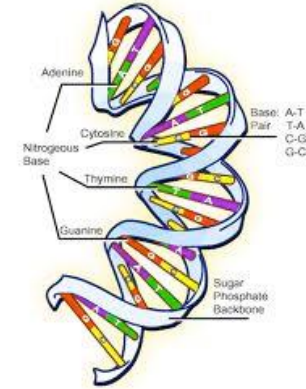
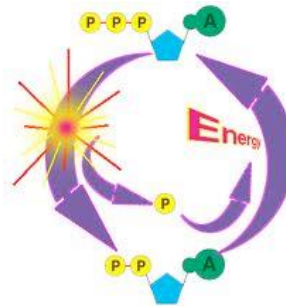


Le funzioni degli acidi nucleici sono conseguenza della loro struttura

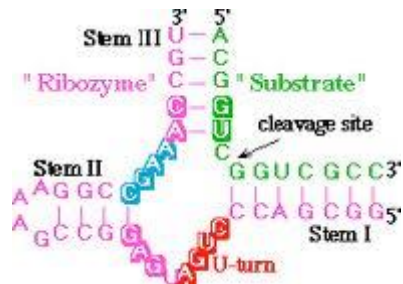
1. Informazione genetica.



2. Trasporto di energia.



3. Attività enzimatica (ribozimi).



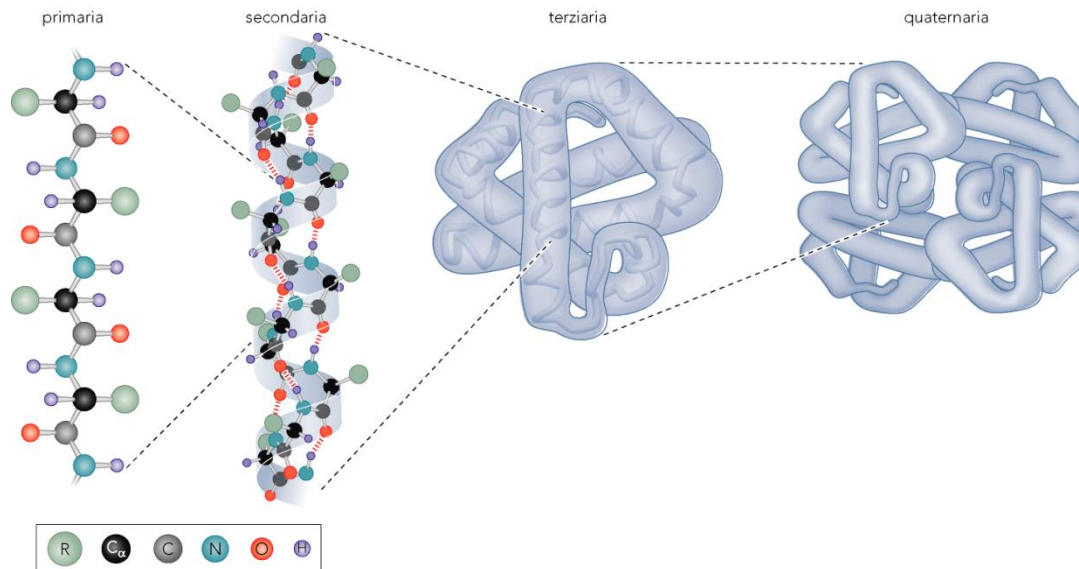
LE STRUTTURE

La **successione** dei diversi tipi di **monomeri** (residui nucleotidici negli acidi nucleici e residui amminoacidici nelle proteine) lungo la catena ne definisce la **Struttura primaria**.

