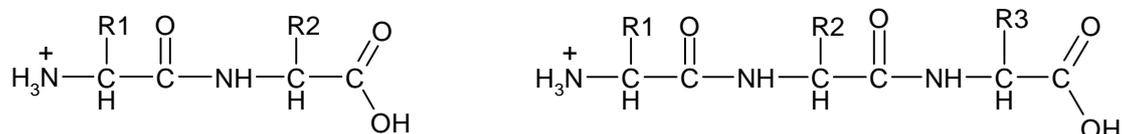


Problema 23 **Intriguing translation**

1) Determina il numero di amminoacidi presenti in un oligopeptide lineare X che contiene due amminoacidi diversi A e B e che possiede in tutto 25 atomi quando si trova a pH 4,7.

Le catene principali di un dipeptide e di un tripeptide a pH 4,7 sono le seguenti:



La catena del dipeptide è di 16 atomi, quindi alle due catene R restano $25 - 16 = 9$ atomi.

La catena del tripeptide è di 22 atomi, quindi alle tre catene R restano $25 - 22 = 3$ atomi, un valore compatibile solo con tre glicine. Sappiamo, però, che nella molecola ci sono due amminoacidi diversi A e B e quindi l'ipotesi Gly-Gly-Gly è da scartare.

Il peptide X è quindi un dipeptide con catene laterali che hanno in tutto 9 atomi.

2) Quanti peptidi diversi sono compatibili con i dati forniti fin qui?

Dato che le due catene laterali degli amminoacidi A e B devono contenere 9 atomi, considero le catene dagli amminoacidi con meno di 9 atomi.

1 atomo	glicina
4 atomi	alanina
5 atomi	serina, cisteina, selenocisteina (Sec)
6 atomi	acido glutammico
8 atomi	glutamina, treonina, prolina

Le combinazioni per ottenere 9 atomi sono quindi 8+1, 5+4, 4+5, 1+8. Glu (6 atomi) va scartato.

8+1	Gln-Gly	Thr-Gly	Pro-Gly
5+4	Ser-Ala	Cys-Ala	Sec-Ala
4+5	Ala-Ser	Ala-Cys	Ala-Sec
1+8	Gly-Gln	Gly-Thr	Gly-Pro

In totale sono 12 peptidi diversi

3) Disegna la struttura del peptide X completa di centri chirali, sapendo che la combustione completa di 1 g di X con assorbimento dei fumi in $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ha prodotto 3,273 g di precipitato. Il trattamento di questo con HCl 10% ha prodotto un volume di gas a STP di 0,496 L.

La CO_2 liberata dalla reazione con HCl ha un volume di 0,496 L a STP ($T = 273 \text{ K}$, $P = 1 \text{ bar}$).

Dalla legge dei gas se ne possono calcolare le moli:

$$n = \frac{PV}{RT} = \frac{1}{1,013} \cdot \frac{0,496}{0,0821 \cdot 273} = 2,185 \cdot 10^{-2} \text{ mol di CO}_2$$

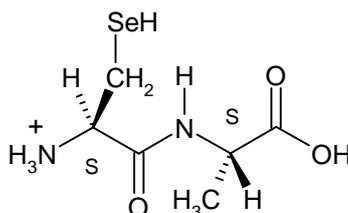
Se i 3,273 g di precipitato fossero stati composti solo di CaCO_3 , la combustione avrebbe prodotto $3,27 \cdot 10^{-2}$ moli di CO_2 , un valore troppo alto rispetto alle $2,185 \cdot 10^{-2}$ moli sperimentali.

Si deduce che la combustione ha prodotto oltre a CO_2 anche un altro gas che precipita come sale di calcio, ma che non si libera in HCl. L'unica spiegazione è che il dipeptide contenga cisteina o selenocisteina che, per combustione, oltre a CO_2 , liberano anche SO_3 e SeO_3 rispettivamente, che precipitano come CaSO_4 e CaSeO_4 , che sono stabili in HCl.

Ci sono due possibili dipeptidi, quindi: Cys-Ala e Sec-Ala

Il dipeptide Cys-Ala $^+\text{NH}_3\text{-Cys-Ala-COOH}$ ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$) ha una massa molare di 193 g mol^{-1} .

