

Il materiale genetico

Il DNA

Funzioni del materiale genetico

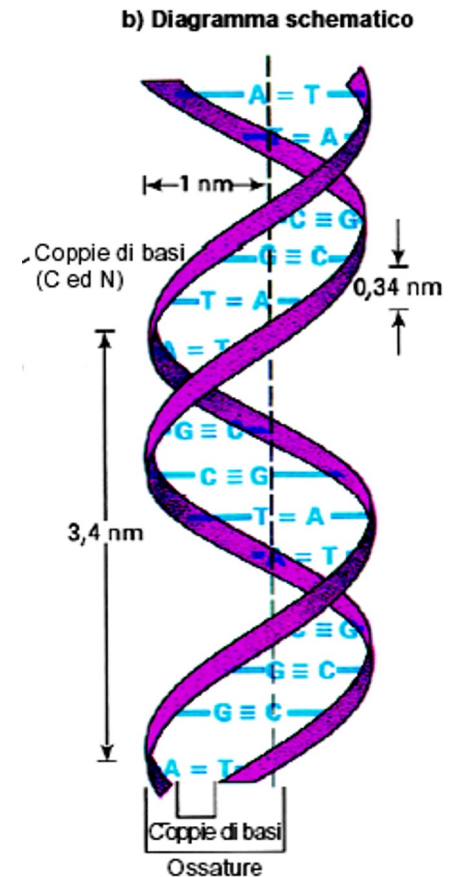
- Fornire l'informazione per la manifestazione dei caratteri fisici di un organismo.
- Assicurare che, mediante la replicazione e la divisione, il patrimonio genetico dell'organismo venga trasmesso in modo accurato da una generazione all'altra

Materiali genetico = acidi nucleici

Caratteristiche del materiale genetico:

- Molecola stabile e capace di contenere informazione
- Si replica in modo accurato
- È capace di variare - variazione genetica (mutazione, ricombinazione)

Nella maggior parte degli organismi il materiale genetico è costituito da DNA a doppia elica. Alcuni virus hanno come materiale genetico DNA a singola elica e altri RNA a doppia o singola elica.



• Esperimento di Griffith con *Pneumococcus* (1928) Avery e colleghi (1944)

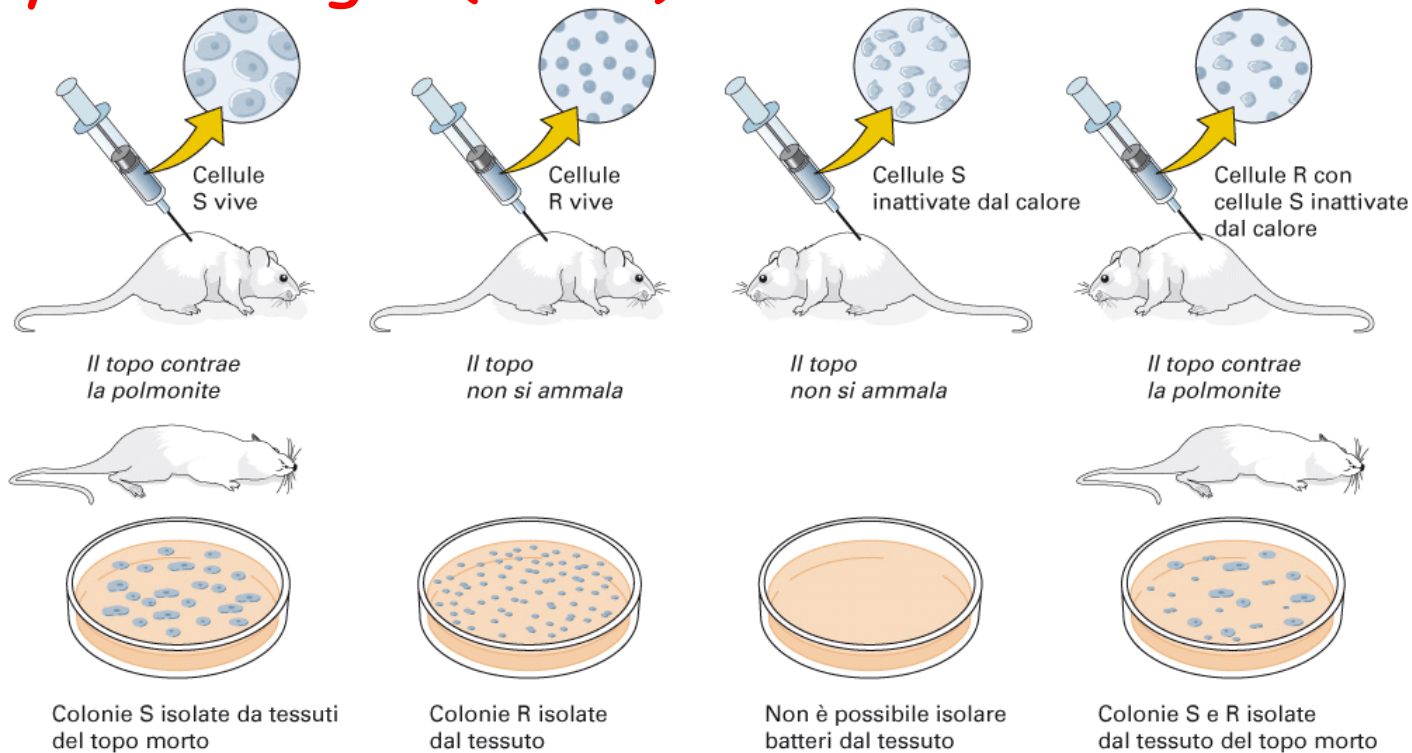
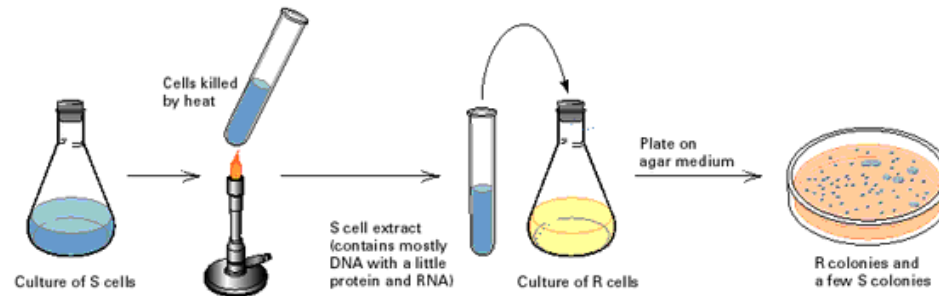


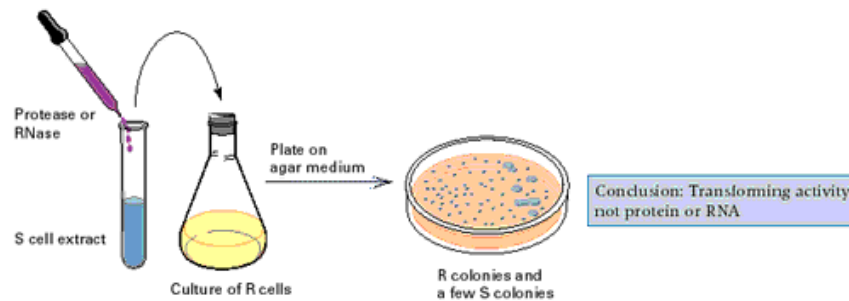
FIGURA 1.2 Esperimento di Griffith che dimostra la trasformazione batterica. Un topo resta sano se gli si iniettano cellule di *S. pneumoniae* del ceppo non virulento R oppure frammenti di cellule del ceppo virulento S inattivate dal calore, ma la contemporanea presenza di cellule R e di cellule S, anche se inattivate dal calore, ne causa la morte per polmonite in seguito alla trasformazione del ceppo non virulento in virulento.

Esperimento di Griffith con *Pneumococcus* (1928) Avery e colleghi (1944)

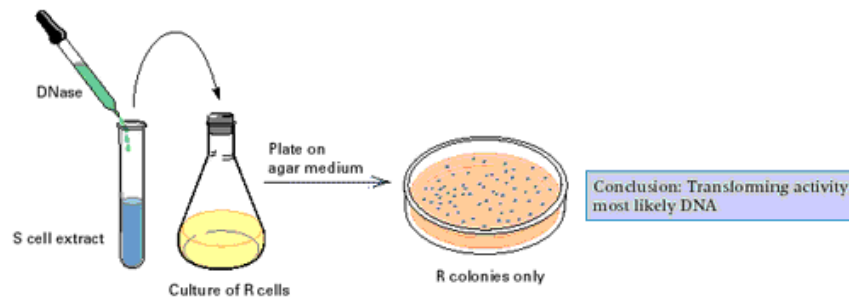
(A) The transforming activity in S cells is not destroyed by heat



(B) The transforming activity is not destroyed by either protease or RNase



(C) The transforming activity is destroyed by DNase



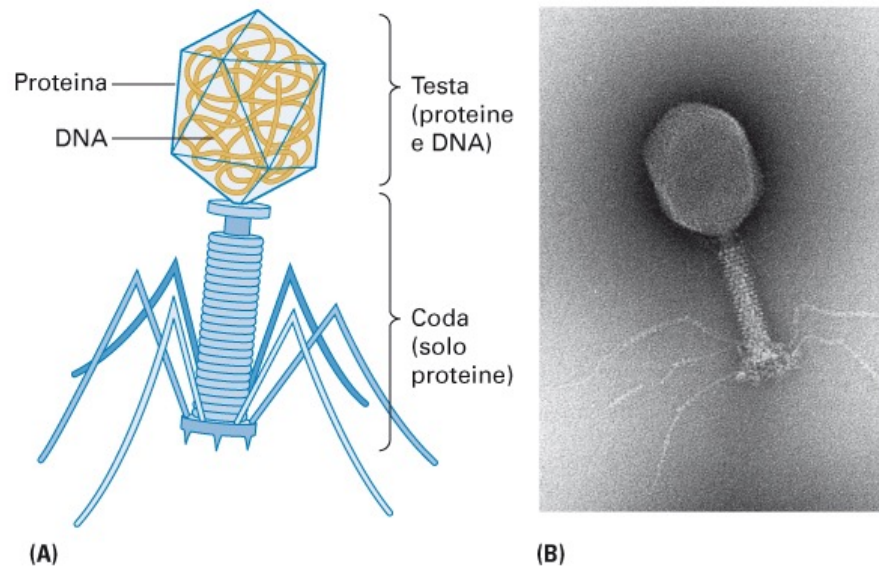
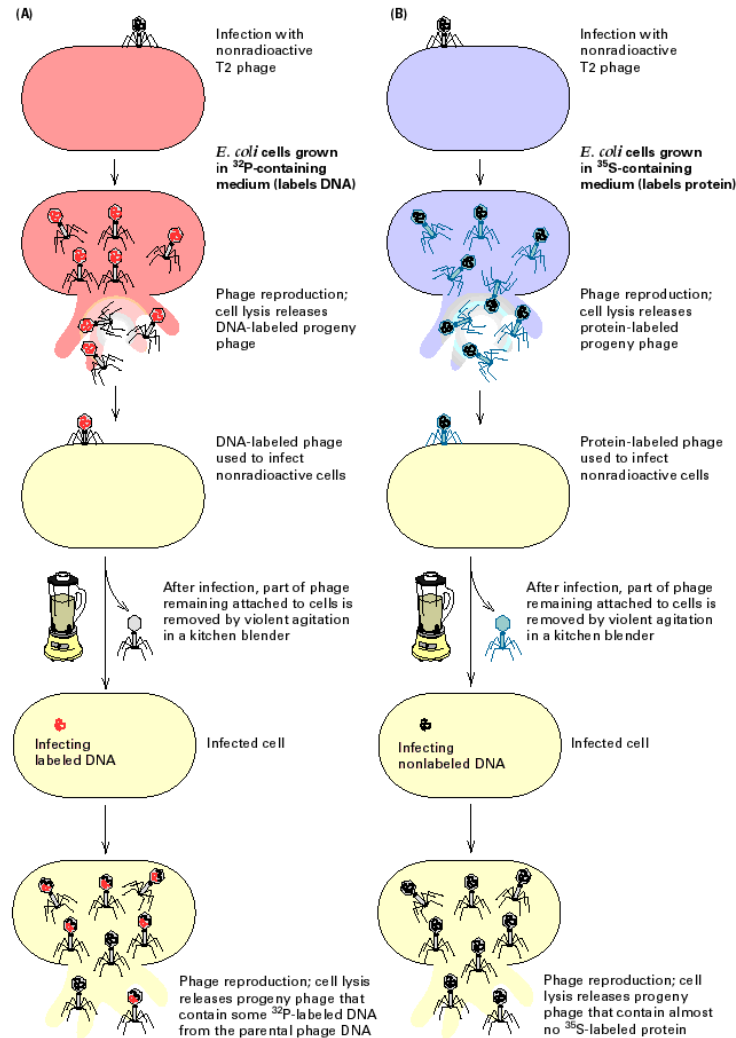
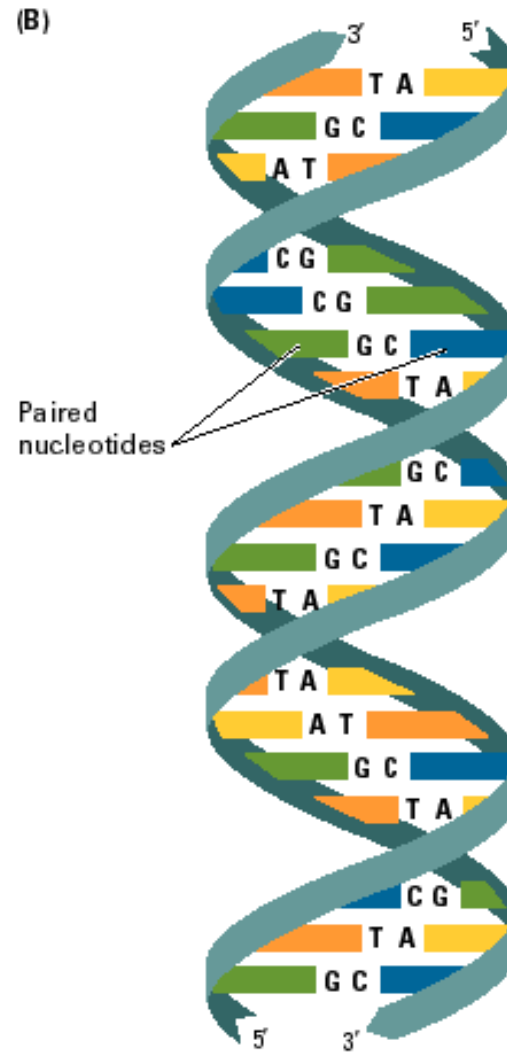
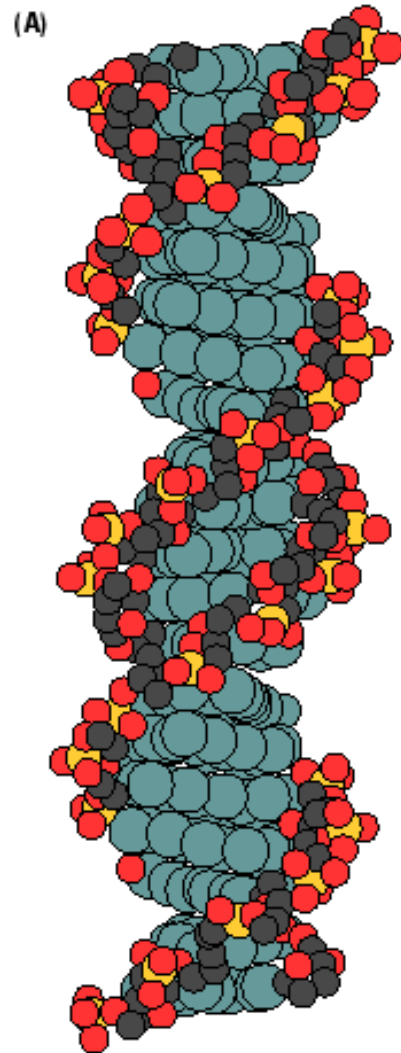


FIGURA 1.4 (A) Disegno che mostra le diverse componenti del fago T2 di *E. coli*. Il DNA è confinato all'interno della testa. (B) Micrografia al microscopio elettronico del fago T4, uno stretto parente. [Fotografia al microscopio elettronico cortesemente fornita da Robert Duda, Università di Pittsburgh].

