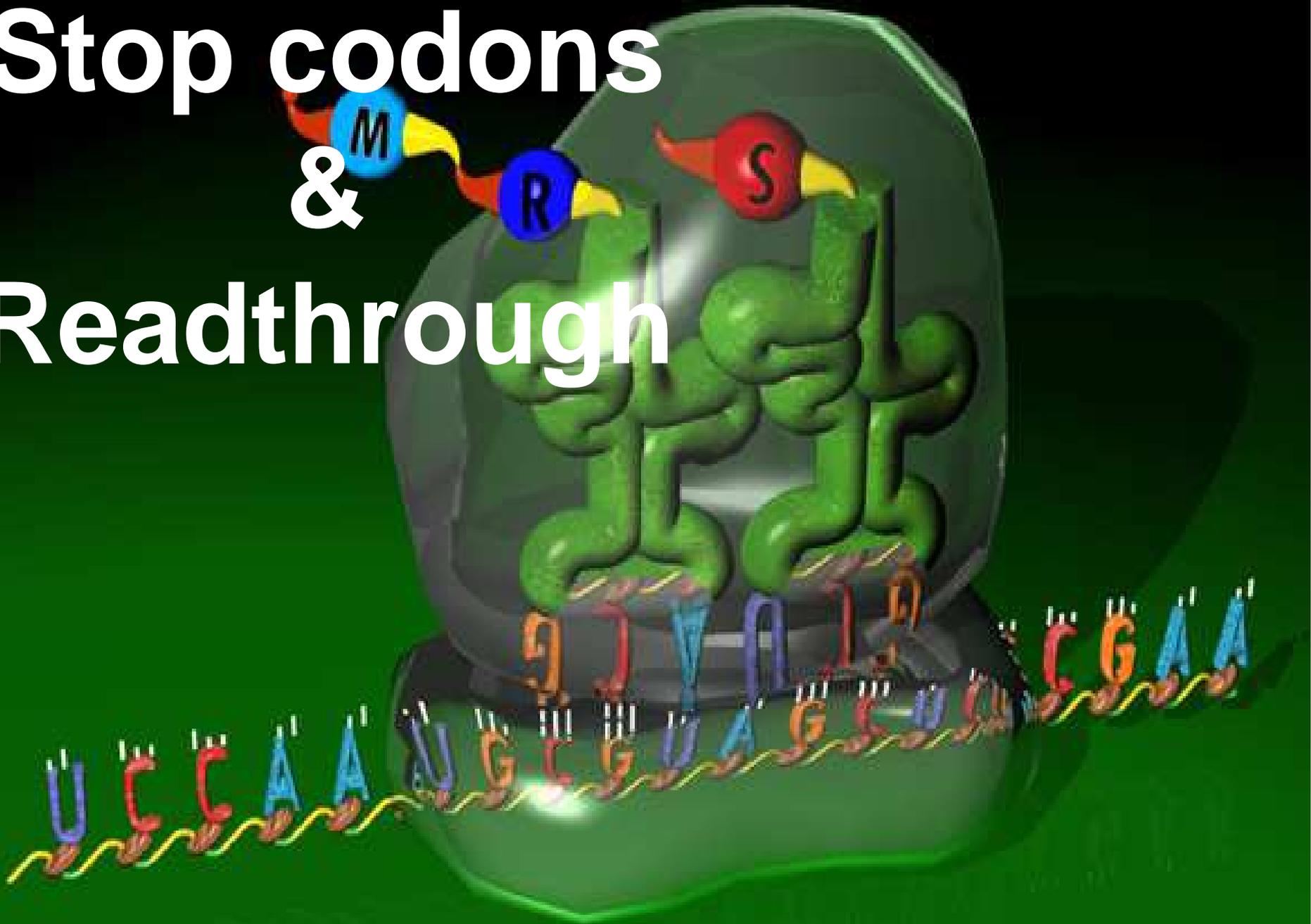


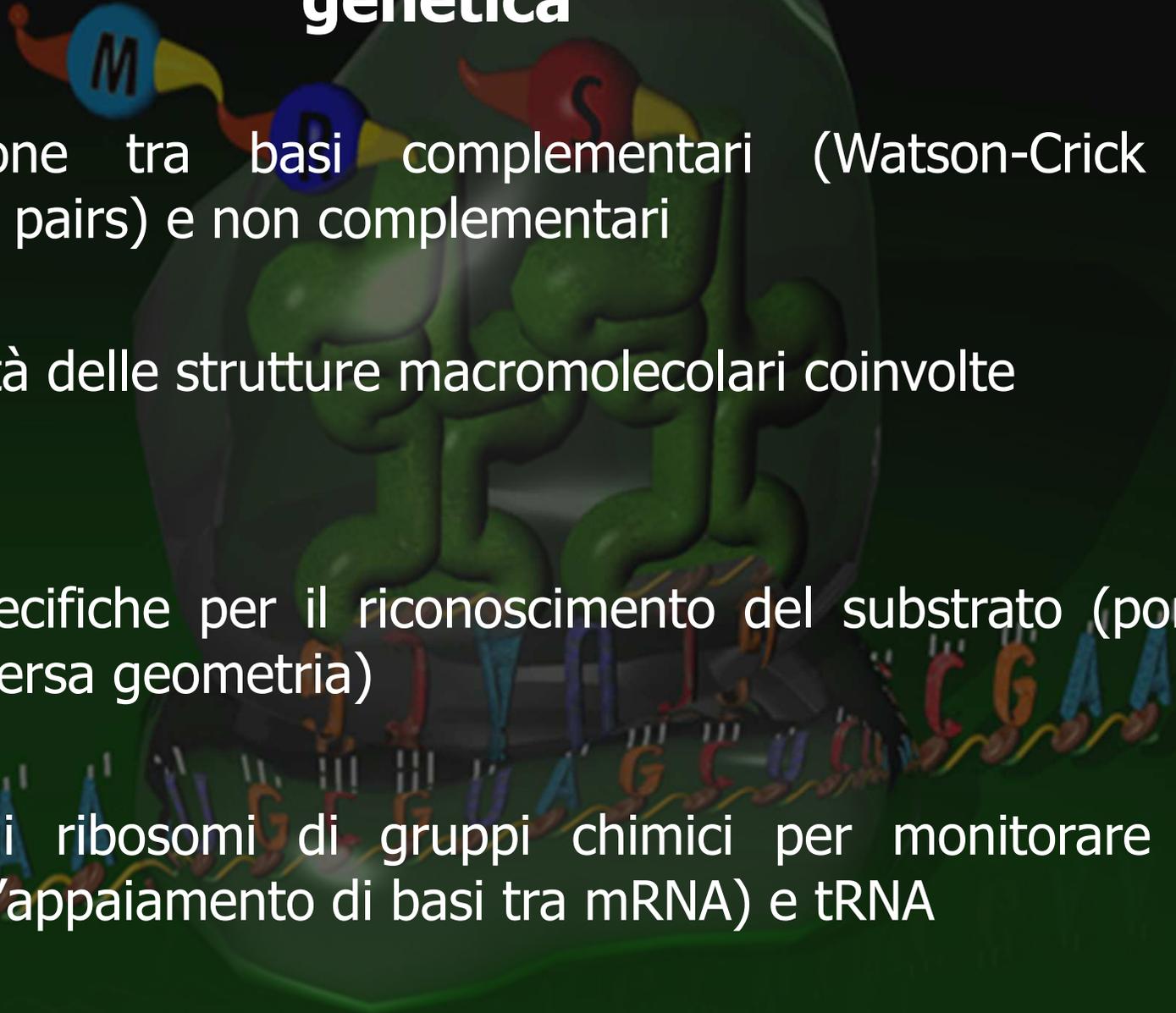
Stop codons & Readthrough



15 novembre 2013

Alessio Branchini

Fedeltà nel trasferimento dell'informazione genetica

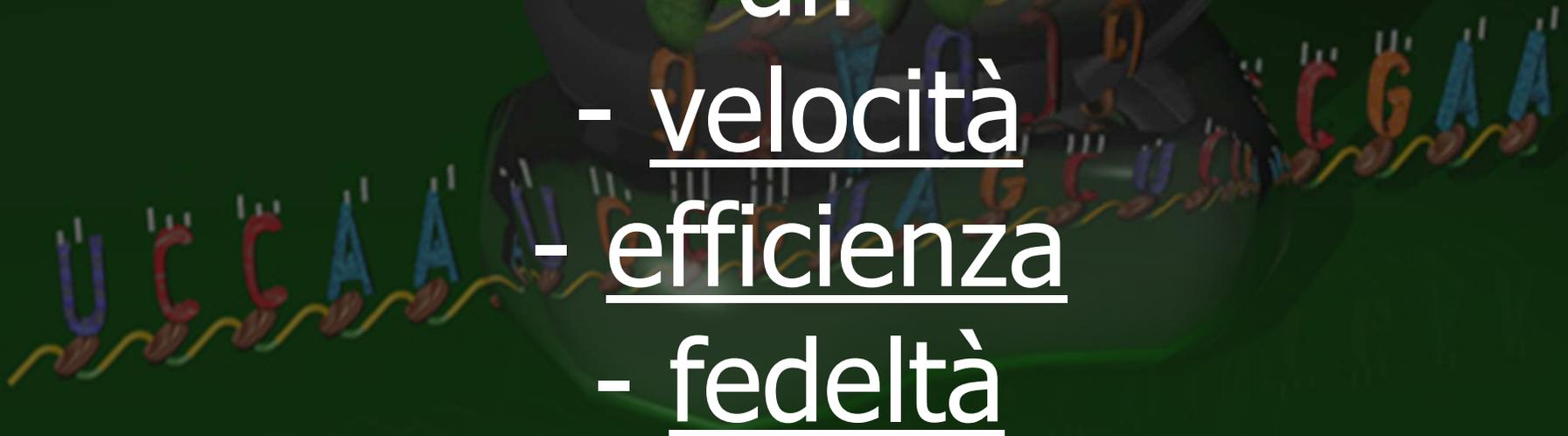


- Discriminazione tra basi complementari (Watson-Crick e "wobble" base pairs) e non complementari
- Alta selettività delle strutture macromolecolari coinvolte (ribosomi)
- Strategie specifiche per il riconoscimento del substrato (ponti idrogeno e diversa geometria)
- Presenza sui ribosomi di gruppi chimici per monitorare la geometria dell'appaiamento di basi tra mRNA) e tRNA