Quindi in 1 g ci sarebbero $5,18 \cdot 10^{-3}$ mol. La combustione totale del dipeptide $C_6H_{13}N_2O_3S$ produrrebbe 6 CO_2 e 1 SO_3 quindi precipiterebbero 6 $CaCO_3$ e 1 $CaSO_4$ quindi 3,11 g di $CaCO_3$ e 0,704 g di $CaSO_4$ cioè 3,81 g totali. Troppi, perchè sappiamo che precipitano 3,273 g. Se consideriamo selenocisteina, invece, il dipeptide Sec-Ala⁺ NH_3 -Sec-Ala-COOH ($C_6H_{13}N_2O_3Se$) ha una massa molare di 240 g mol⁻¹. Quindi in 1 g ci sono $4,17 \cdot 10^{-3}$ mol. La combustione totale del peptide $C_6H_{13}N_2O_3Se$ produce 6 CO_2 e 1 SeO_3 quindi precipitano 6 $CaCO_3$ e 1 $CaSeO_4$ cioè 2,502 g di $CaCO_3$ e 0,763g di $CaSeO_4$ quindi 3,27 g totali. Questo conferma che il dipeptide è formato di Sec e Ala con Sec in posizione N-terminale come è suggerito al punto 4 dove si dice che A non è normalmente presente nella cellula mentre B lo è. La struttura 3d con le indicazioni stereochimiche S sui carboni alfa è quindi:



4) Spiega perchè A, a differenza di B, non si trova normalmente nelle cellule come amminoacido libero.

L'amminoacido A è selenocisteina. Non si trova nelle cellule come amminoacido libero perchè è pericolosamente simile alla normale cisteina. Selenio e zolfo, infatti, appartengono allo stesso gruppo nella tavola periodica degli elementi e sono molto simili chimicamente. Gli enzimi del nostro corpo avrebbero grosse difficoltà nel distinguere cisteina da selenocisteina. Per questo la selenocisteina viene introdotta nelle proteine con un meccanismo diverso. Una serina viene legata al tRNA della selenocisteina, poi l'ossigeno della serina viene sostituito dal selenio ad opera dell'enzima selenocisteina sintasi. Infine il tRNA con la selenocisteina legata entra in azione solo quando il codone della selenocisteina è seguito da una struttura particolare a forma di forcina illustrata nel prossimo punto 5.

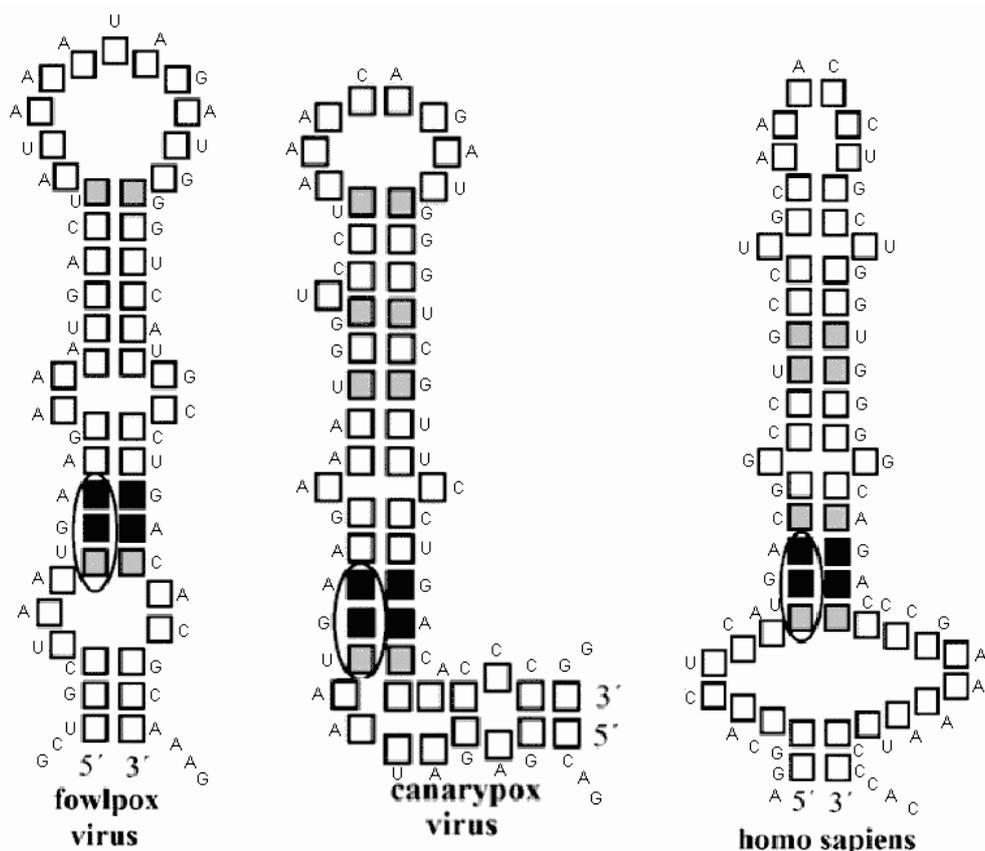
5) Trova la corrispondenza fra i tre mRNA a forma di forcina, rappresentati qui sotto, e le tre sequenze di mRNA date qui di seguito.