Esperimenti di Hershey e Chase (1952)

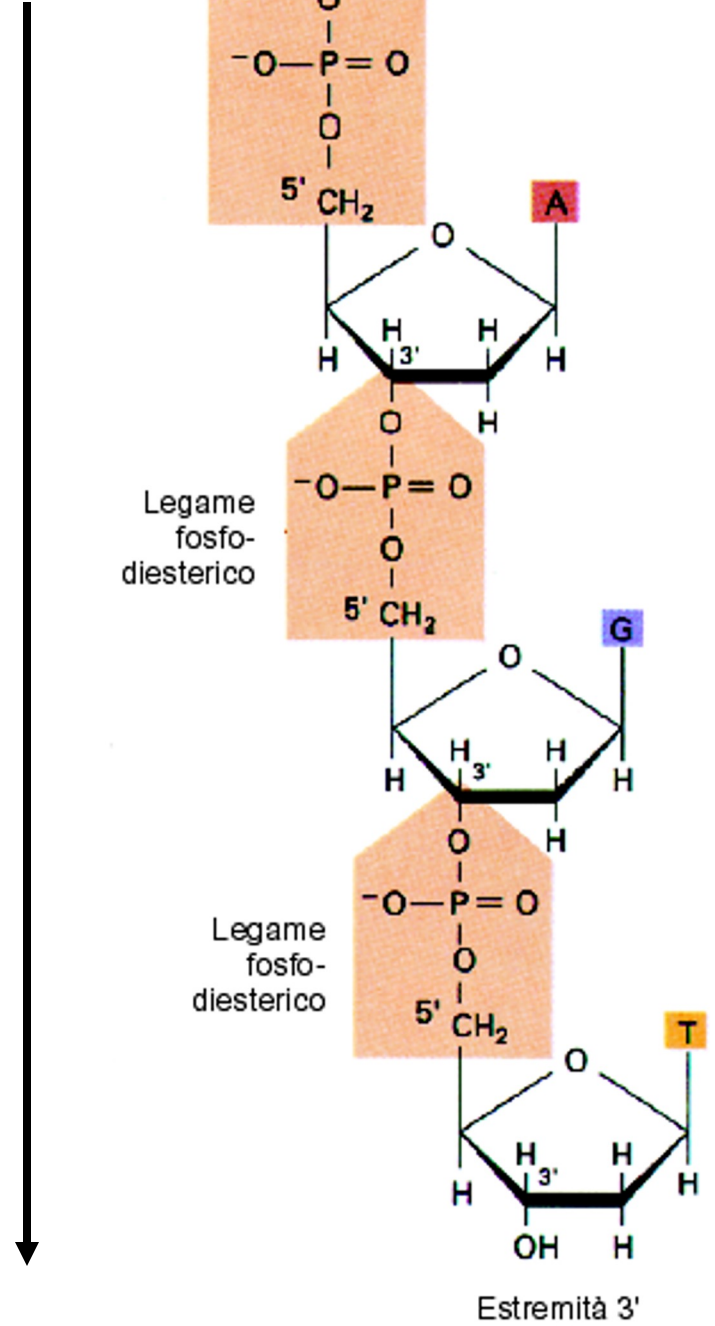


Watson and Crick (1953)

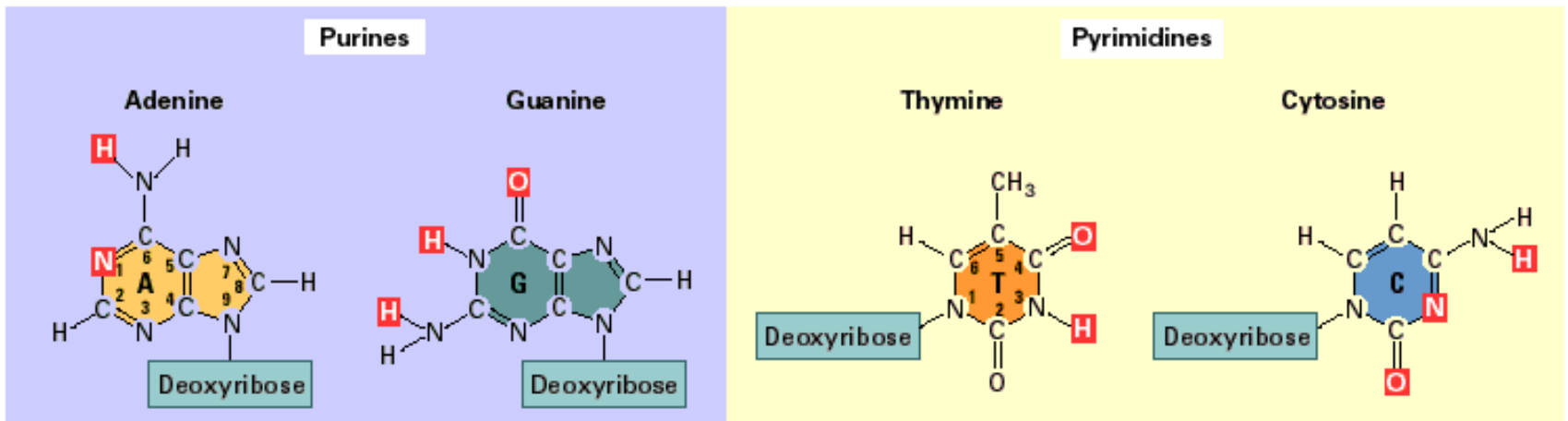


CATENA POLINUCLEOTIDICA DI DNA

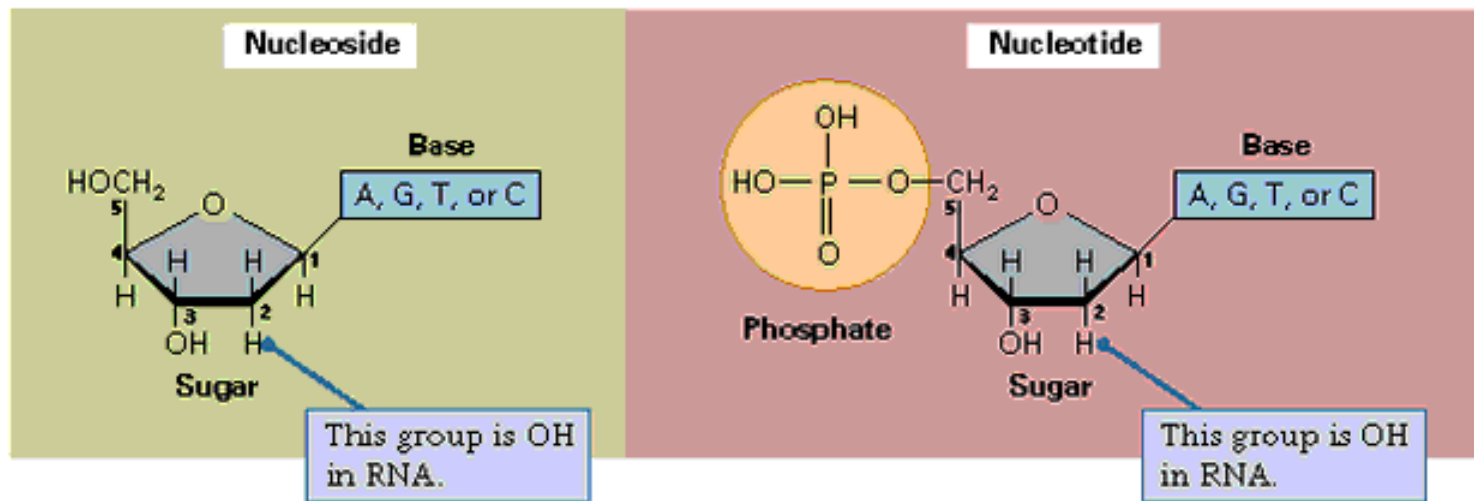
Polarità 5' → 3'



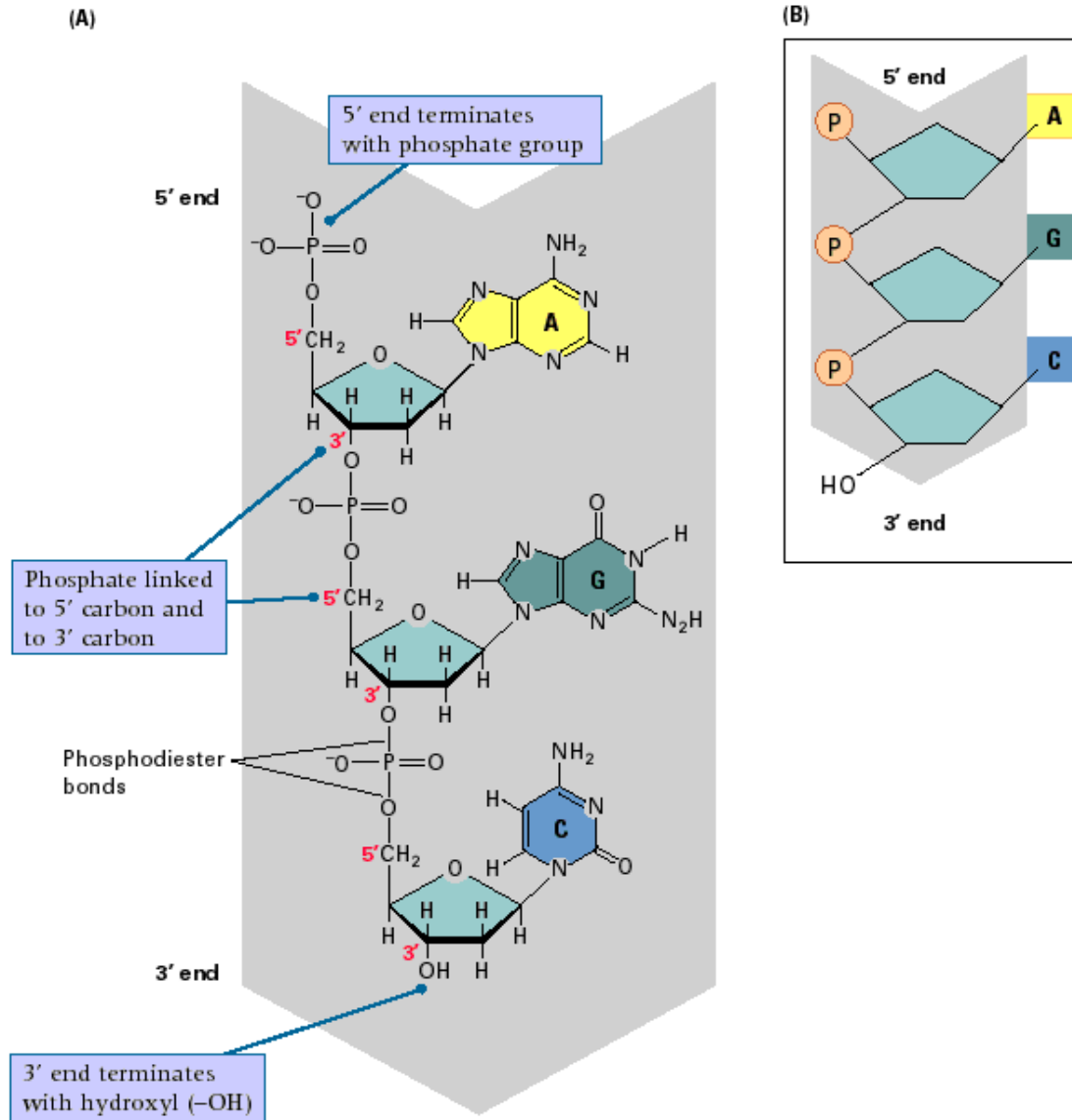
Le Basi Azotate della molecola di DNA



Il gruppo fosfato



L'emi-elica (catena polinucleotidica)



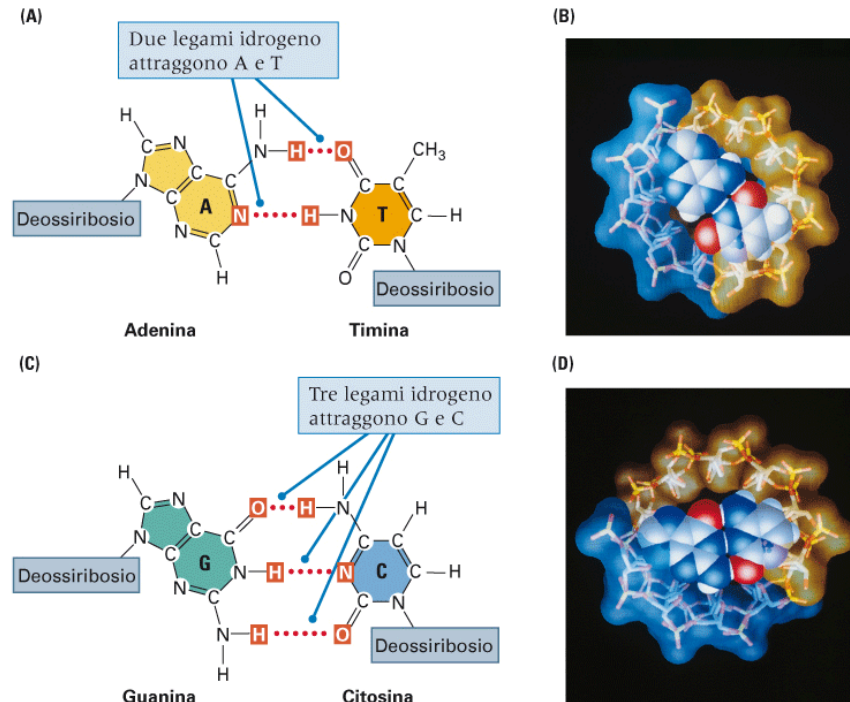
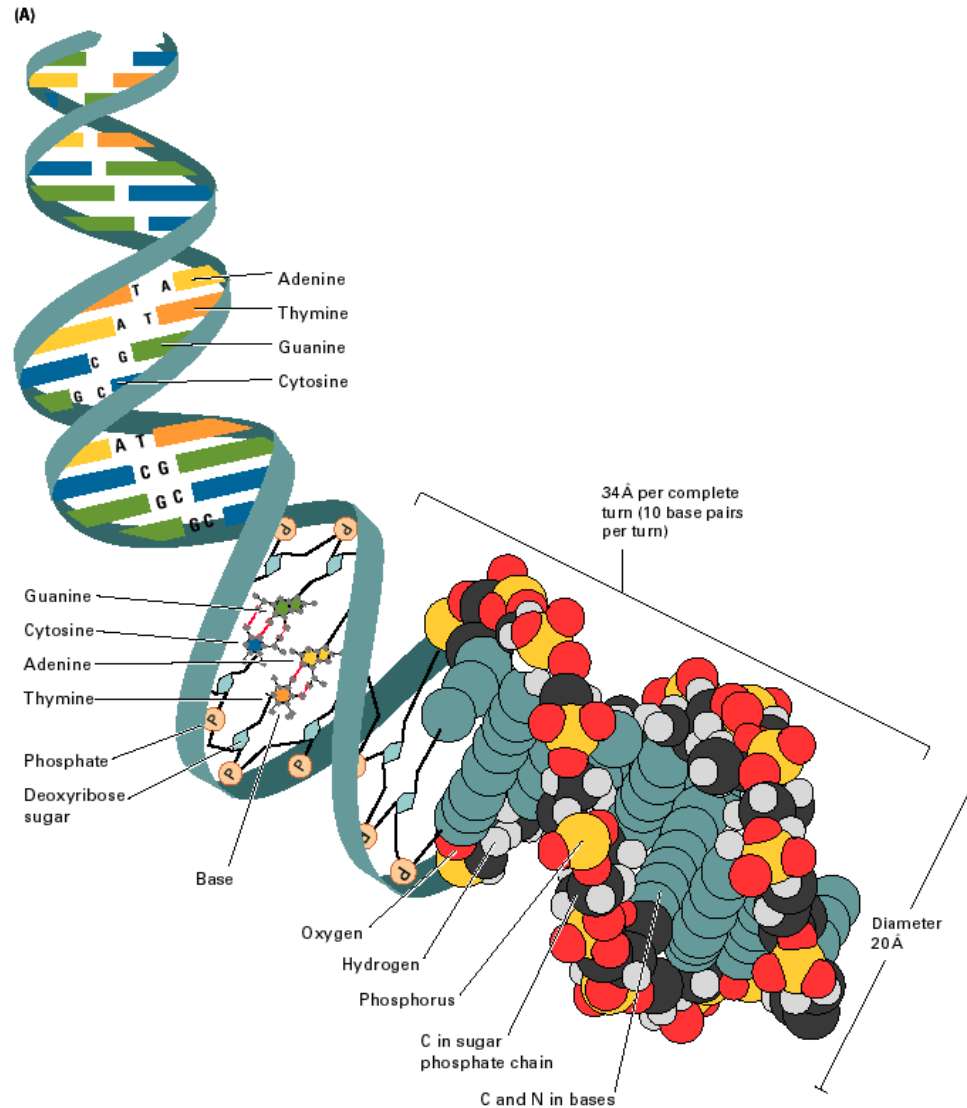