Traduzione: fase di inizio, allungamento e terminazione

Processo complesso che necessita contemporaneamente di:

- velocità
- efficienza
- fedeltà



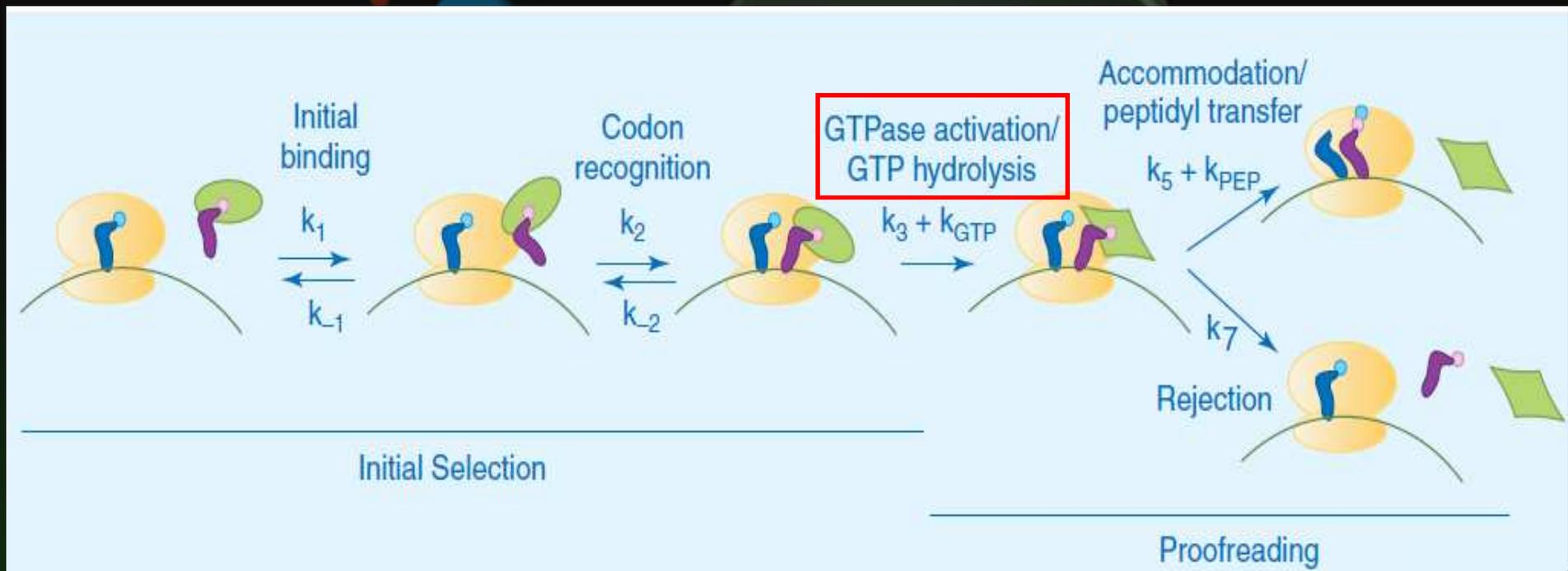
Cosa assicura fedeltà alla traduzione?

Nella traduzione ogni tRNA deve essere legato covalentemente ad uno specifico aminoacido in modo che vi sia corrispondenza tra codone (mRNA), anticodone (tRNA), e aminoacido

Strategie per assicurare equilibrio tra accuratezza e velocità (**1 errore ogni 10^3 - 10^4 aminoacidi**):