N°	Nucleotide sequence (5' → 3')
1	...GCUGCUAAUGAAGAAAUGACUAUAAAUAUGAUGGGUCAUGCCUGACACGCAAAG...
2	...AGGCACUCAUGACGGCCUGCCUGCAAACCCUGCUGGUGGGGCAGACCCGAAAAUCCCAC...
3	...GACGAGAUAAUGAAGAAAUGGUCCUAAACAGAUGGGUCGUUCCUGACACCCCGG...

Associa ad ogni quadratino della figura il rispettivo nucleotide (A, U, G, C). Sapendo che le coppie di nucleotidi grigie sono accoppiate in modo anomalo A-C, G-U, oppure sono coppie pirimidina-pirimidina, mentre quelle nere sono coppie purina-purina.

Qui bisogna provare gli accoppiamenti dei nucleotidi su un lato della forcina con quelli del lato opposto fino a trovare le corrispondenze chieste. Un buon punto di partenza è cercare le corrispondenze nei nucleotidi indicati da caselle nere che indicano accoppiamenti anomali purina-purina cioè A-G e G-A. In questo modo si identifica la corrispondenza tra la tripletta UGA sul lato 5' con la tripletta GAC sul lato 3'. Cioè 5' ---UGA-----]
3' ---CAG-----]

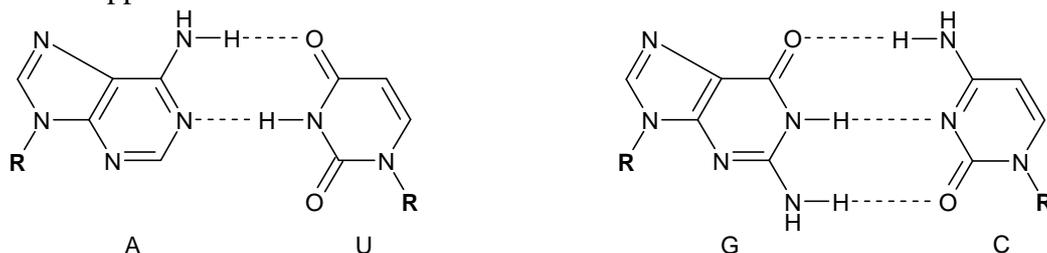
Disegnando accanto ad ogni casella il simbolo del nucleotide si ottiene lo schema mostrato di seguito:



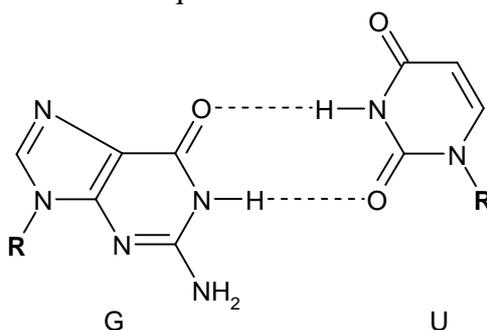
La prima immagine, di fowlpox virus, si riferisce alla sequenza 1, la seconda immagine, di canarypox virus, si riferisce alla sequenza 3, la terza immagine, di homo sapiens, si riferisce alla sequenza 2.