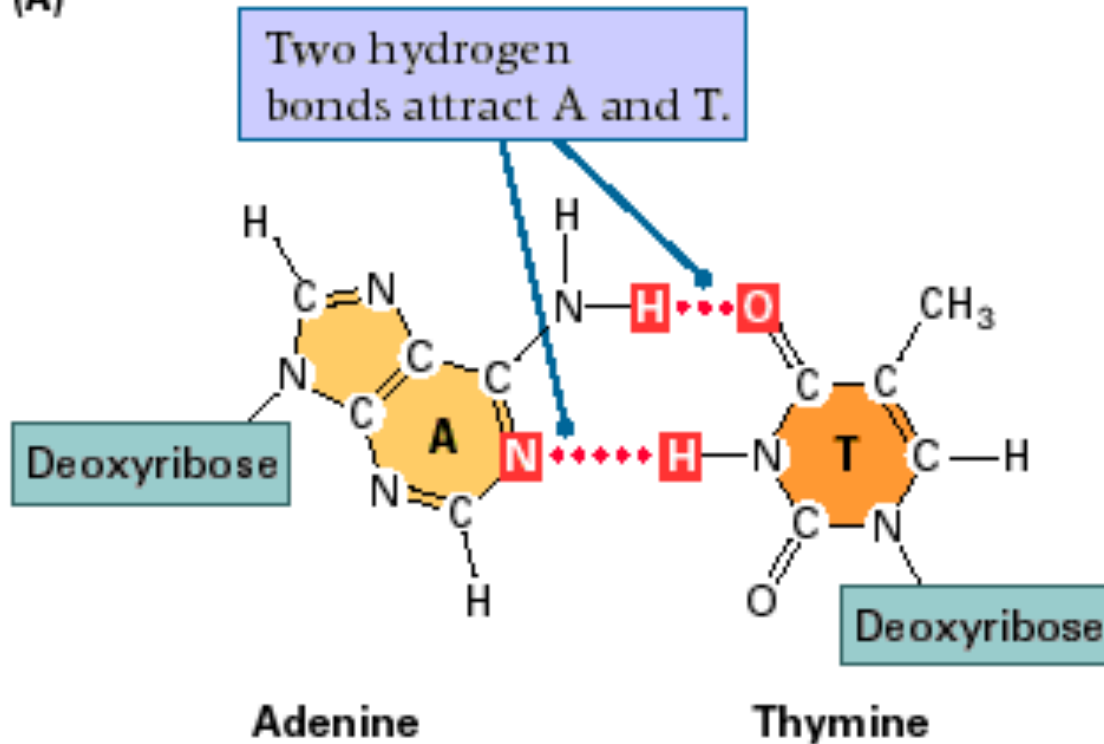
FIGURA 2.6 Il normale appaiamento di basi nel DNA. Sulla sinistra, gli atomi legati mediante legame idrogeno (linee punteggiate) sono mostrati in rosso. (A e B) Accoppiamento delle basi A-T. (C e D) Accoppiamento delle basi G-C. Nei modelli a spazio pieno (B e D), i colori sono C, grigio; N, blu; O, rosso; e H (mostrato solo nelle basi), bianco. Ogni legame idrogeno è rappresentato come un disco bianco schiacciato tra gli atomi che condividono l'atomo di idrogeno. Le figure esterne a bastoncino rappresentano gli scheletri zucchero-fosfato che si avvolgono attorno alle coppie di basi impilate. [I modelli a spazio pieno rappresentati in B e D, sono una gentile concessione di Antony M. Dean, University of Minnesota].

La doppia elica



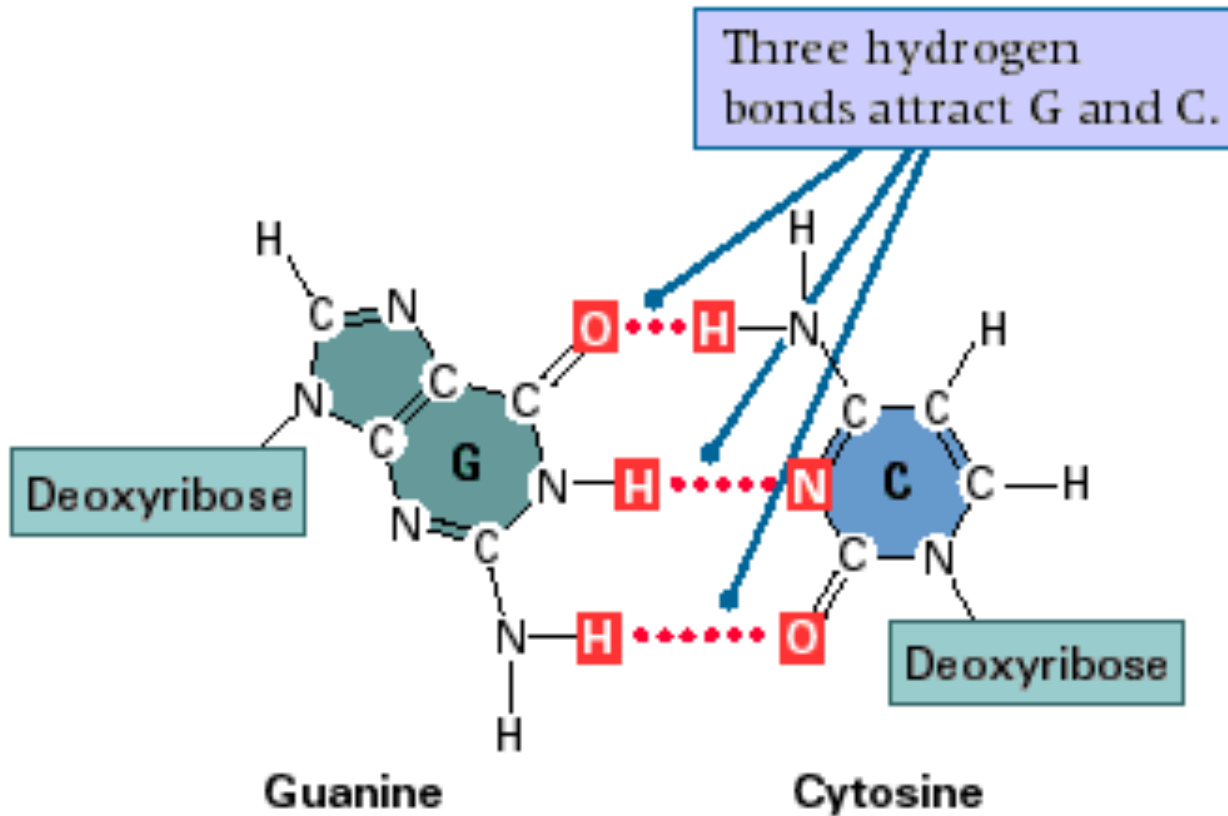
Il legame Adenina-Timina

(A)

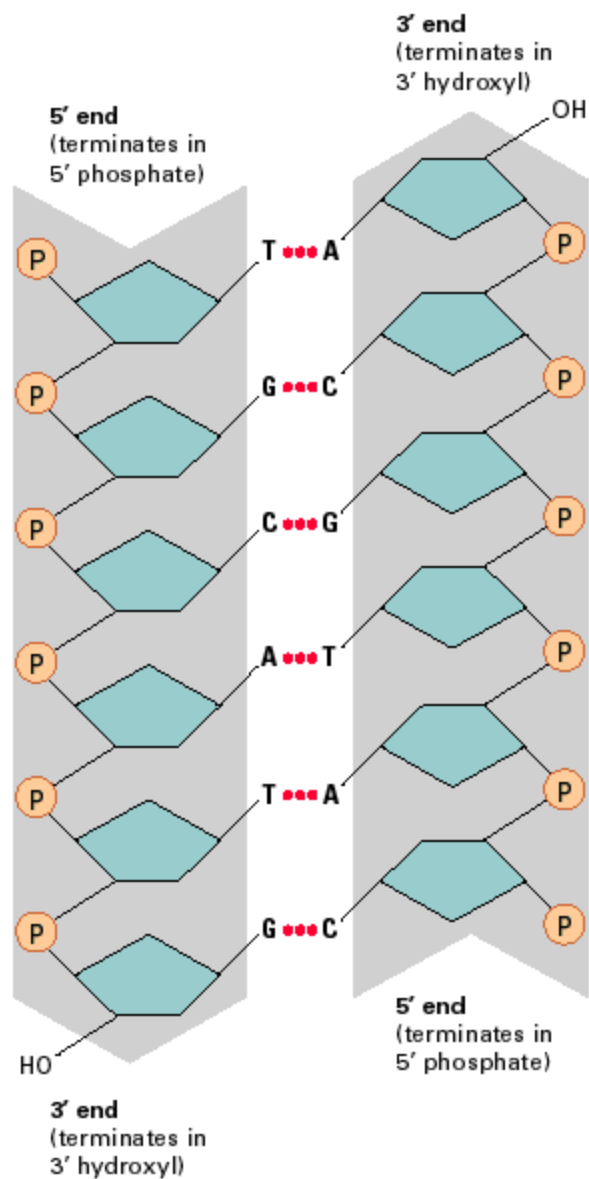


Il Legame guanina-citosina

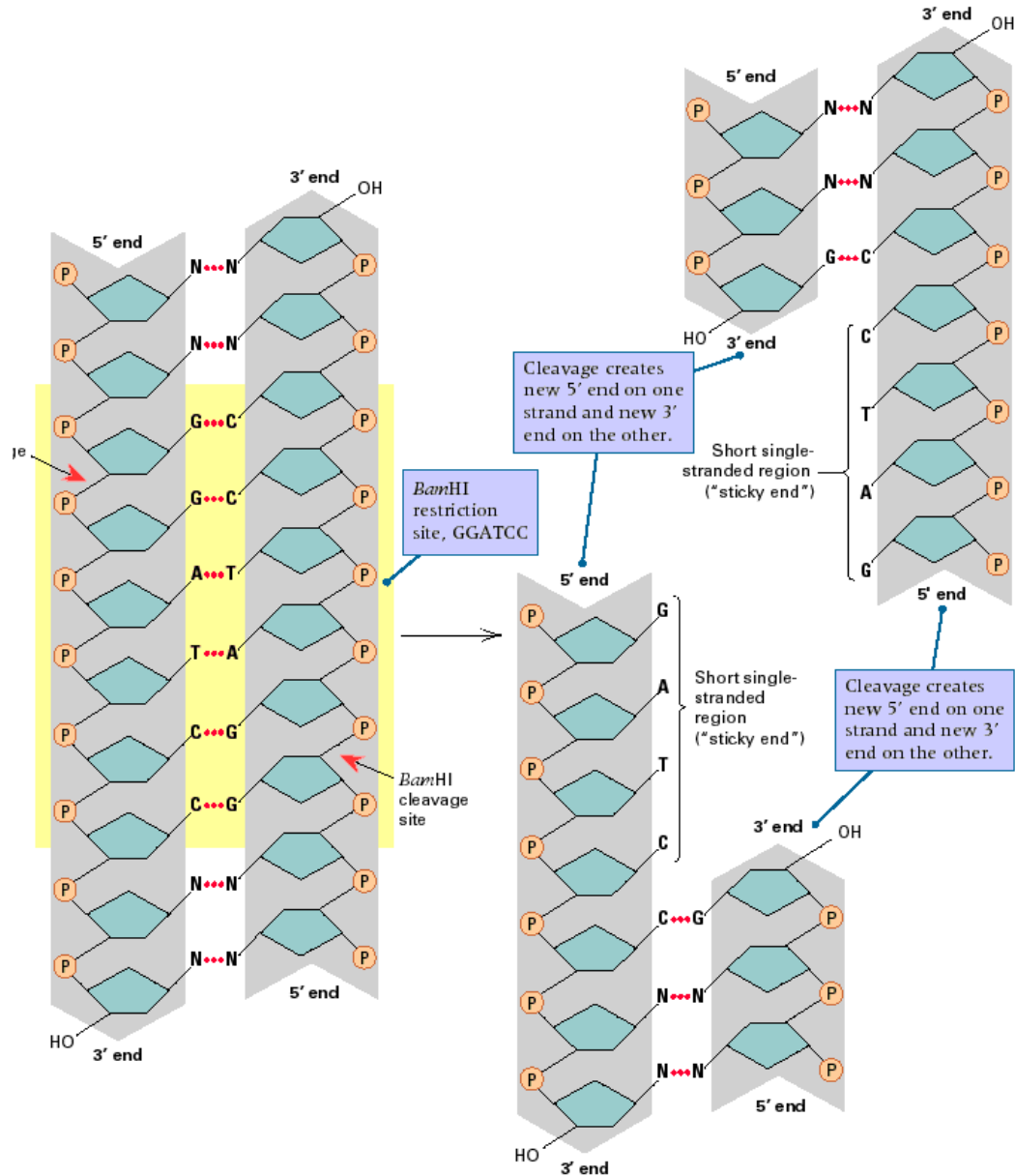
(C)