1. Editing (tRNA/aminoacido)
2. Kinetic proofreading and Induced fit (codone/anticodone)

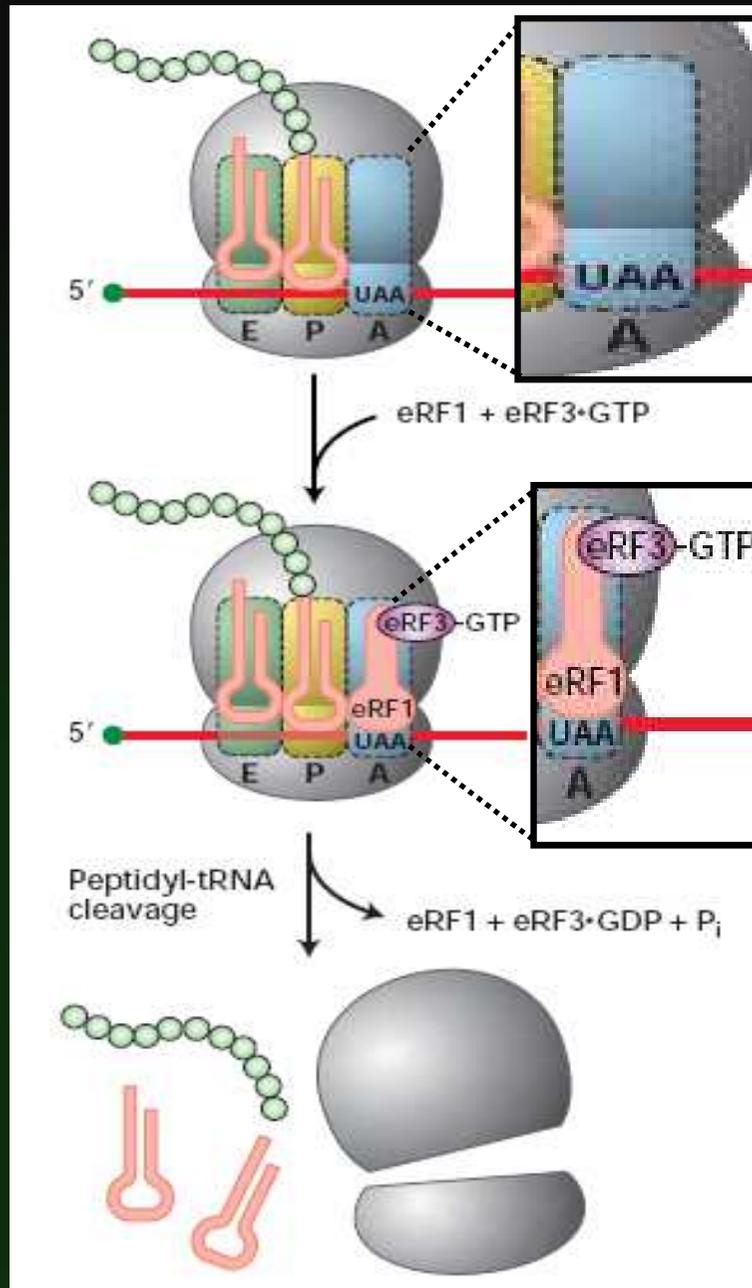
Kinetic proofreading



Induced fit

Il corretto aa-tRNA induce una modificazione conformazionale nel ribosoma e nel tRNA stesso (alta velocità di idrolisi del GTP)

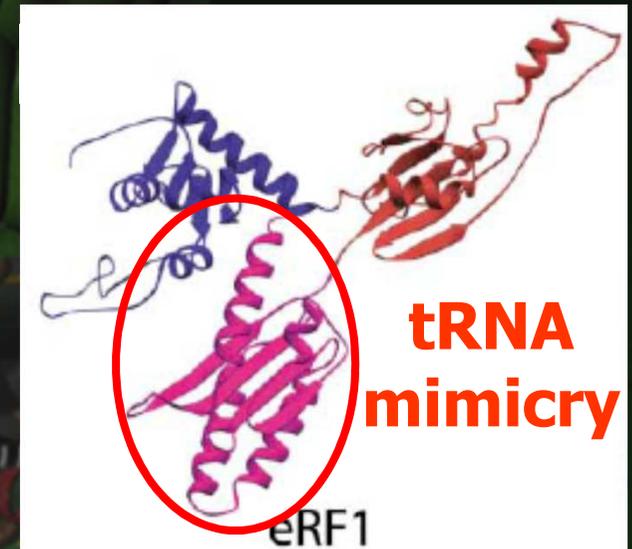
Terminazione della traduzione



Codone di stop in frame (UAG, UAA, UGA) nel sito A del ribosoma

Il fattore di rilascio eRF1 riconosce il codone di stop

“Mimicry” del tRNA e competizione



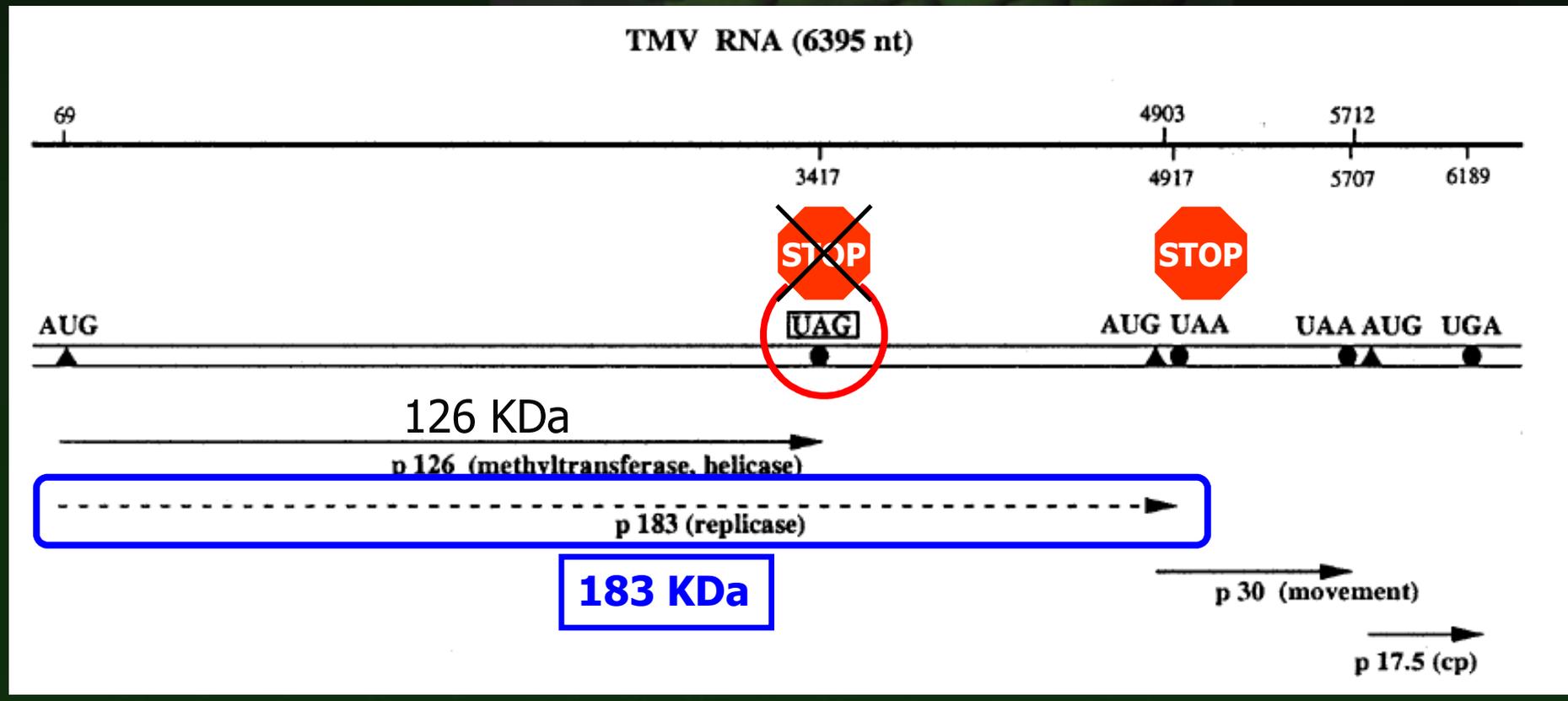
Idrolisi del legame tra la catena polipeptidica in crescita e il tRNA nel sito P

Non sempre il segnale di stop viene rispettato

READTHROUGH

Meccanismo di regolazione dell'espressione genica che consente la produzione di più polipeptidi a partire da un singolo gene