6) Disegna la strana coppia di basi G-U che si osserva più volte nella figura e mostra i legami idrogeno.

Ricordiamo le coppie normali A-U e G-C:



Si osserva che formano legami idrogeno grazie alla loro struttura complementare. Questa è chetonica su una delle due molecole ed enolica nell'altra. La struttura dell'uracile U ha un secondo carbonile in basso e questo suggerisce che si possa accoppiare anche con guanina G a patto però di slittare un po' verso l'alto come è illustrato qui sotto.



Questo slittamento produce una deformazione della normale doppia elica del RNA e infatti la strana coppia anomala G-U si trova a ridosso dei punti nei quali la doppia elica si discosta e si forma un'ansa come si osserva in alto in fowlpox e canarypox. In homo sapiens si notano al centro due coppie consecutive G-U e U-G che deformano prima in un senso e poi nel senso opposto la struttura, ma creano comunque una zona in tensione che probabilmente serve a mantenere rigida la forcina.

7) Qual è, nei virus (ma non nell'uomo), il ruolo del codone evidenziato? Si sa che il successivo amminoacido (nei virus) è codificato dal codone che segue. Scegli una risposta dalle seguenti:

Nº	Answer
1	It interacts with transport RNA of amino acid A
2	It determines termination of biosynthesis of the viral polypeptides on ribosome
3	It forms a "foot" of the lower loop thus playing a purely structural role
4	It is unable to interact with aminoacyl-tRNA. Thus the ribosome ignores it continuing addition of amino acids from the next codon
5	It is an ordinary codon without any special features

Le risposte 2 e 5 sono errate perchè UGA è uno dei normali codoni di stop, ma la sintesi non viene fermata e invece si aggiunge selenocisteina.

La risposta 3 è errata perchè allora avrebbe la stessa funzione strutturale anche in homo sapiens.

La risposta 4 è errata perchè, quando UGA non interagisce col tRNA ha la funzione di stop, mentre qui è la chiave per introdurre selenocisteina.

Resta solo la risposta 1 che dice che la tripletta UGA interagisce col tRNA della selenocisteina.

Solo questa risposta giustifica l'introduzione eccezionale della selenocisteina quando la tripletta UGA si trova coinvolta in una struttura del mRNA a forcina. Nei virus la sintesi poi continua con la successiva tripletta, mentre in homo sapiens il meccanismo di introduzione di selenocisteina deve essere un po' diverso.

8) Per ogni sequenza di mRNA virale, proporre una mutazione che non comprometta nè la traduzione, nè la funzionalità dell'enzima da sintetizzare: glutatione perossidasi.

Bisogna individuare una mutazione di un singolo nucleotide che codifichi lo stesso amminoacido e che non comprometta la stabilità della forcina.

Sul mRNA di fowlpox virus il primo nucleotide che può essere sostituito, lasciando intatto sia l'aa sia la struttura a forcina, è nel codone della lisina AAA che può mutare in AAG. La nuova base G si trova nell'ansa in alto e non ne comprometterebbe la struttura. Quindi:

UGA-AGA-AAU-GAC-UAU-AAA-UAG può essere mutato in

UGA-AGA-AAU-GAC-UAU-AAG-UAG

Sec -Arg -Asn -Asp-Tyr -Lys -stop

Sul mRNA di canarypox virus il primo nucleotide che può essere sostituito è nel codone della glicina GGU che può mutare in GGG. La nuova base G non avrebbe tendenza a legarsi con le basi di fronte U e G proprio come la base originale U. La struttura della forcina resta intatta. Quindi:

UGA-AGA-AAU-GGU-CCU-AAA-CAG può essere mutato in

UGA-AGA-AAU-GGG-CCU-AAA-CAG

Sec -Arg -Asn -Gly -Pro -Lys -Gln

In questa sequenza ci può essere anche la mutazione (identica a quella vista sopra) di AAA in AAG all'interno dell'ansa in alto a carico del codone della lisina.

Soluzione proposta da
prof. Mauro Tonellato
ITI Marconi - Padova