Nota la sequenza di un emi-elica è nota anche la complementare



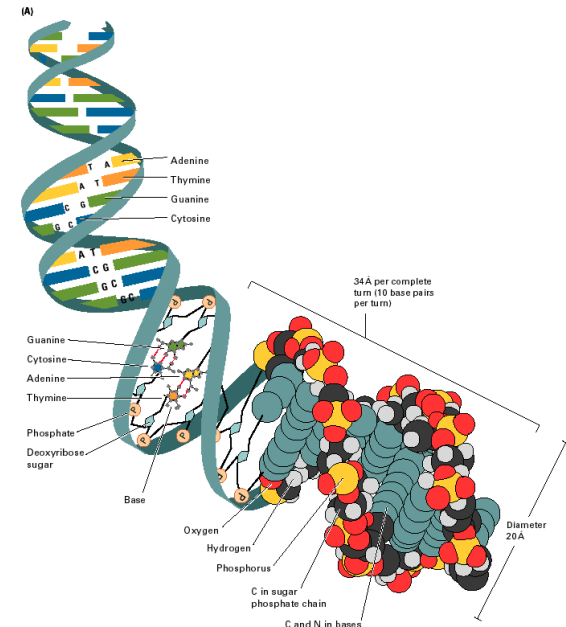
Endonucleasi di restrizione



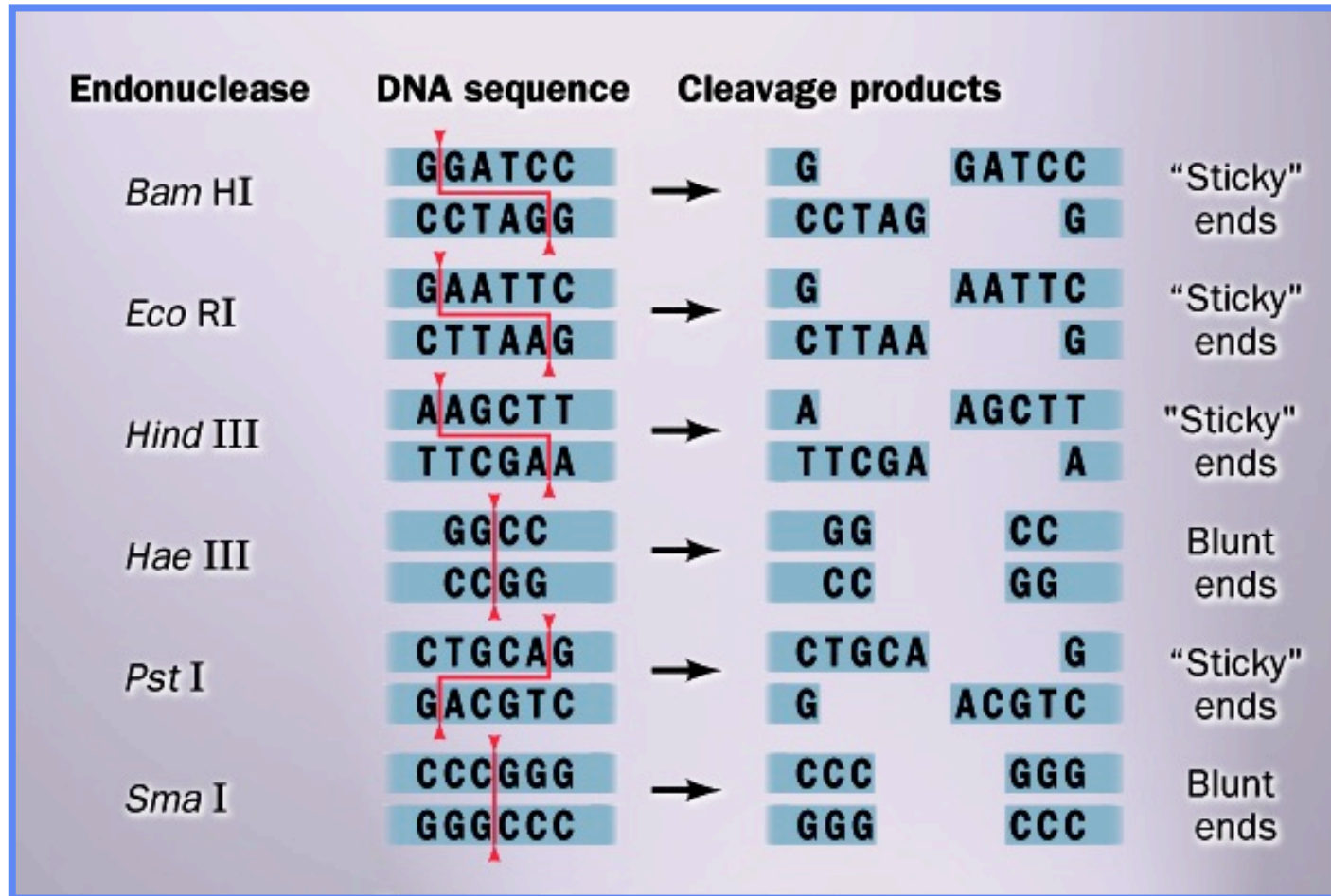
La struttura del DNA

La molecola presenta tre caratteristiche importanti:

1. le due catene sono **complementari e antiparallele**;
2. i legami tra nucleotidi in ciascuna catena sono **legami covalenti**, mentre quelli che uniscono i filamenti appaiati sono **legami a idrogeno**;
3. l'elica ha **avvolgimento destro** che crea un **solco maggiore** e un **solco minore**.

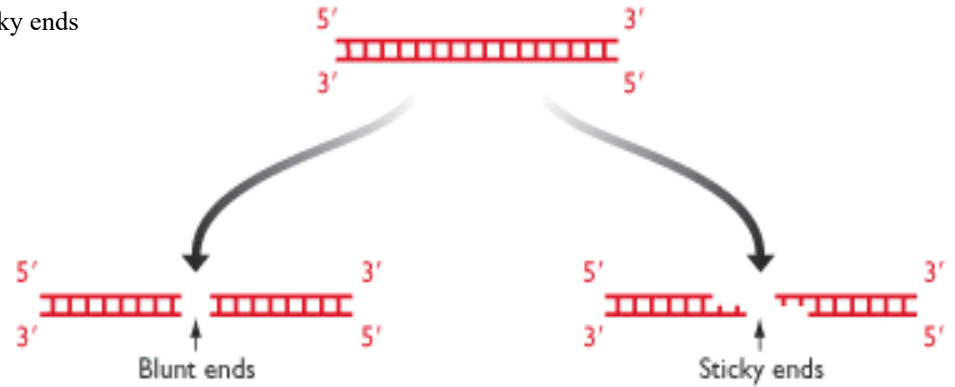


Le endonucleasi di restrizione permettono di tagliare il DNA in frammenti

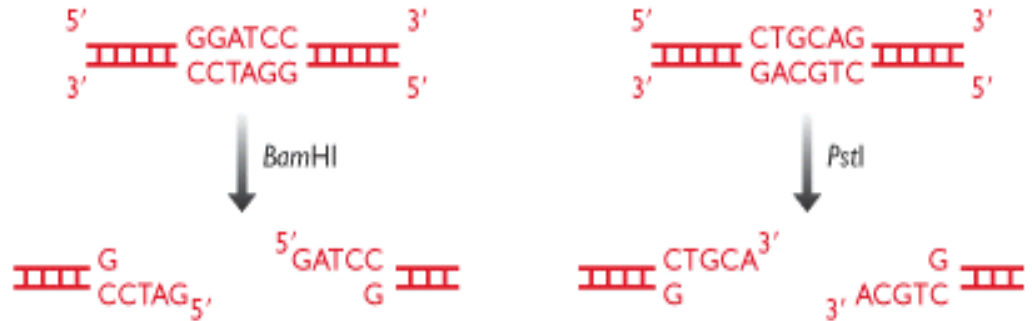


Digestion of DNA with different restriction endonucleases

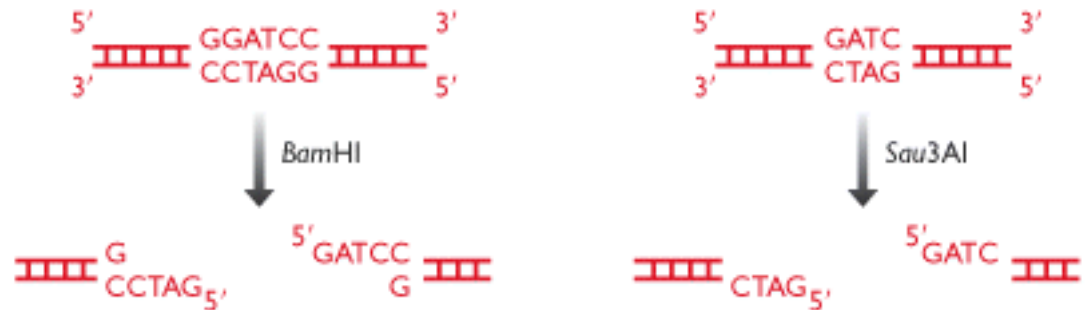
Blunt and sticky ends



5' and 3' overhangs



The same sticky ends produced by different enzymes



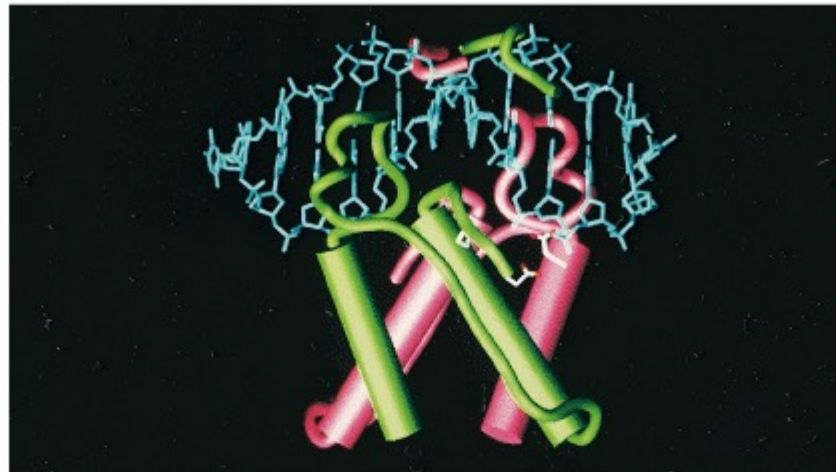


FIGURA 2.8 Struttura della porzione dell'enzima di restrizione *Bam*HI che viene a contatto con il suo sito di riconoscimento sul DNA (blu). I cilindri rosa e verde rappresentano le regioni dell'enzima in cui la catena amminoacidica è avvolta a forma di elica destrorsa. [Riprodotta da T. Newman et al., *Science* 269 (1995): 656-663. Ristampata con il permesso dell'AAAS].

I frammenti derivati dal taglio della molecola di DNA con endonucleasi di restrizione possono essere separati mediante elettroforesi

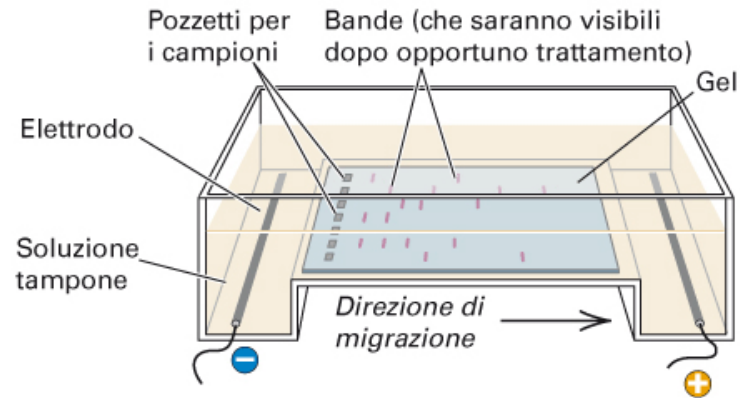
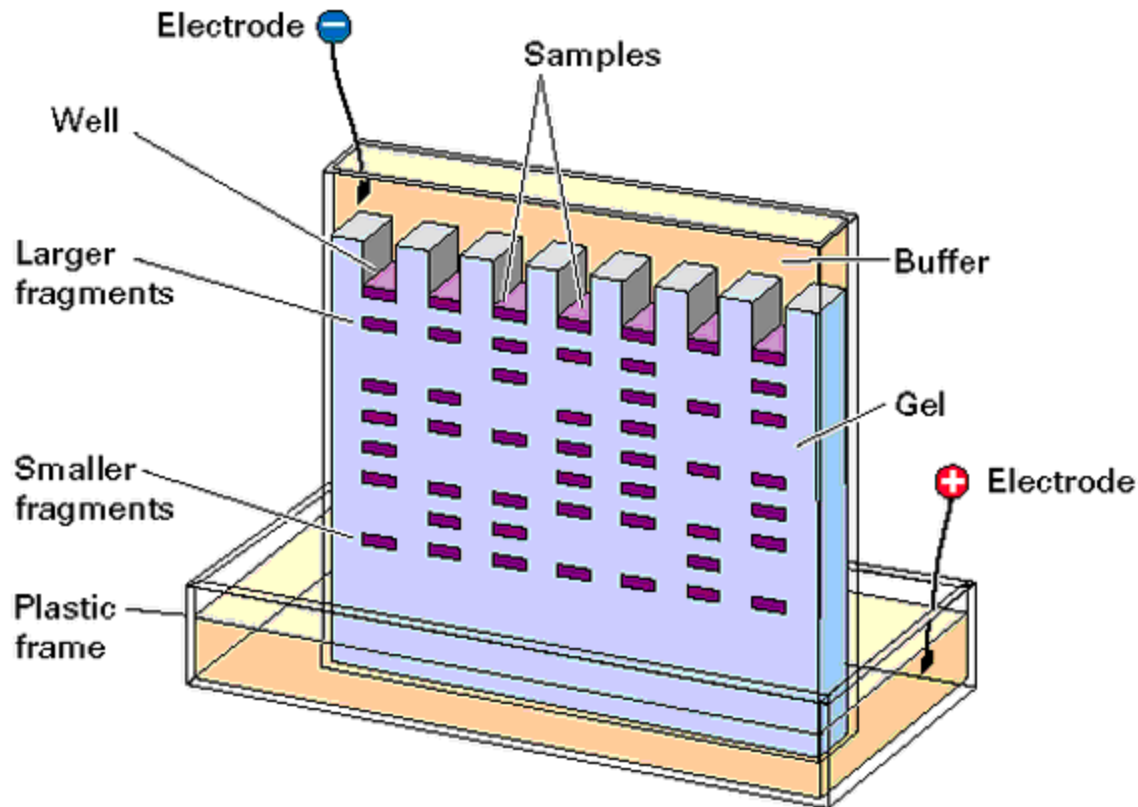


FIGURA 2.10 Apparato per gel elettroforesi. Il gel liquefatto è posto a polimerizzare in uno stampo appropriato che consente la formazione dei pozzetti. Dopo l'elettroforesi, i campioni di DNA, che si trovano in posizione diversa nel gel, sono resi visibili immergendo il gel in una soluzione contenente un reagente che lega o che reagisce con il DNA. I frammenti di un campione separati appaiono come bande che possono essere colorate mediante un colorante visibile o fluorescente. La regione del gel in cui migrano i frammenti di un campione è detta *corsia*.