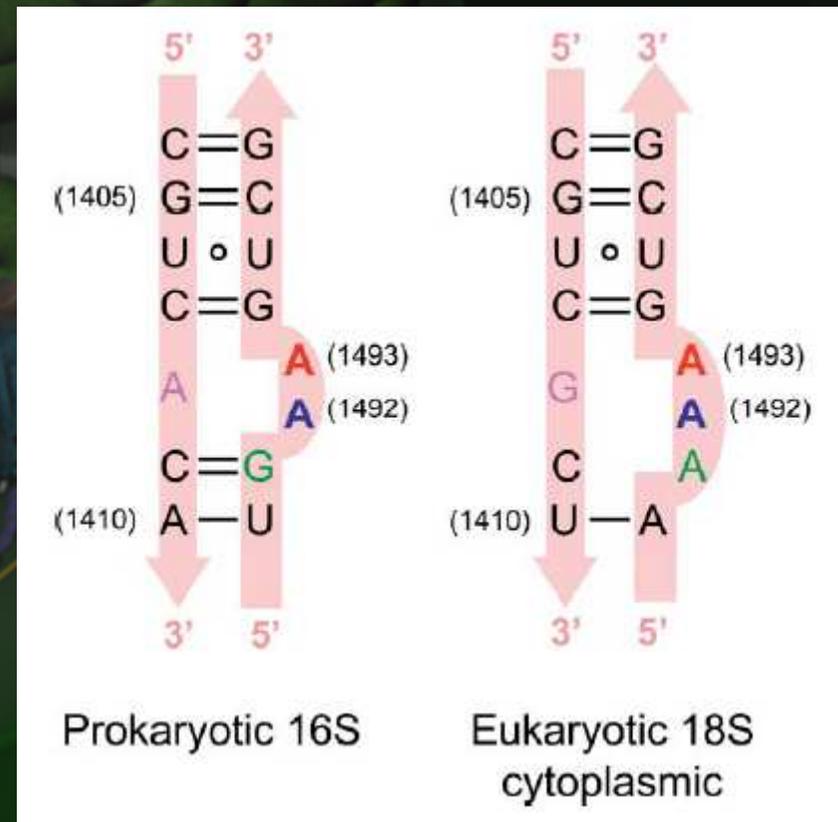
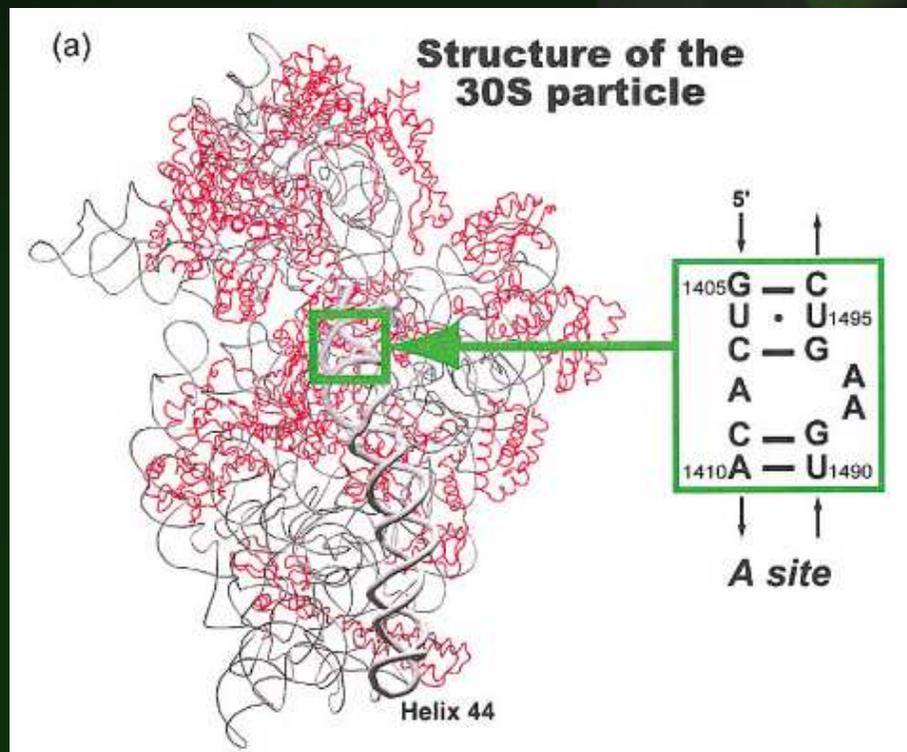
Virus (genoma piccolo) → Espansione dell'informazione genetica



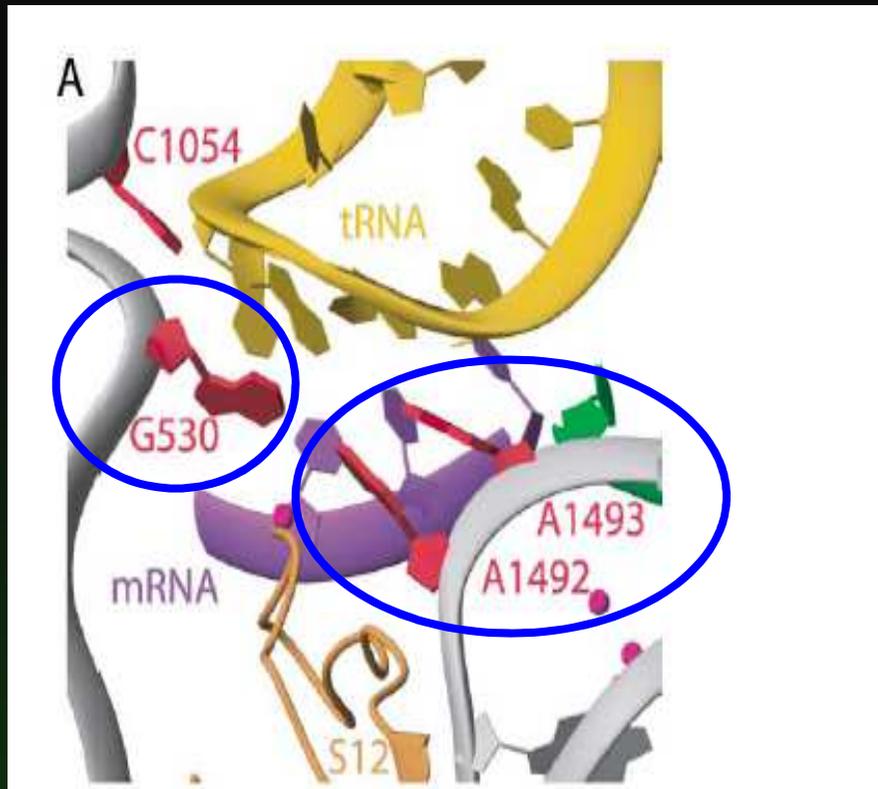
Il Decoding Site del ribosoma

Regione presente nella subunità minore del ribosoma all'interno del sito A

Coinvolto nel monitoraggio del corretto appaiamento tra codone e anticodone (A1492, A1493) mediante il riconoscimento della geometria del legame



Il Decoding Site del ribosoma



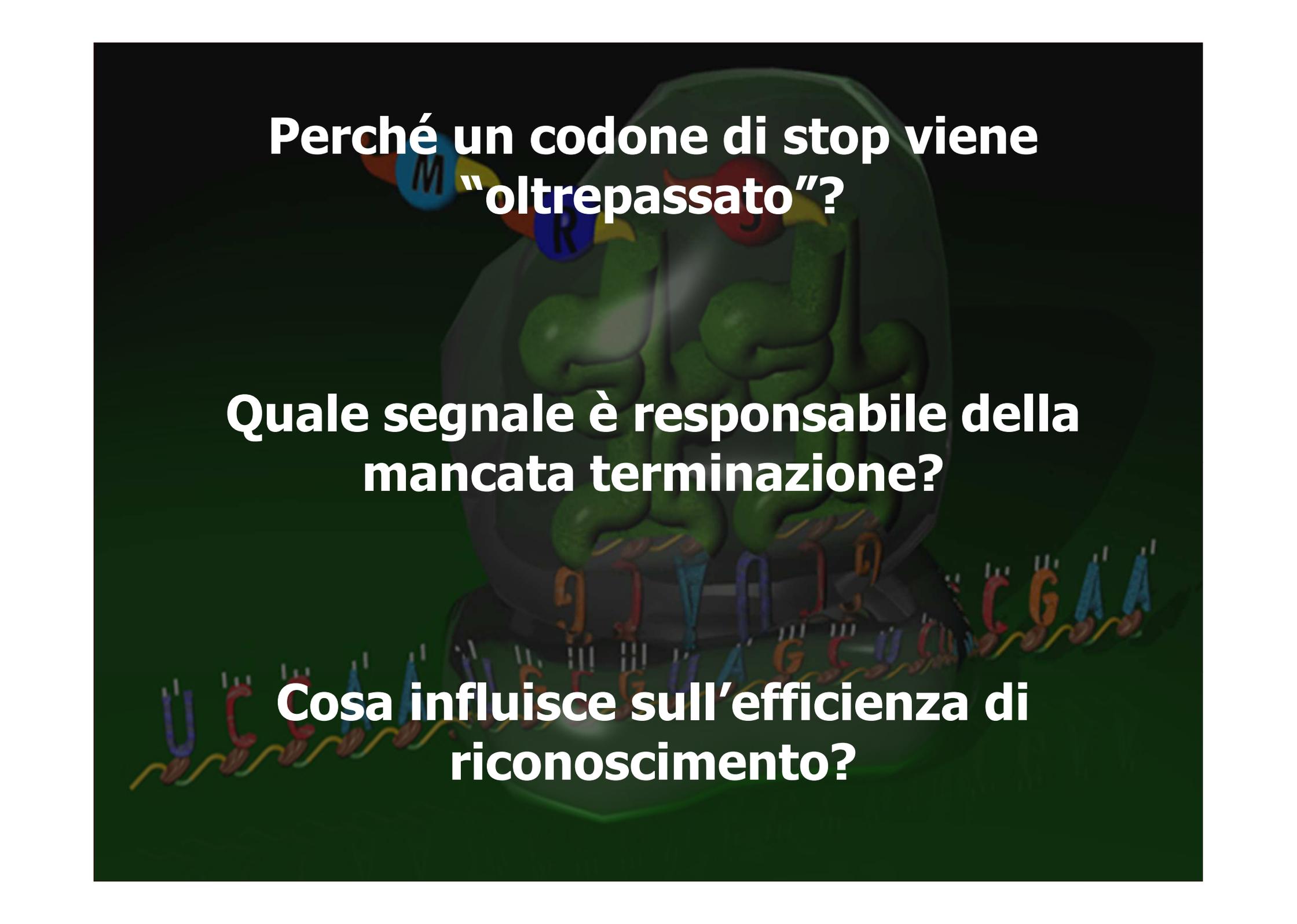
Appaiamento codone/anticodone:

1° posizione → monitorata da A1493

2° posizione → monitorata da A1492 e G530

3° posizione → controllo meno restrittivo (“wobble” position)

La presenza del corretto aminoacil-tRNA induce un cambiamento conformazionale di A1492 e A1493 e un riarrangiamento di G530, con conseguente accomodamento dell'aa-tRNA e successiva formazione del legame peptidico



**Perché un codone di stop viene
"oltrepassato"?**

**Quale segnale è responsabile della
mancata terminazione?**

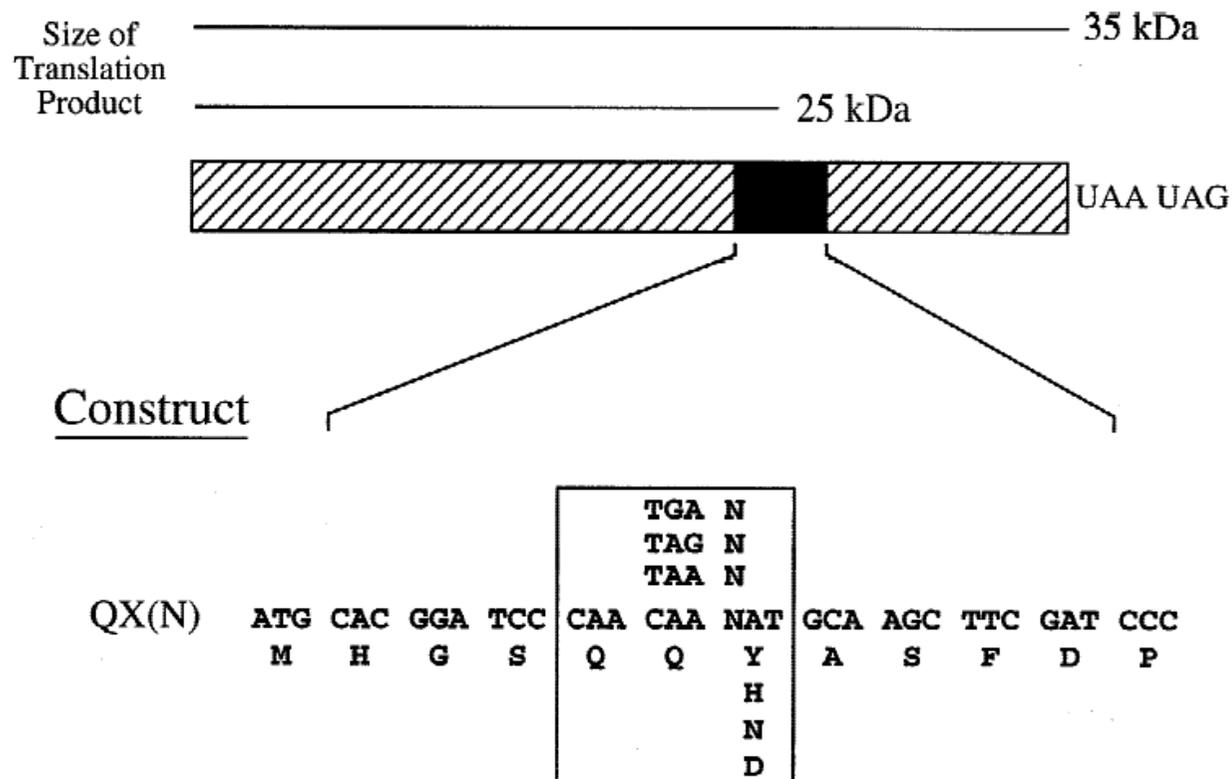
**Cosa influisce sull'efficienza di
riconoscimento?**

Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system

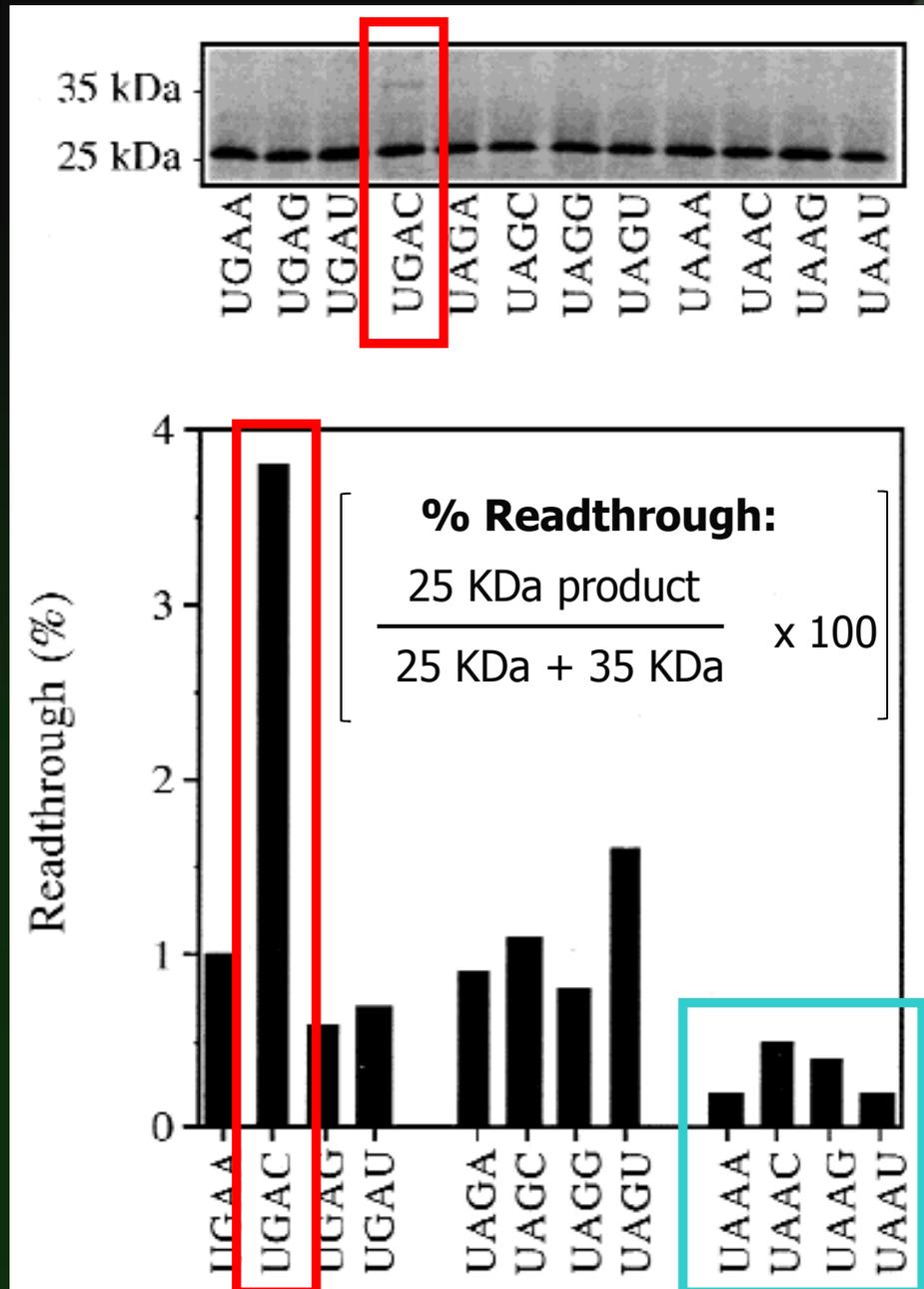
MARINA MANUVAKHOVA,^{1,3} KIM KEELING,² and DAVID M. BEDWELL^{1,2}