Una volta separati per elettroforesi i frammenti di DNA possono essere colorati con intercalanti e visualizzati sul gel di agarosio



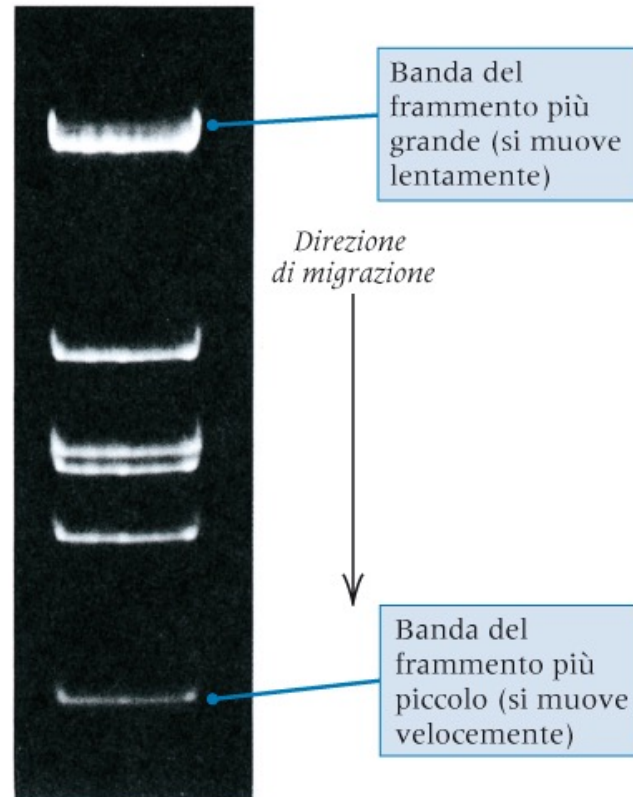
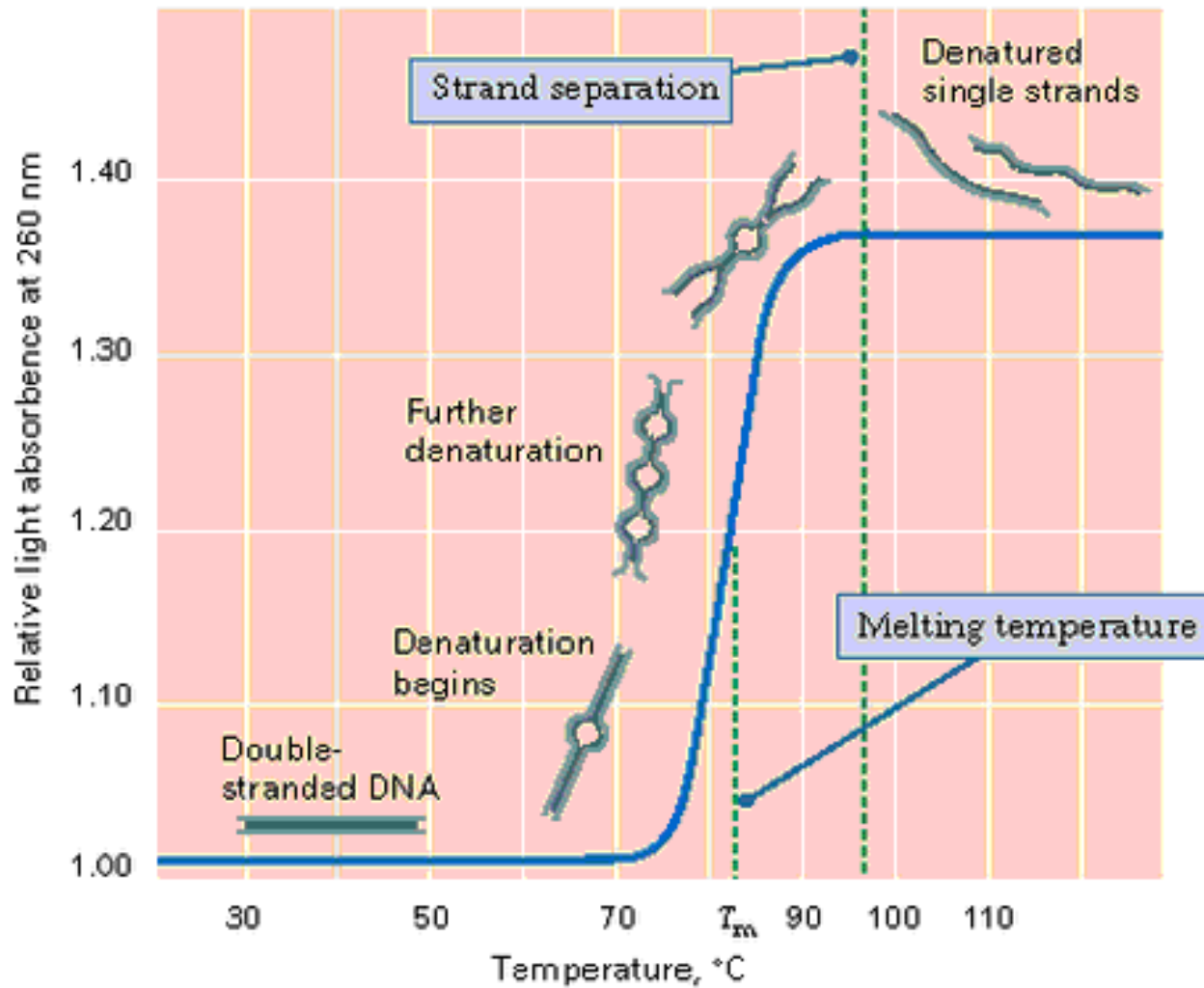
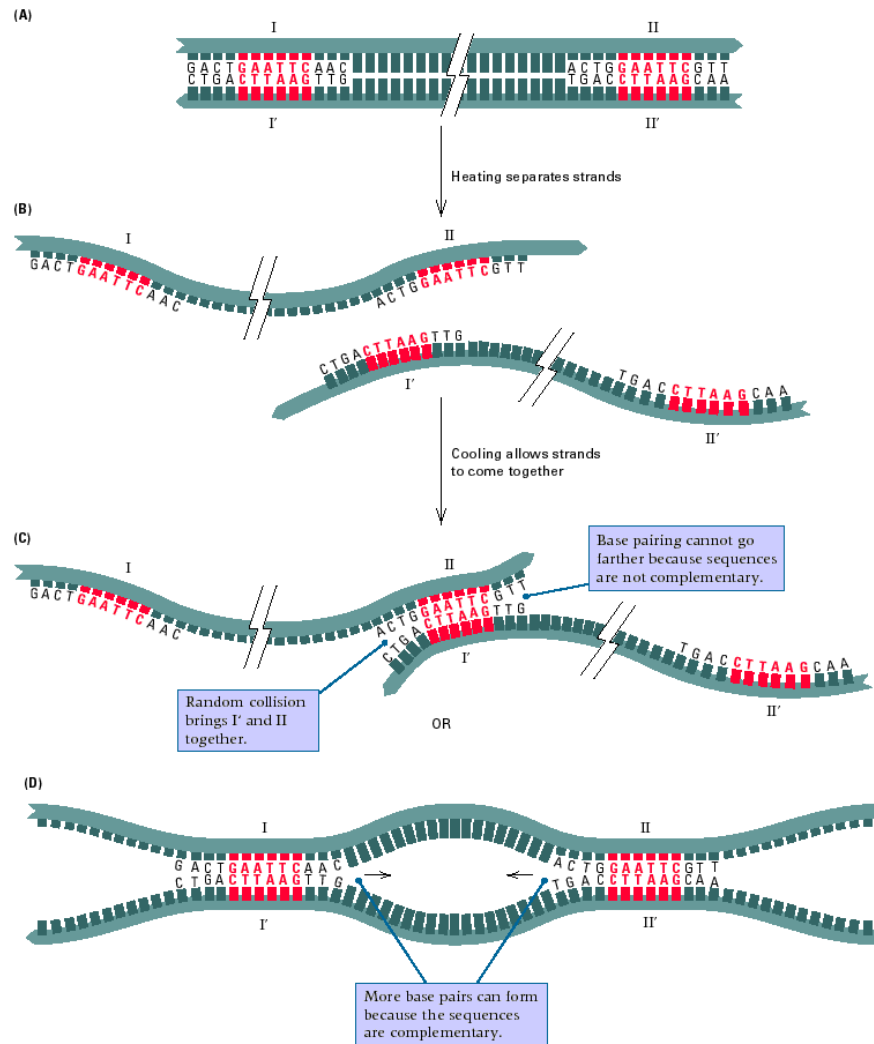


FIGURA 2.11 Gel elettroforesi del DNA. Frammenti di DNA di dimensioni diverse sono stati miscelati e caricati in un pozzetto. L'elettroforesi è stata condotta verso il basso. Il DNA è reso visibile dall'aggiunta di un colorante (bromuro di etidio) che si lega al DNA ed emette fluorescenza quando viene eccitato con luce ultravioletta a lunghezza d'onda corta.

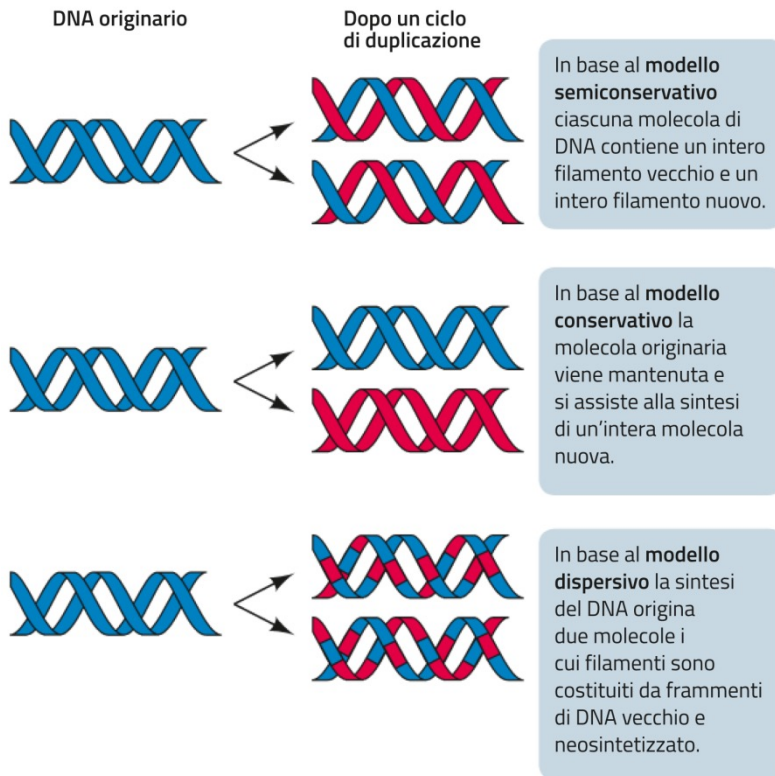
Denaturazione del DNA



Il DNA può essere denaturato ad alte temperature e rinaturato abbassando la temperatura



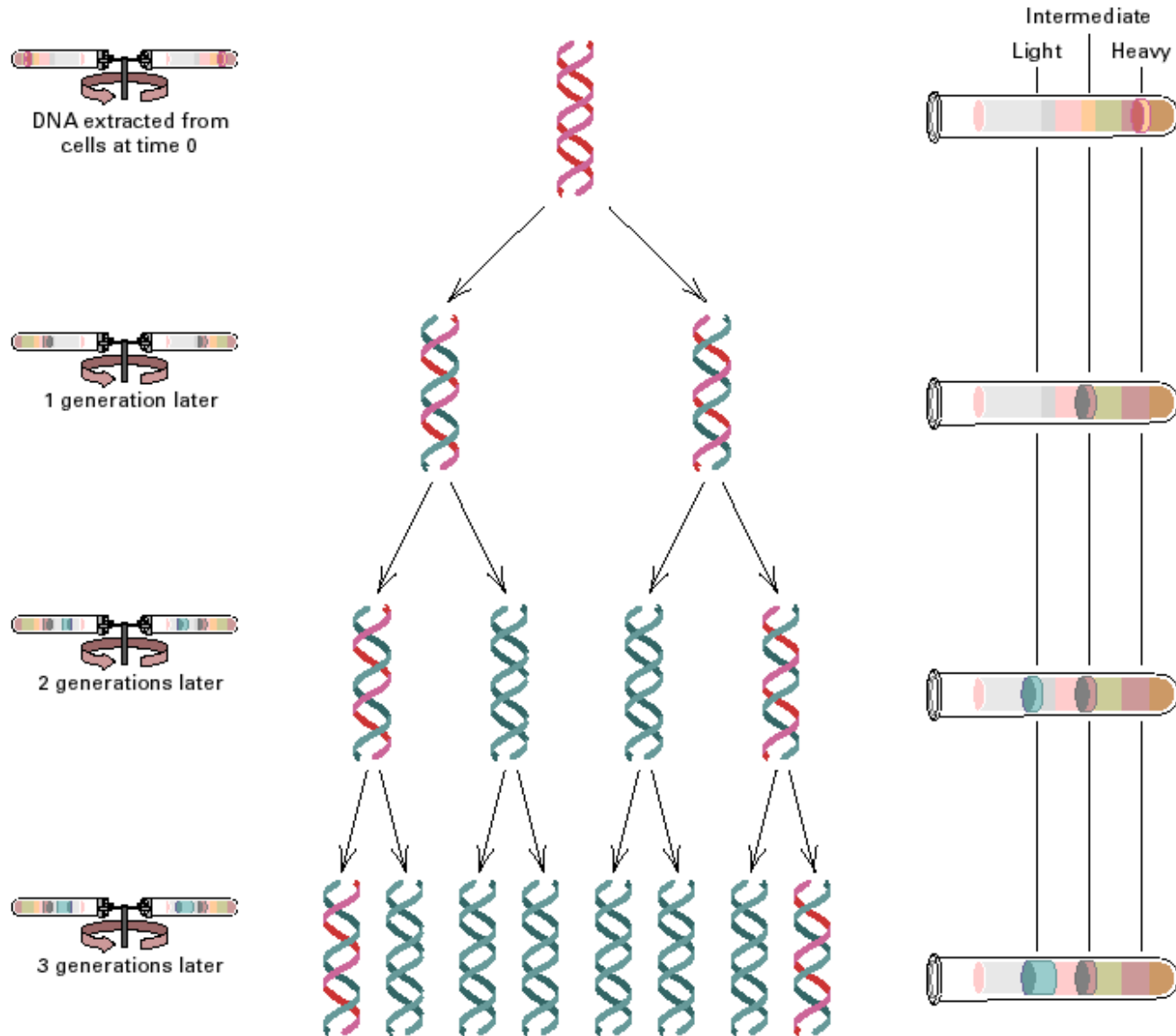
Replicazione del DNA



Il DNA è in grado di replicarsi

Esistevano diverse teorie circa il metodo di duplicazione del DNA. I risultati sperimentali dimostrarono che la duplicazione è **semiconservativa**.

Nelle cellule la replicazione del DNA è semiconservativa



Meselson e Stahl 1958

La replicazione del DNA

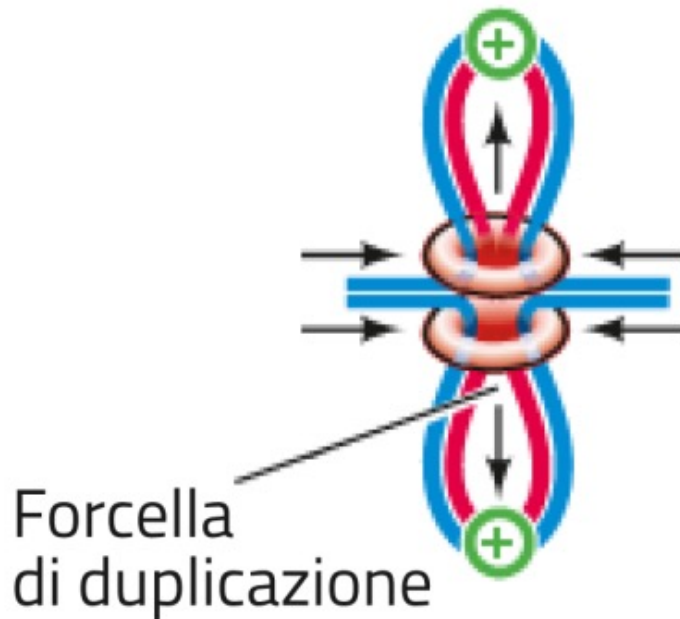
La replicazione del DNA richiede precise condizioni e si svolge in due fasi:

- 1. separazione** dei due filamenti del DNA stampo grazie a specifici enzimi;
- 2. allungamento** di ciascun filamento per aggiunta di nucleotidi all'estremità 3' grazie alla *DNA polimerasi*.

Le forcelle di replicazione

Il complesso di duplicazione avvia la sintesi di DNA da un punto specifico chiamato *ori*.

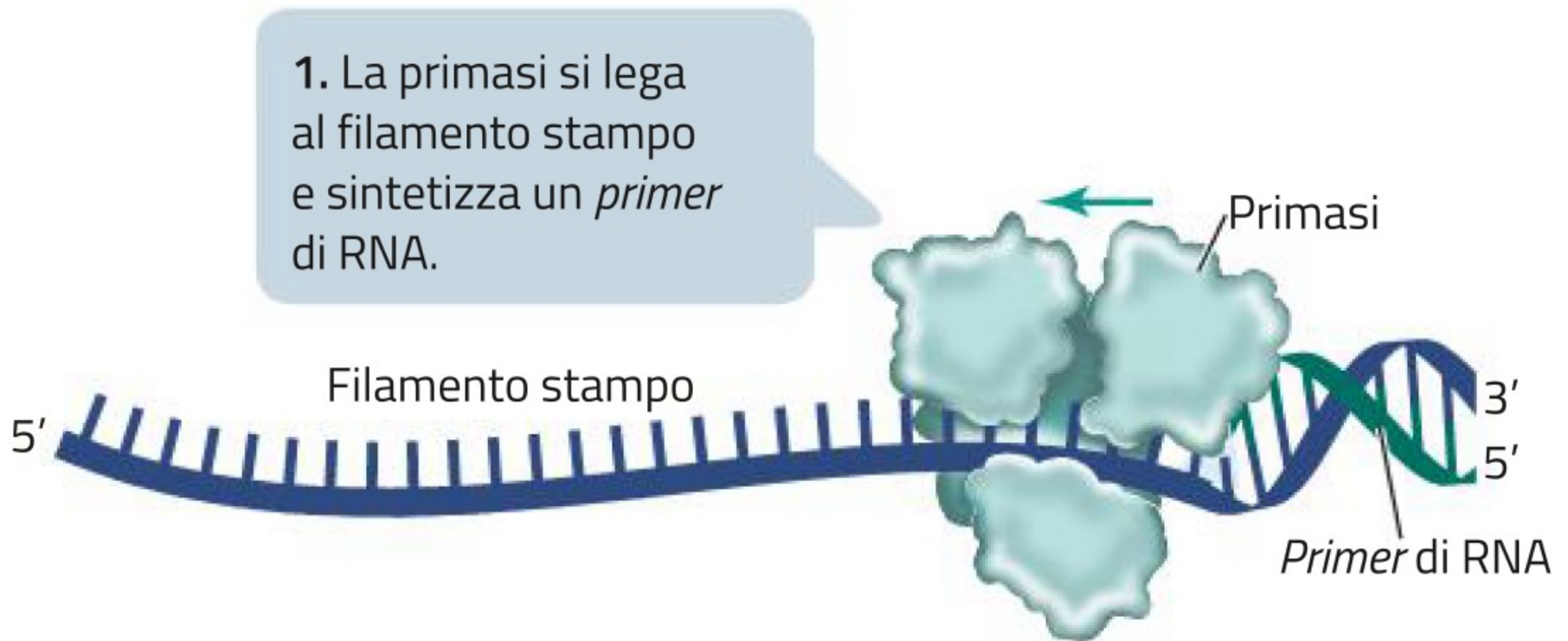
Da questo punto il DNA inizia a svolgersi in due **forcelle di replicazione** distinte.



I complessi di duplicazione sono stazionari e il DNA vi scorre attraverso.

La primasi inizia la replicazione

Su ciascuno dei due filamenti l'enzima **primasi** sintetizza un breve **primer** complementare al filamento stampo.

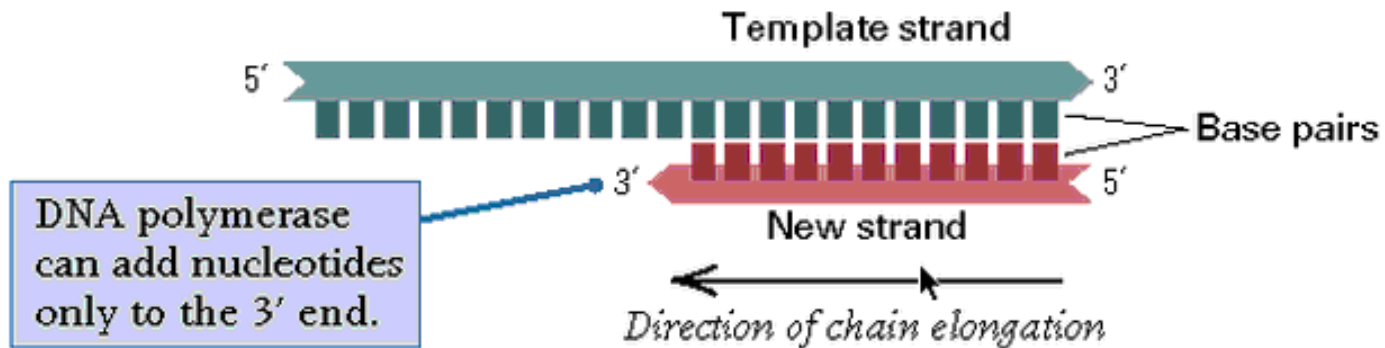


DNA polimerasi

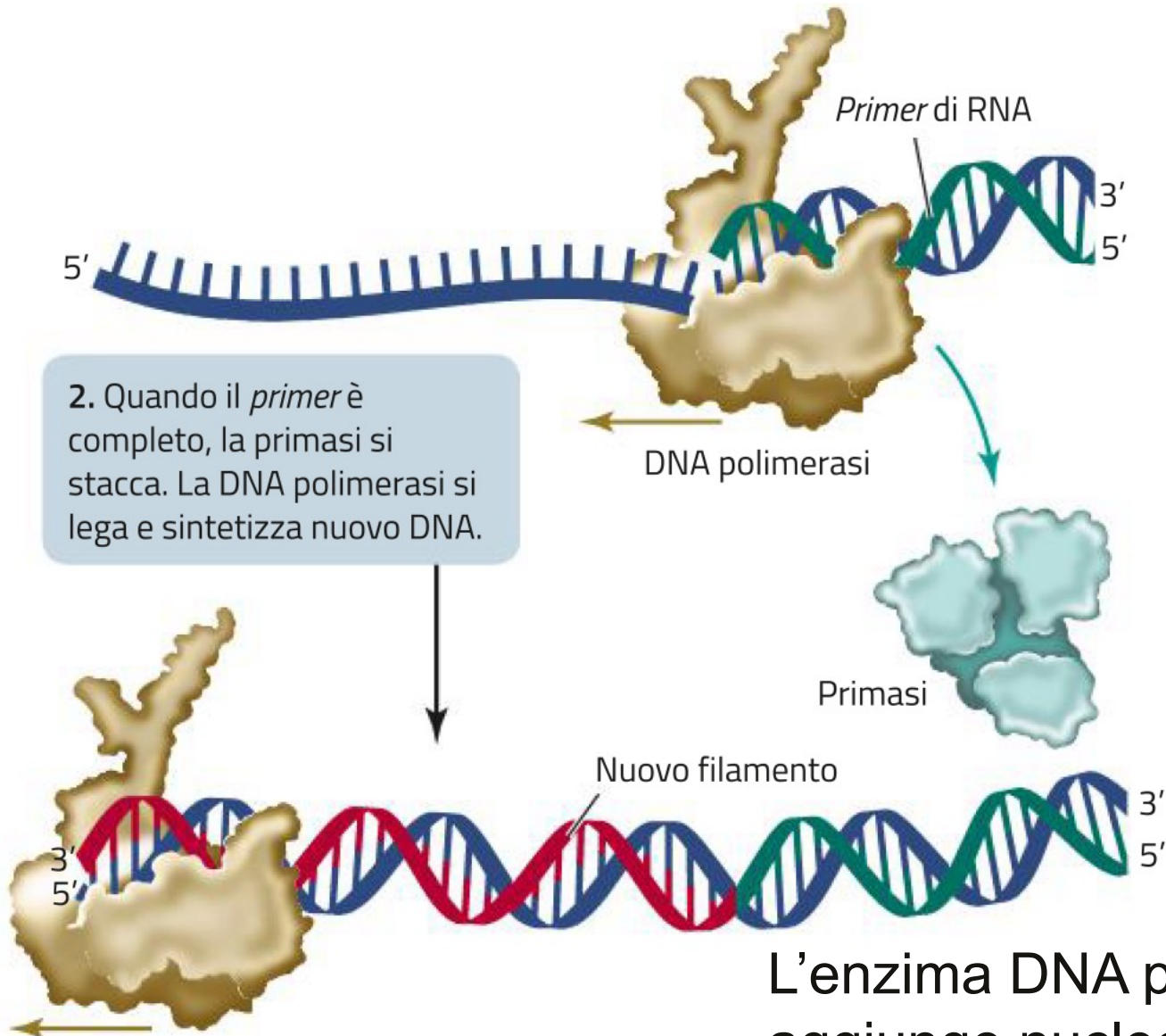
Tutte le DNA polimerasi conosciute sintetizzano il nuovo filamento in direzione 5'- 3' aggiungendo deossiribonucleotidi (dNTP) al gruppo 3'-OH del deossiribosio del nucleotide precedente. Nessuna DNA-polimerasi nota è in grado di iniziare la sintesi di un filamento "da zero" (ex novo). Per questa ragione le DNA-polimerasi necessitano di inneschi (in inglese "primers") a cui aggiungere il primo nucleotide. Tali inneschi possono essere sia di DNA sia di RNA. Durante la replicazione in vivo tali inneschi di RNA sono forniti da una speciale RNA polimerasi detta primasi.

Questi inneschi verranno poi eliminati grazie ad alcuni tipi particolari di RNAsi, enzimi capaci di degradare l'RNA. Sarà poi compito dell'enzima DNA ligasi legare l'estremità 3' del nuovo tratto sintetizzato con l'estremità 5' del tratto di DNA precedente.