¹Department of Microbiology, The University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama 35294-2170, USA

²Department of Human Genetics, The University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama 35294-2170, USA



Il contesto di sequenza influenza il readthrough



Esperimenti in **lievito**:

la base successiva al codone di stop è un determinante per l'efficienza della terminazione

Readthrough basale:

UGAC 3-4%

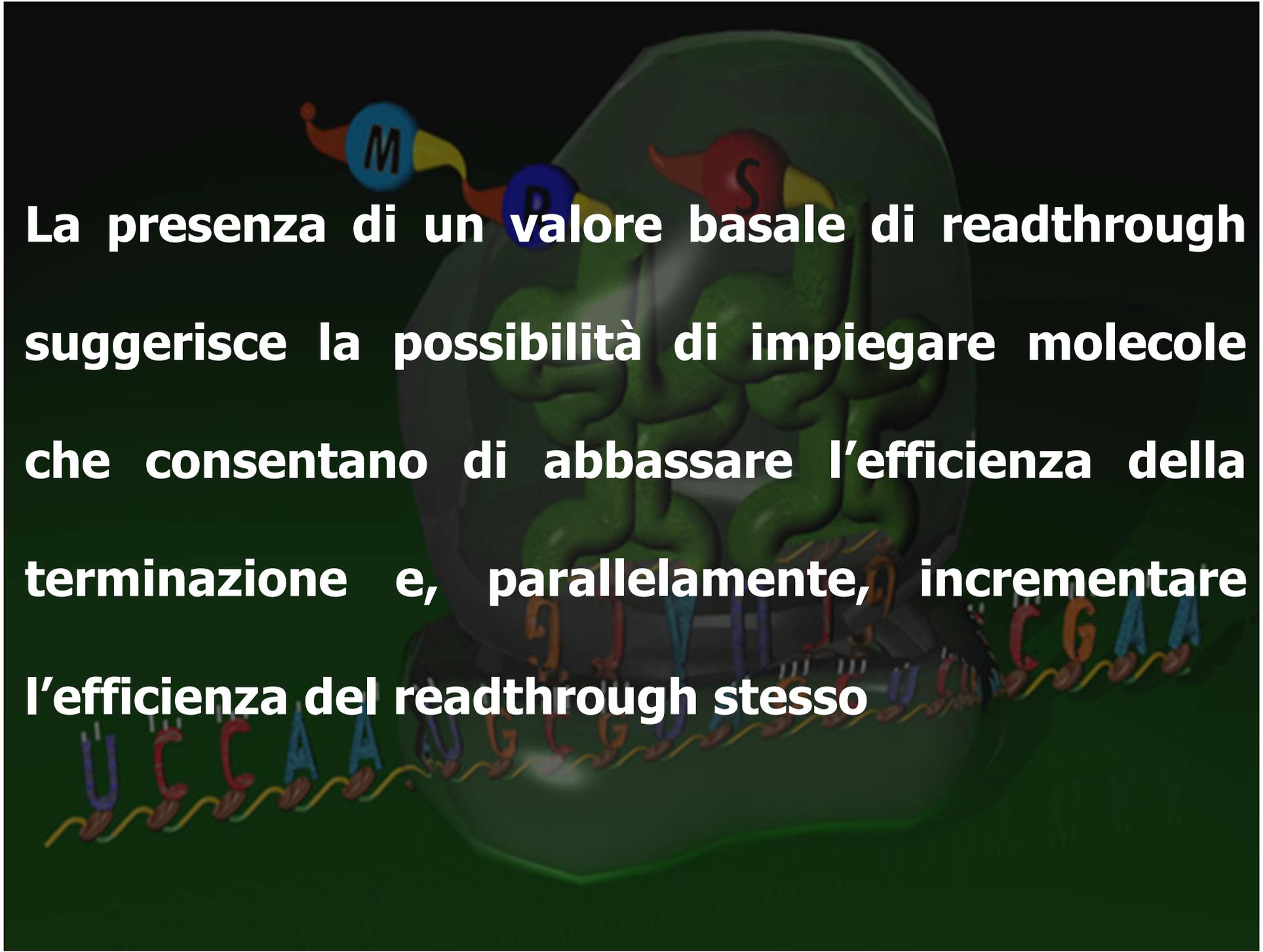
Efficienza minima di terminazione

UAA(N) ~ 0,5%

Efficienza massima di terminazione

Efficienza di terminazione

UAA > UAG ≥ UGA

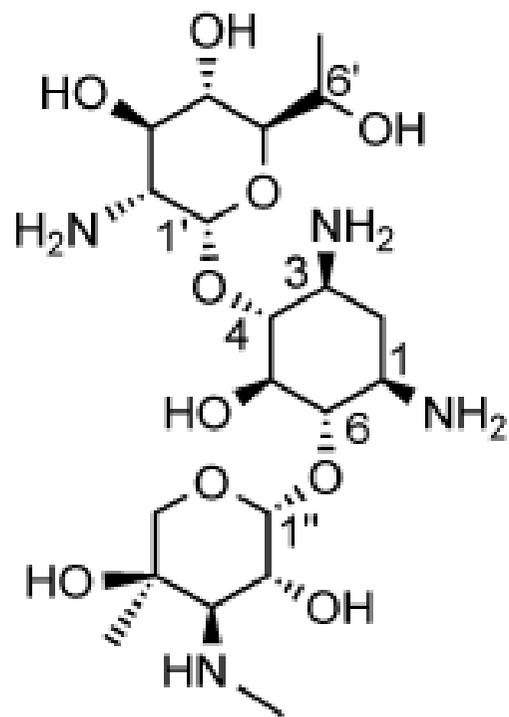
A 3D molecular model of a ribosome, shown in a dark green color, with a large, complex, green structure representing the ribosomal tunnel. A red and yellow structure, likely a release factor, is bound to the ribosome. A blue circle with the letter 'M' is attached to the red structure. A blue circle with the letter 'D' is attached to the yellow structure. A red circle with the letter 'S' is attached to the red structure. The ribosome is surrounded by a network of yellow and blue lines, representing the mRNA and other molecules. The background is dark green.