Una emielica funge da stampo per la sintesi dell'emiellica complementare

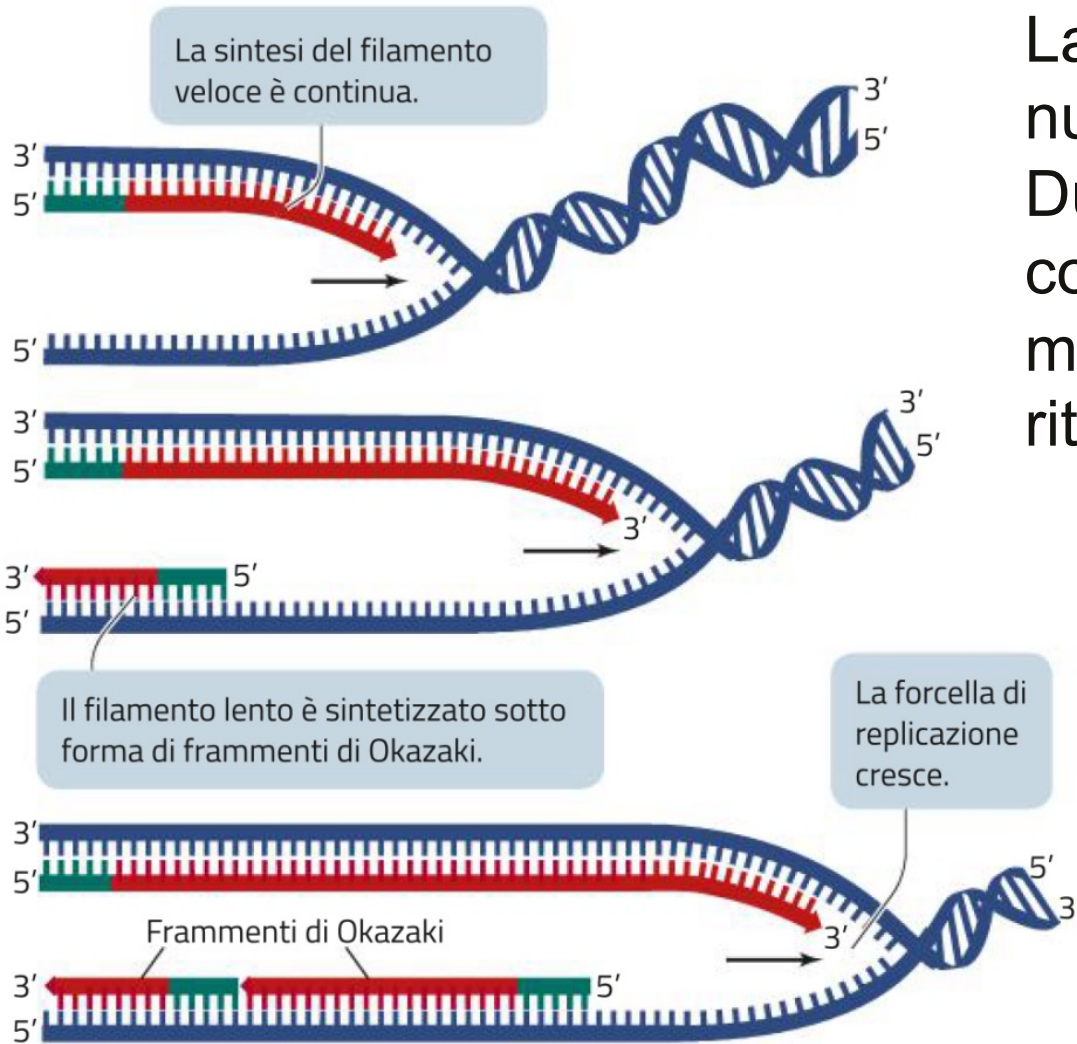


La polimerasi continua la sintesi



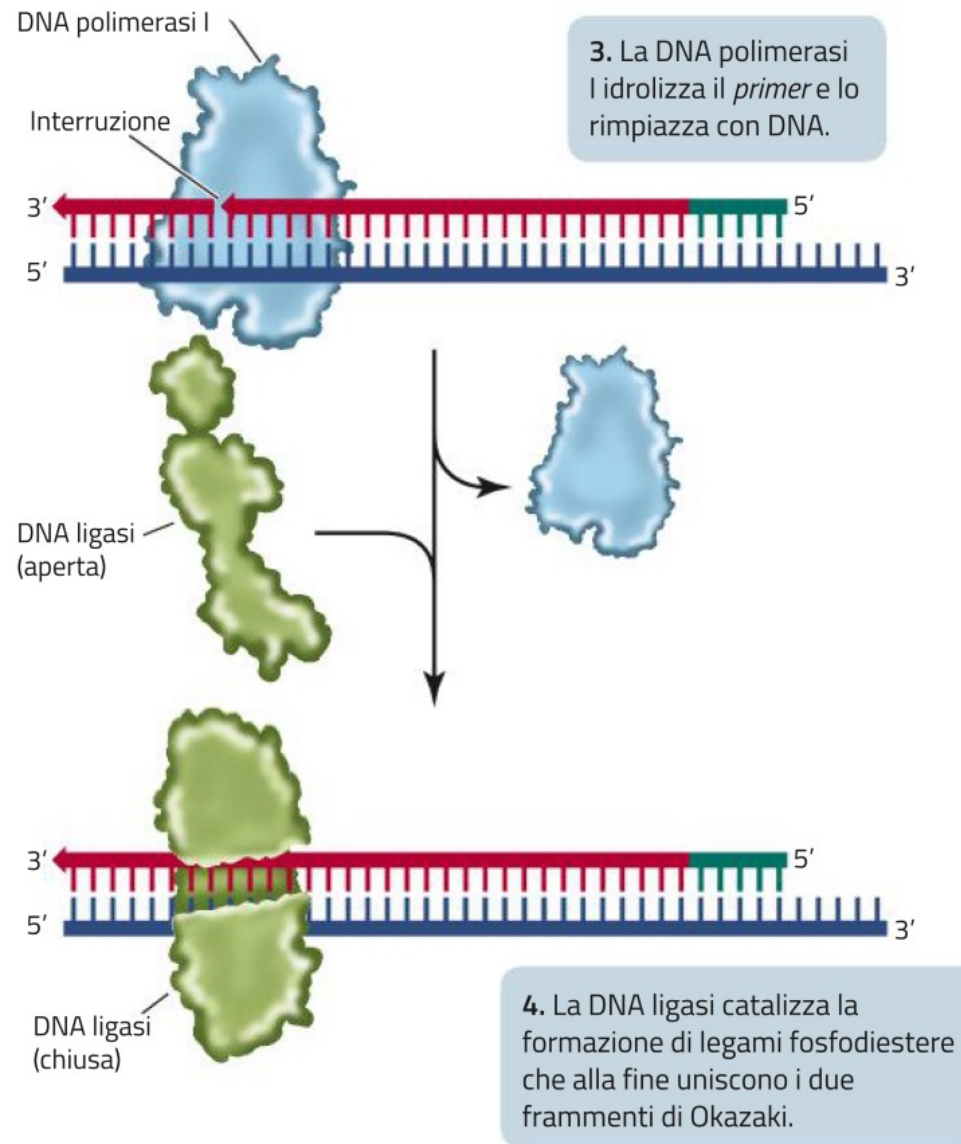
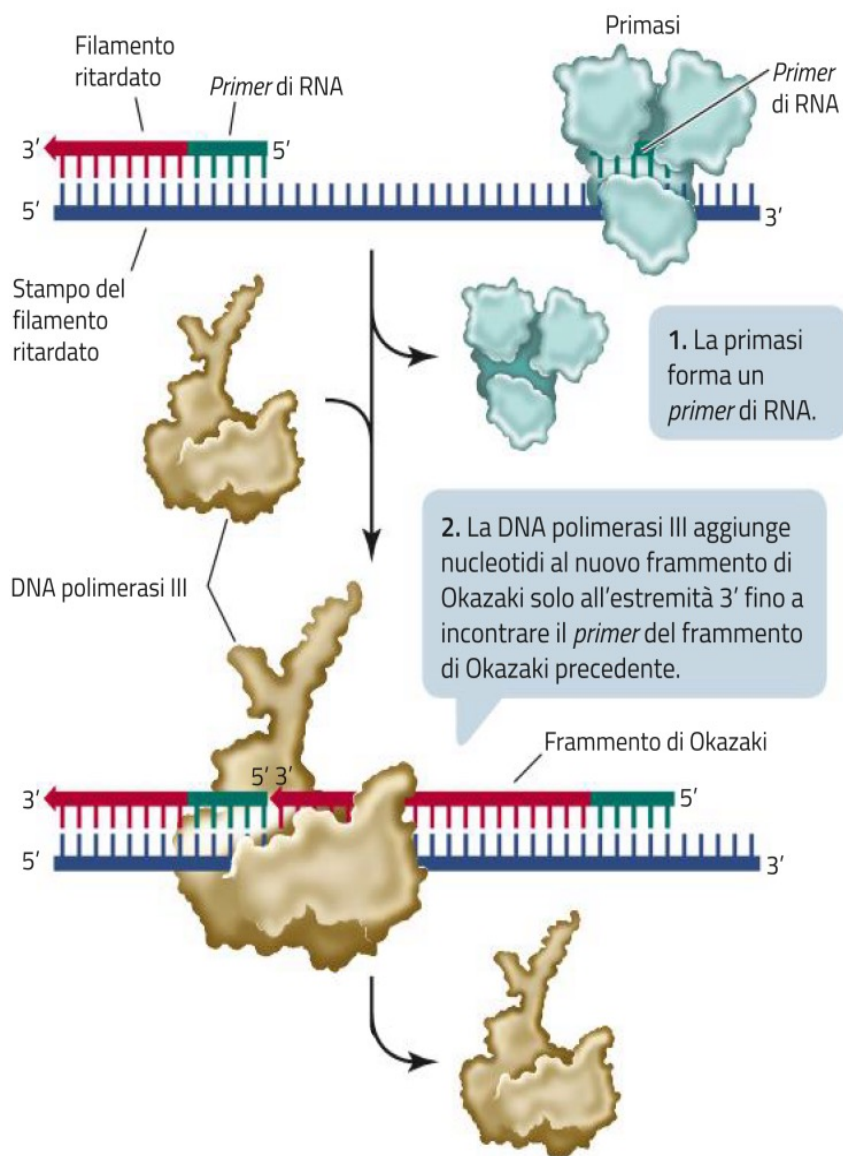
L'enzima DNA polimerasi aggiunge nucleotidi all'estremità 3' del primer.

I filamenti si formano diversamente

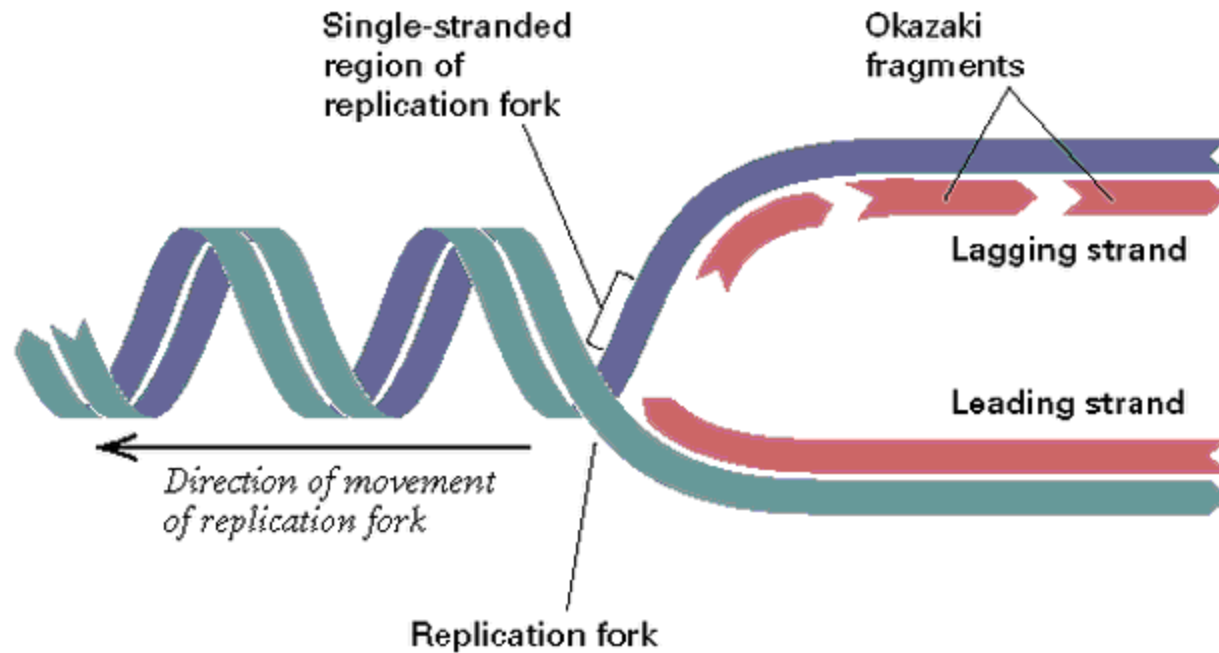


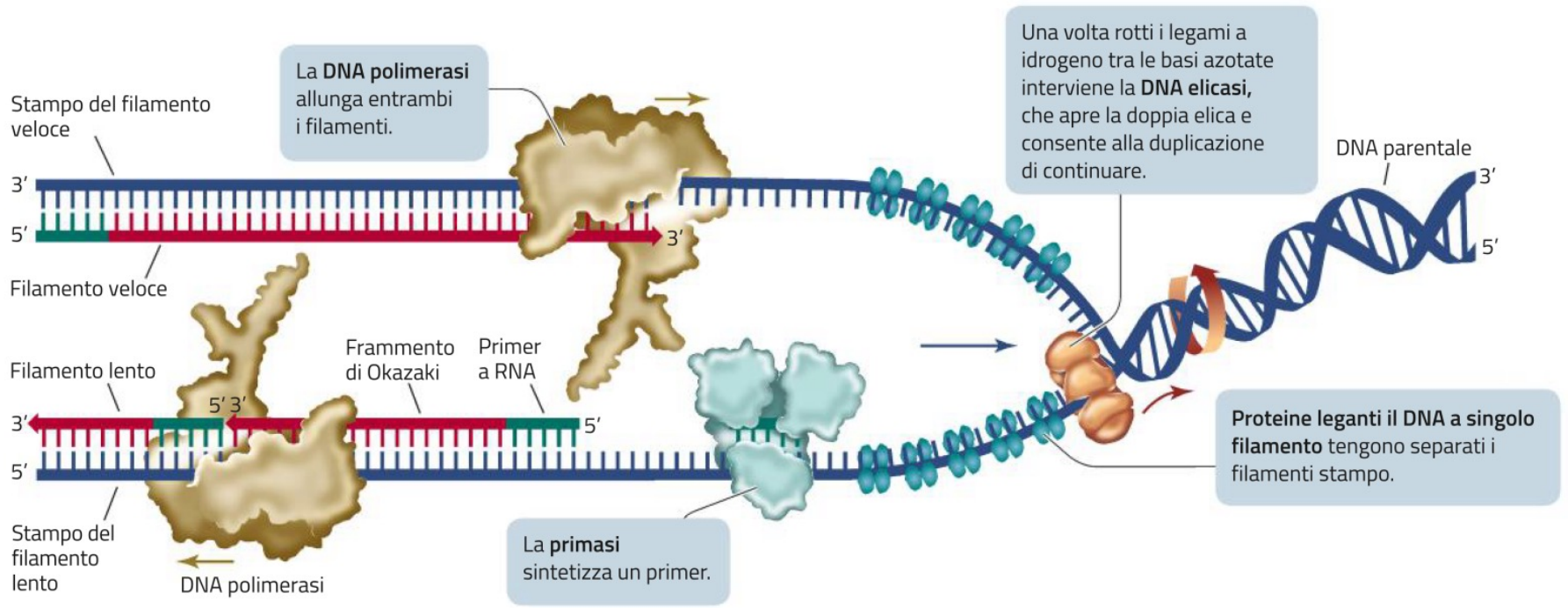
La DNA polimerasi aggiunge nucleotidi solo all'estremità 3'. Dunque la duplicazione è continua sul **filamento veloce**, ma discontinua e procede a ritroso sul **filamento lento**.

La replicazione del filamento lento

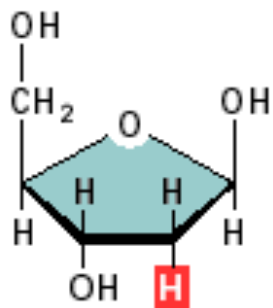


Un filamento veloce, uno lento

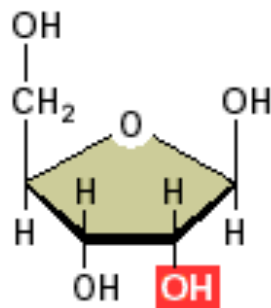




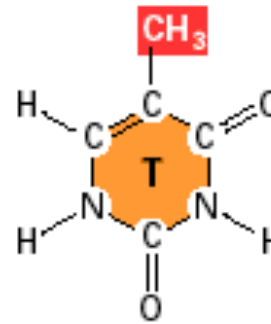
L'aiuto offerto dall'RNA per la sintesi del DNA



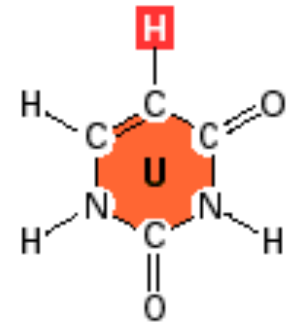
Deoxyribose



Ribose

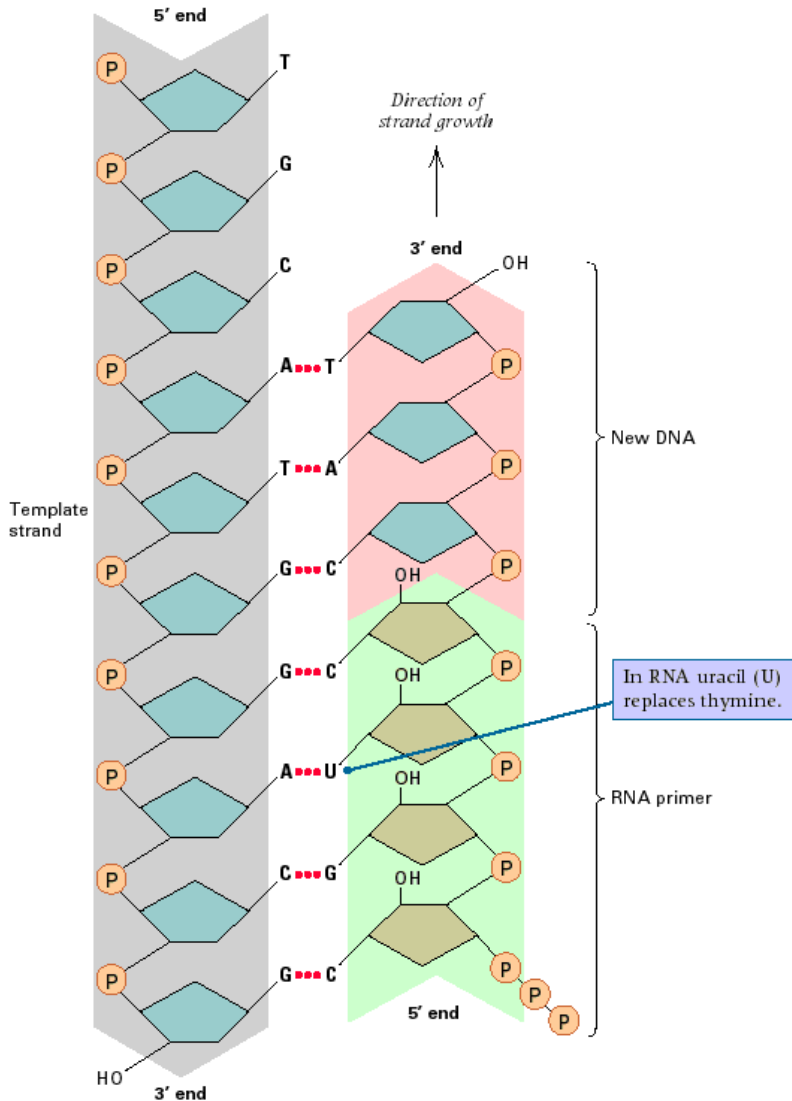


Thymine



Uracil

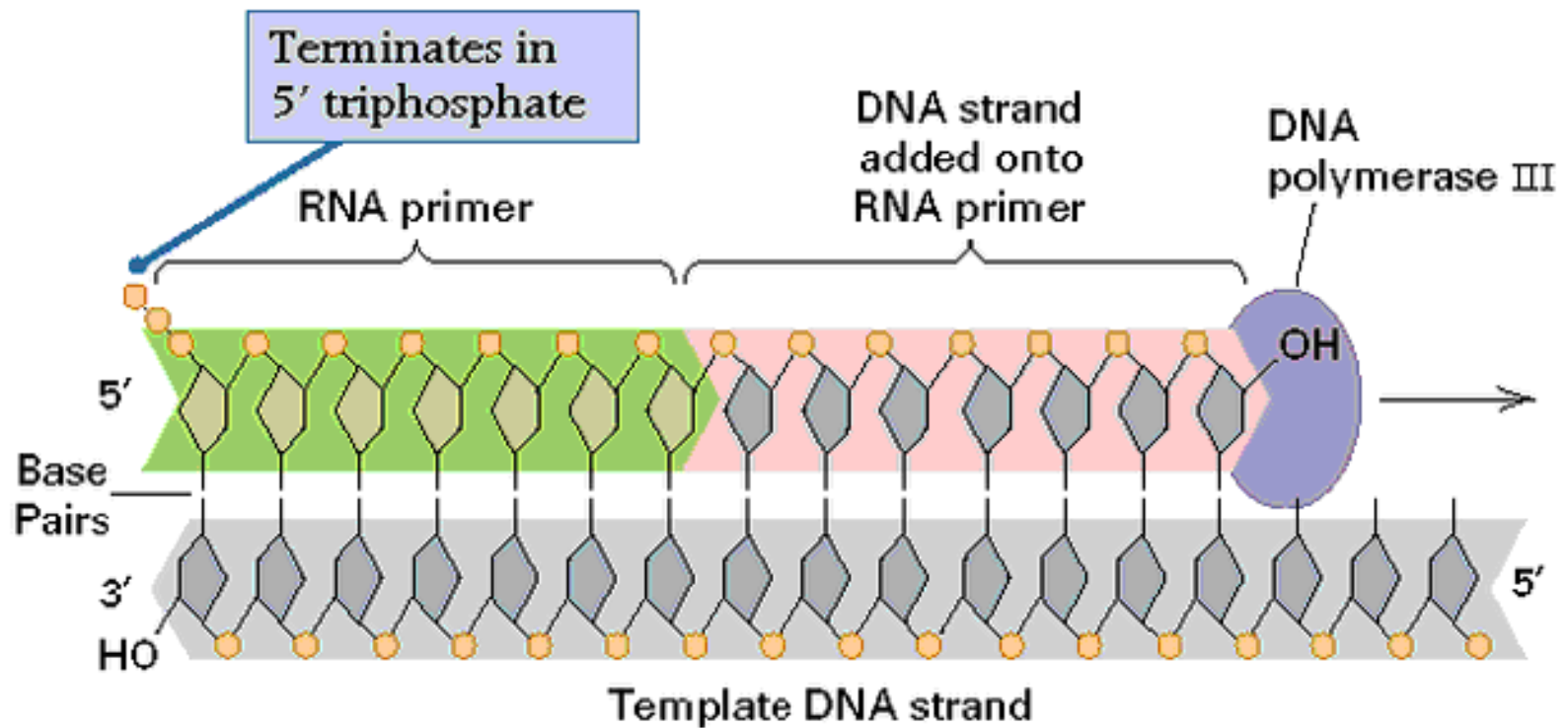
Gli Inneschi ad RNA



Procarioti: il primer (2-5 nucleotidi) ad RNA è sintetizzato dalla **Primasi**

Eucarioti: il primer ad RNA è di 12 nt seguito da un oligo a DNA per un totale di 35 nt prodotto dalla polimerasi alfa nel **primosoma**

Procarioti: polimerasi di allungamento è la DNA polimerasi III



Eucarioti: l'allungamento della catena è determinato dal complesso della DNA Polimerasi delta

DNA polimerasi III e DNA polimerasi delta hanno attività esonucleasica 3'→5' necessaria per la correzione delle bozze.

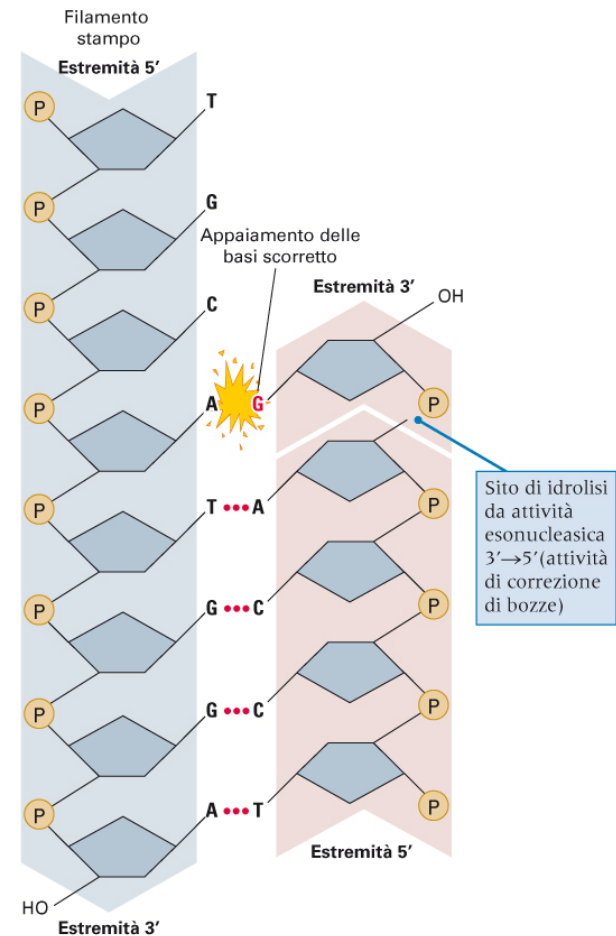
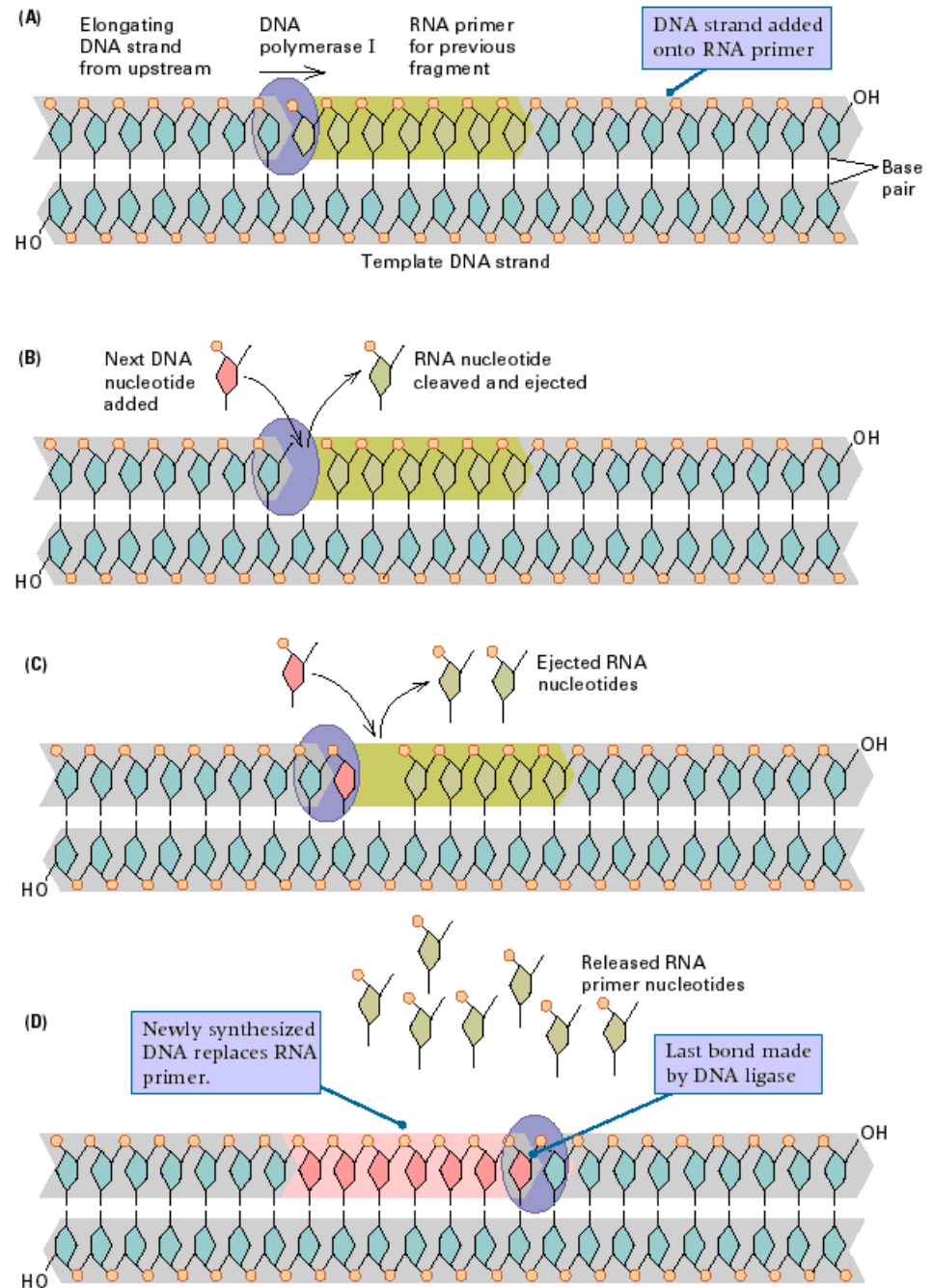


FIGURA 6.19 L'attività esonucleasica 3'→5' della funzione di correzione delle bozze. La catena crescente rilascia un nucleotide che contiene una G che non si appaia correttamente con la A presente nel filamento stampo.

Procarioni
la DNA Polimerasi I
ha attività
esonucleasica 5'/3'



Eucarioti: è la proteina RPA ad eliminare gli inneschi

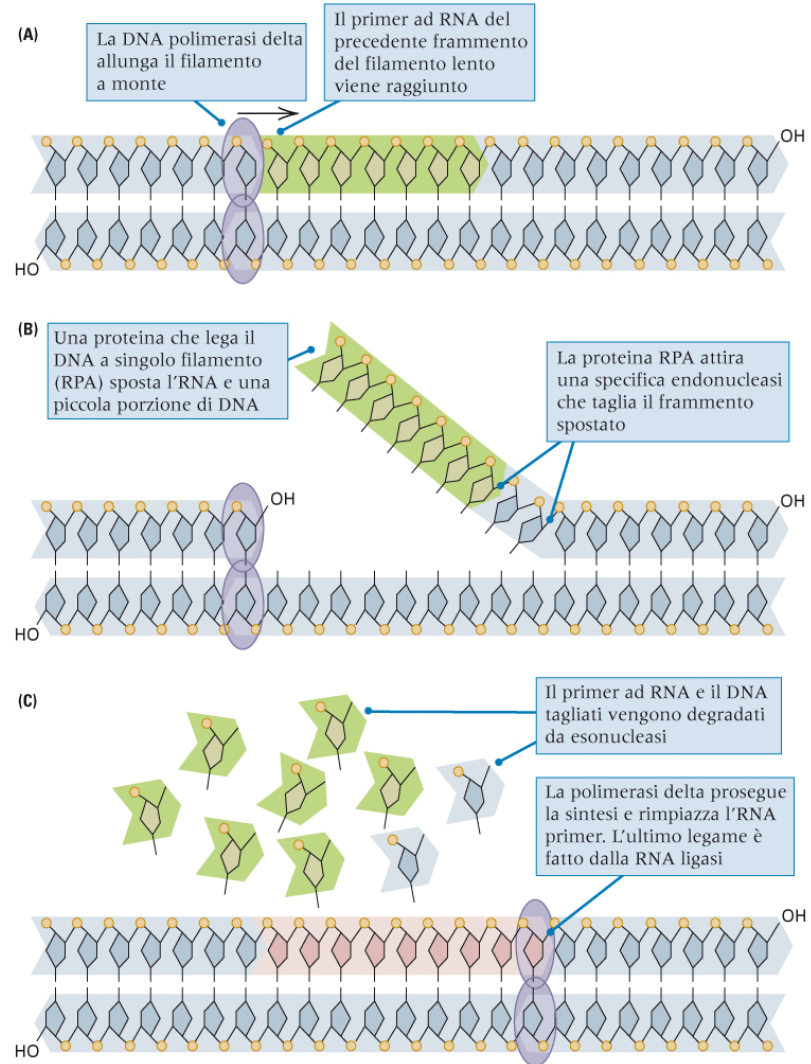


FIGURA 6.22 Sequenza delle fasi di eliminazione dell'RNA primer e della giunzione dei frammenti precursori adiacenti negli eucarioti.

La replicazione del DNA: DNA polimerasi

Sia le cellule procariotiche che eucariotiche contengono parecchie DNA polimerasi diverse che hanno ruoli distinti nella replicazione e nella riparazione del DNA

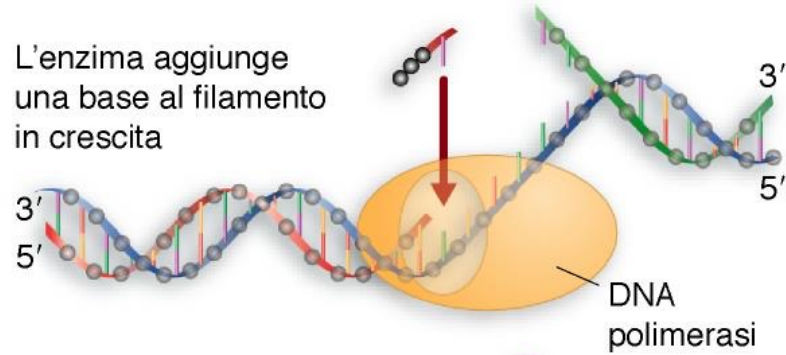
ATTIVITÀ DELLE DNA POLIMERASI	PROCARIOTI	EUCARIOTI
DNA polimerasi principale (sia filamento lento che guida)	La DNA-pol III	La DNA-pol δ
L'esonucleasi che rimuove gli inneschi ad RNA	La DNA-pol I	Esonucleasi indipendenti dalle polimerasi
La polimerasi riparativa che sostituisce l'innesco a RNA con DNA	La DNA-pol I	La DNA-pol δ
Si trova in un complesso con la primasi e con essa sintetizza i primer		

DNA polimerasi e correzione delle bozze

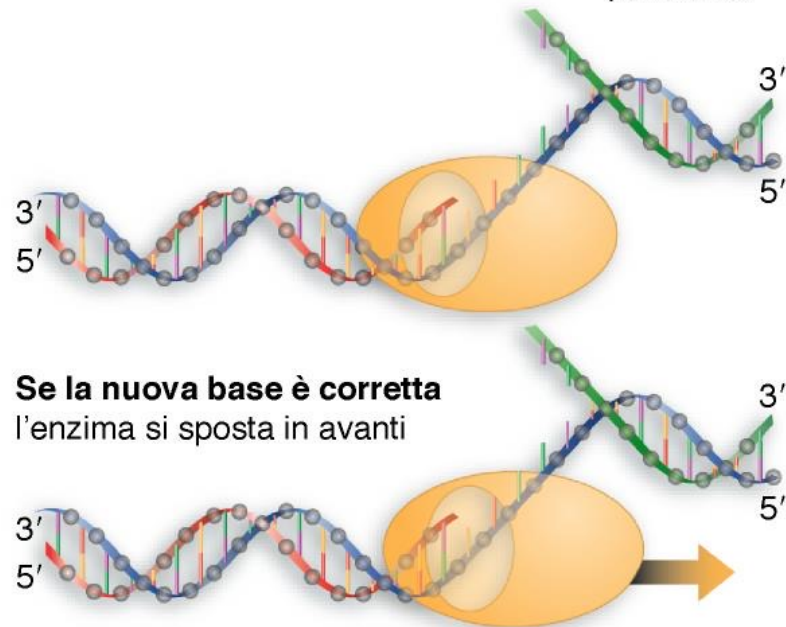
<i>Enzima</i>	<i>subunità</i>	<i>Frequenza di errori</i>	
		<i>senza proofreading</i>	<i>con proofreading</i>
E.coli DNA Pol I	singola	10^{-5}	5×10^{-7}
E.coli DNA Pol III	multiple	7×10^{-6}	5×10^{-9}
T4 DNA Pol	singola	5×10^{-5}	10^{-7}
T7 DNA Pol	singola	10^{-5}	10^{-6}
Trascrittasi Inversa	singola	10^{-5}	--

Le DNA polimerasi hanno attività esonucleasica

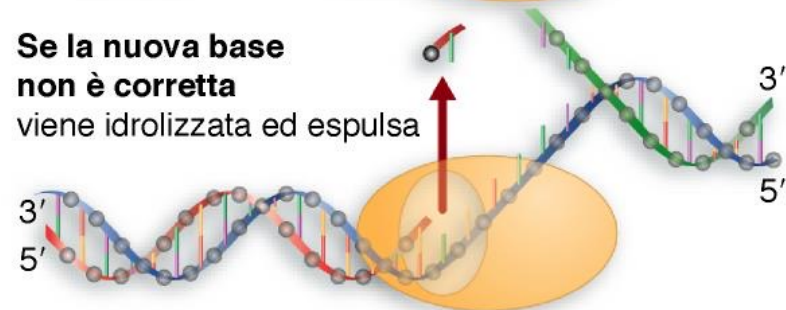
L'enzima aggiunge una base al filamento in crescita



Se la nuova base è corretta
l'enzima si sposta in avanti



Se la nuova base non è corretta
viene idrolizzata ed espulsa



La sintesi del DNA