La presenza di un valore basale di readthrough suggerisce la possibilità di impiegare molecole che consentano di abbassare l'efficienza della terminazione e, parallelamente, incrementare l'efficienza del readthrough stesso

Aminoglicosidi

Gruppo di molecole appartenente alla classe degli antibiotici

Legano il sito A della subunità minore del ribosoma a livello del decoding site (A1492, A1493)



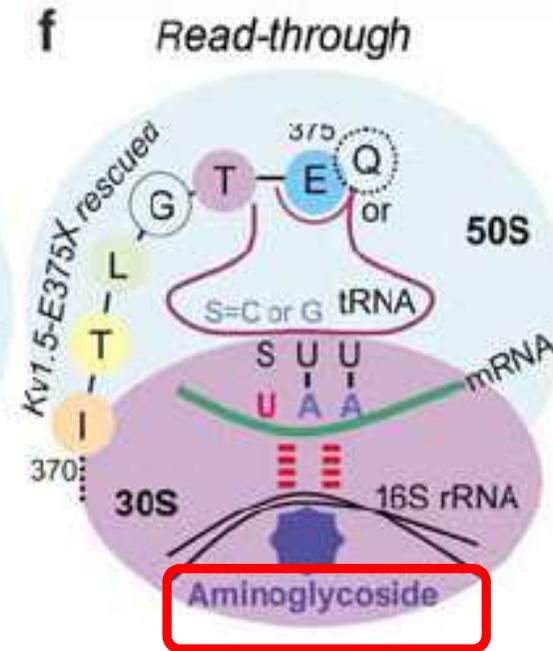
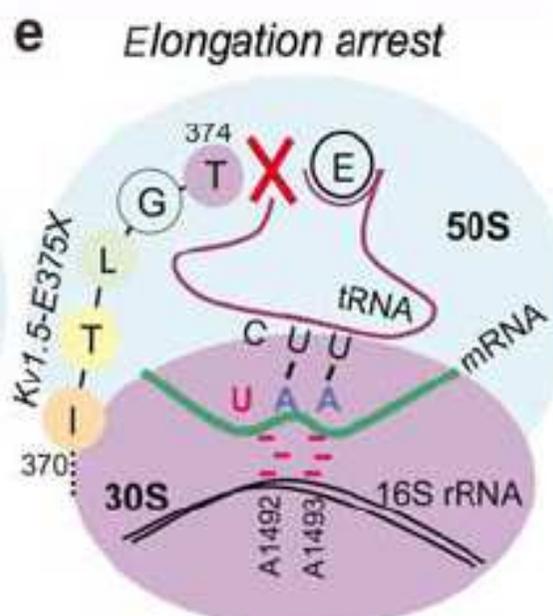
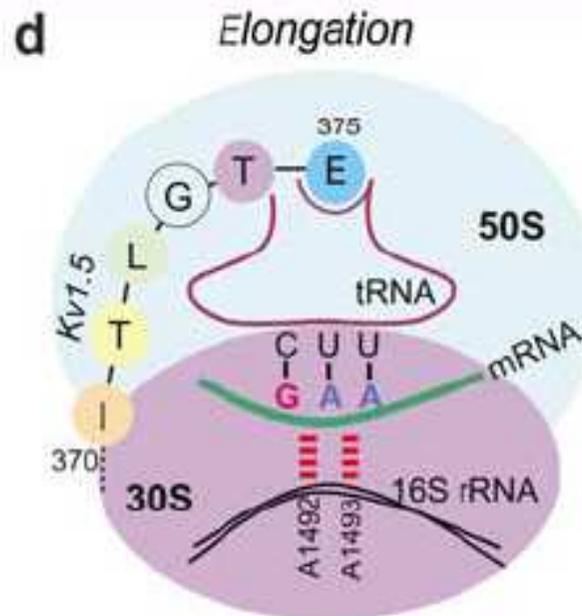
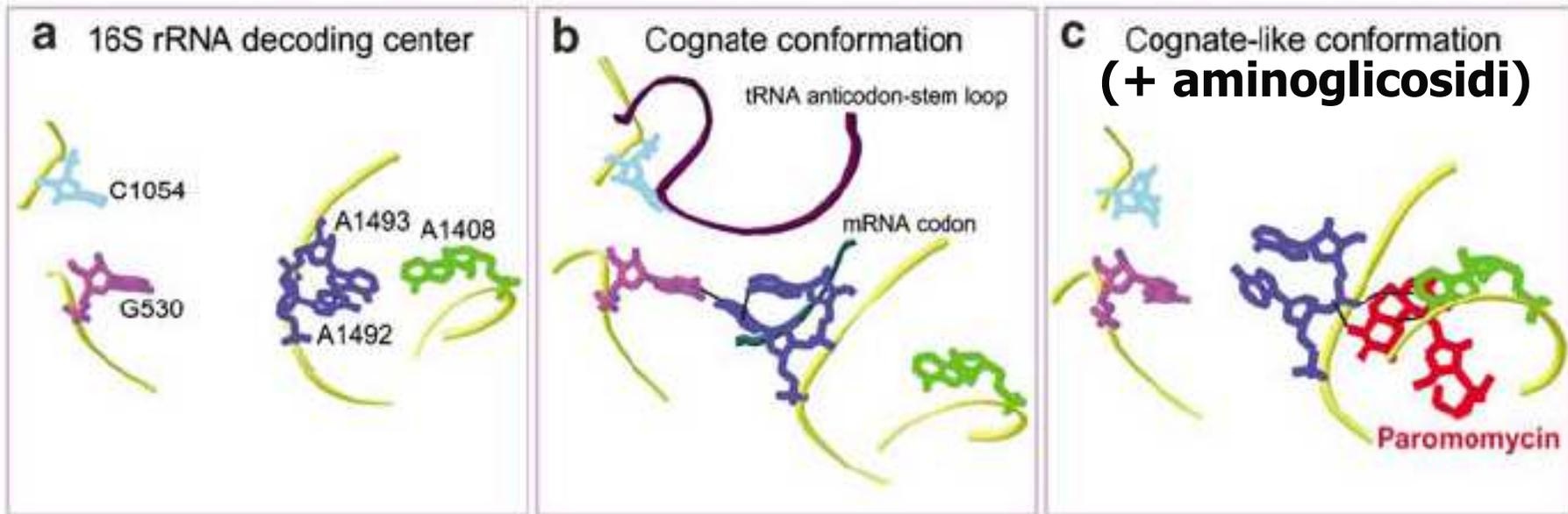
Geneticin (G418)

Meccanismo d'azione

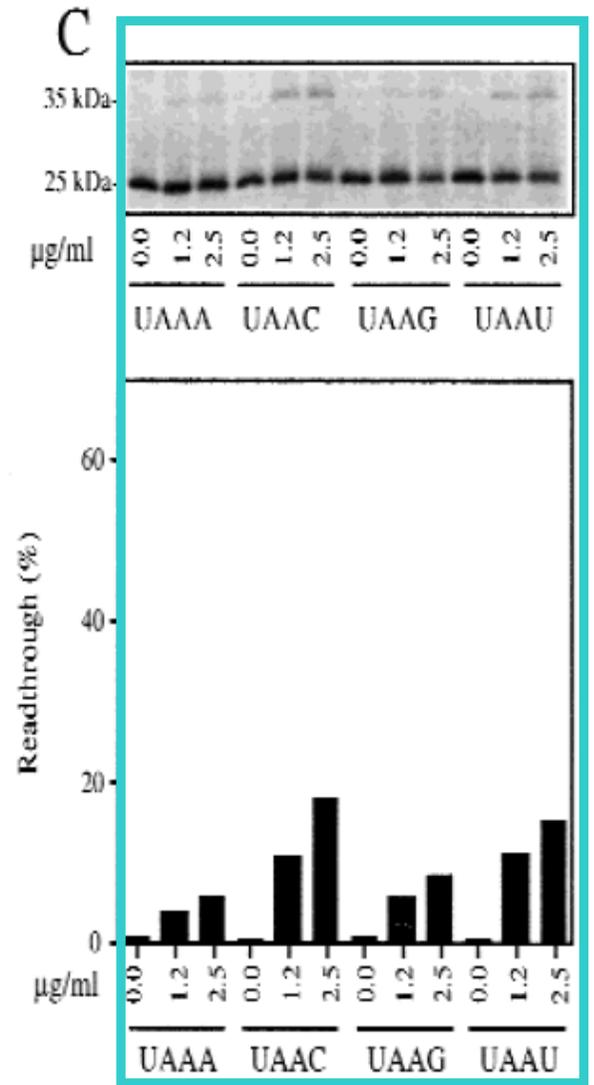
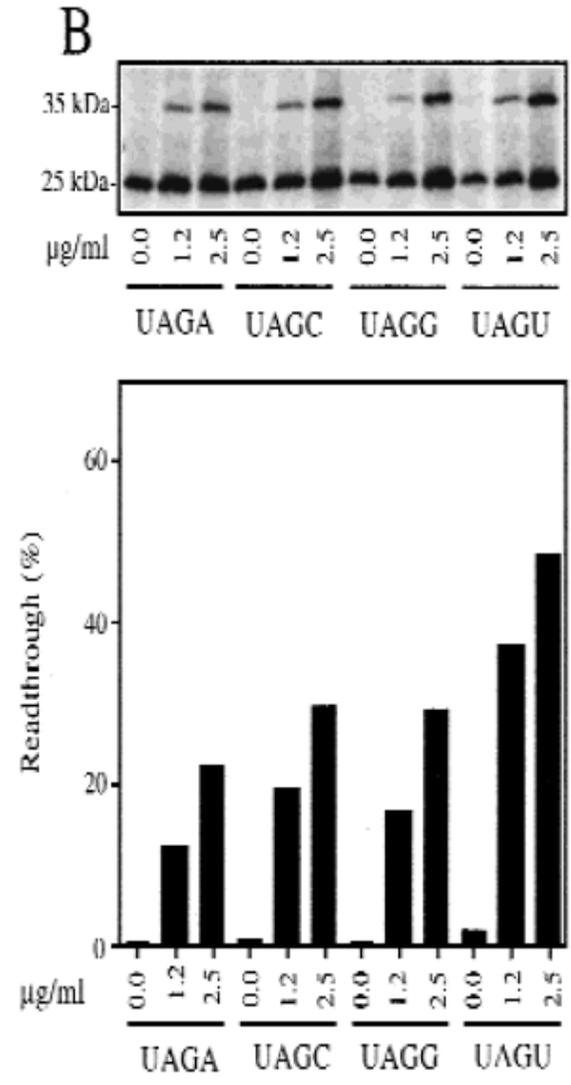
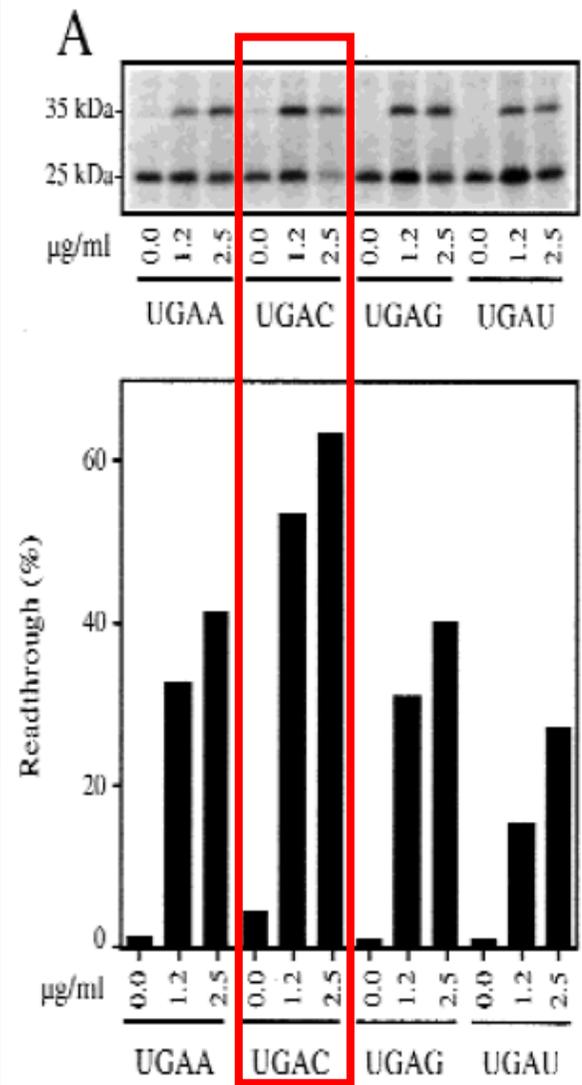
Stabilizzano il sito A nella conformazione normalmente raggiunta quando viene legato un aa-tRNA corretto (perdita di capacità di proofreading)

Alterano la capacità di discriminazione del ribosoma tra aa-tRNA corretto (cognate) e aa-tRNA avente codone simile (near-cognate) incrementando la stabilità di legame con quest'ultimo

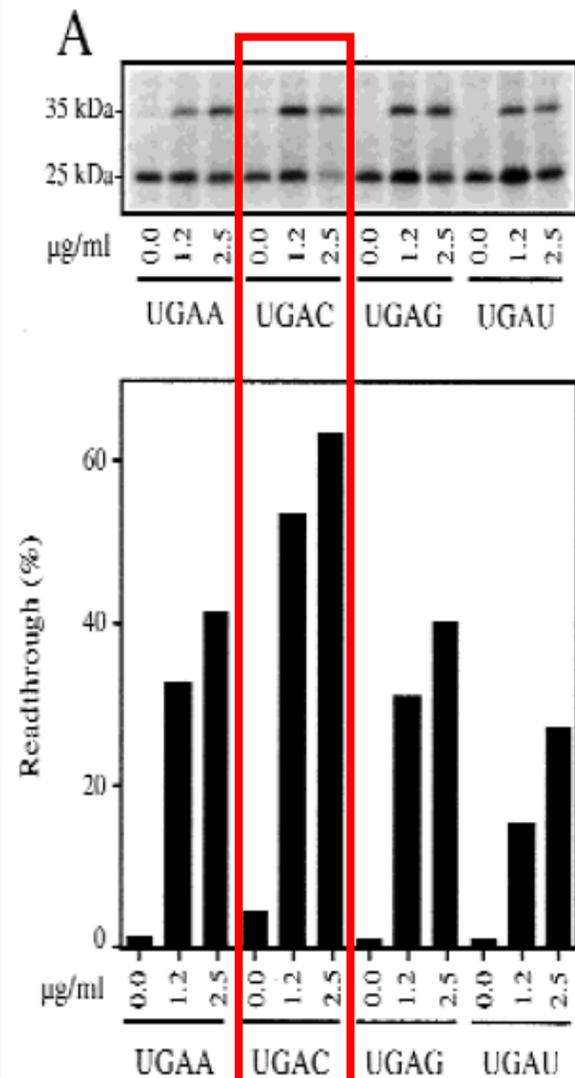
Legame degli aminoglicosidi al decoding site



La natura chimica del **tetranucleotide** di stop ha un ruolo fondamentale **nell'induzione di readthrough** a seguito di trattamento con aminoglicosidi (es. G418)



A seguito del trattamento con aminoglicosidi (G418) l'efficienza relativa dei tetranucleotidi rimane la stessa → il più "sensibile" al trattamento ha livelli basali più alti



Readthrough basale:

UGAC 3-4%

UAA(N) ~ 0,5%

+ G418

UGAC 63%

UAA(N) 6-18%