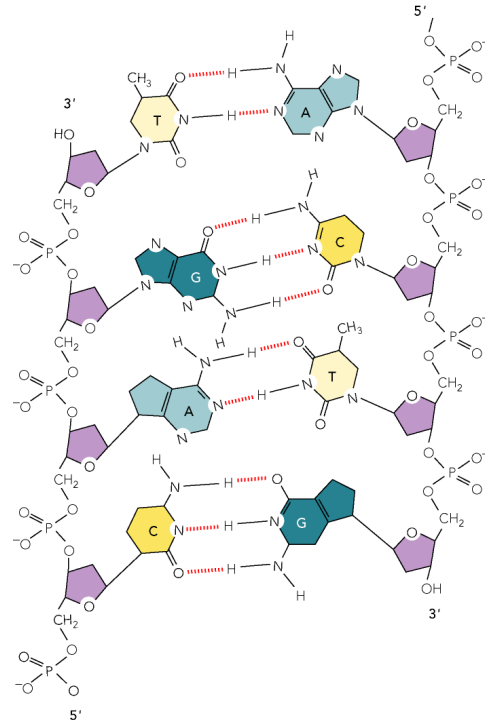
Molti dei legami singoli covalenti presenti nel biopolimero consentono una maggiore o minore libertà di rotazione, che richiede energie modeste, non molto più alte di quella termica. E' questo il presupposto per cui i monomeri possono assumere spesso più di una “**conformazione**”. Quando **tutte le unità** monomeriche in una catena o in un segmento di catena assumono una **stessa conformazione** si genera una **Struttura secondaria**, cioè una struttura che si ripete con regolarità nello spazio.

Qualora segmenti diversi di uno stesso biopolimero assumono strutture secondarie intervallate da conformazioni irregolari e si orientano in modo definito tra loro tramite ulteriori interazioni si genera una **Struttura terziaria**.

Quando più molecole a struttura terziaria formano tra loro complessi stabili si genera una **Struttura quaternaria**.



Strutture del DNA



Gli acidi nucleici, come le proteine, sono essenzialmente costituiti dalla successione di unità monomeriche covalentemente legate in una catena non ramificata, e come tali sono biosintetizzati.

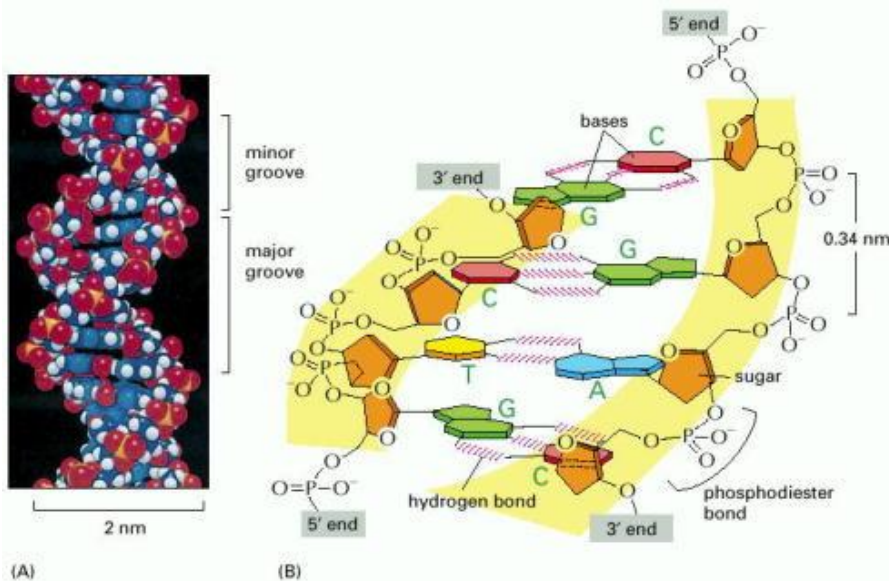
Struttura primaria degli acidi nucleici

- Come per le proteine, gli acidi nucleici hanno una **struttura primaria**, costituita dalla **sequenza di basi** e una **direzionalità** che presenta un' estremità 5' fosfato libera da un lato ed una 3'-OH libera dall'altro.

• I legami fosfodiesterici conferiscono una polarità definita alla catena del DNA. Per convenzione le sequenze di DNA vengono scritte e lette sempre a partire dalla terminazione 5' (da sinistra) verso la terminazione 3' (a destra), generalmente con un fosfato al 5' e un ossidrile al 3'

Struttura secondaria DNA

- La struttura secondaria del DNA è la ben conosciuta doppia elica.

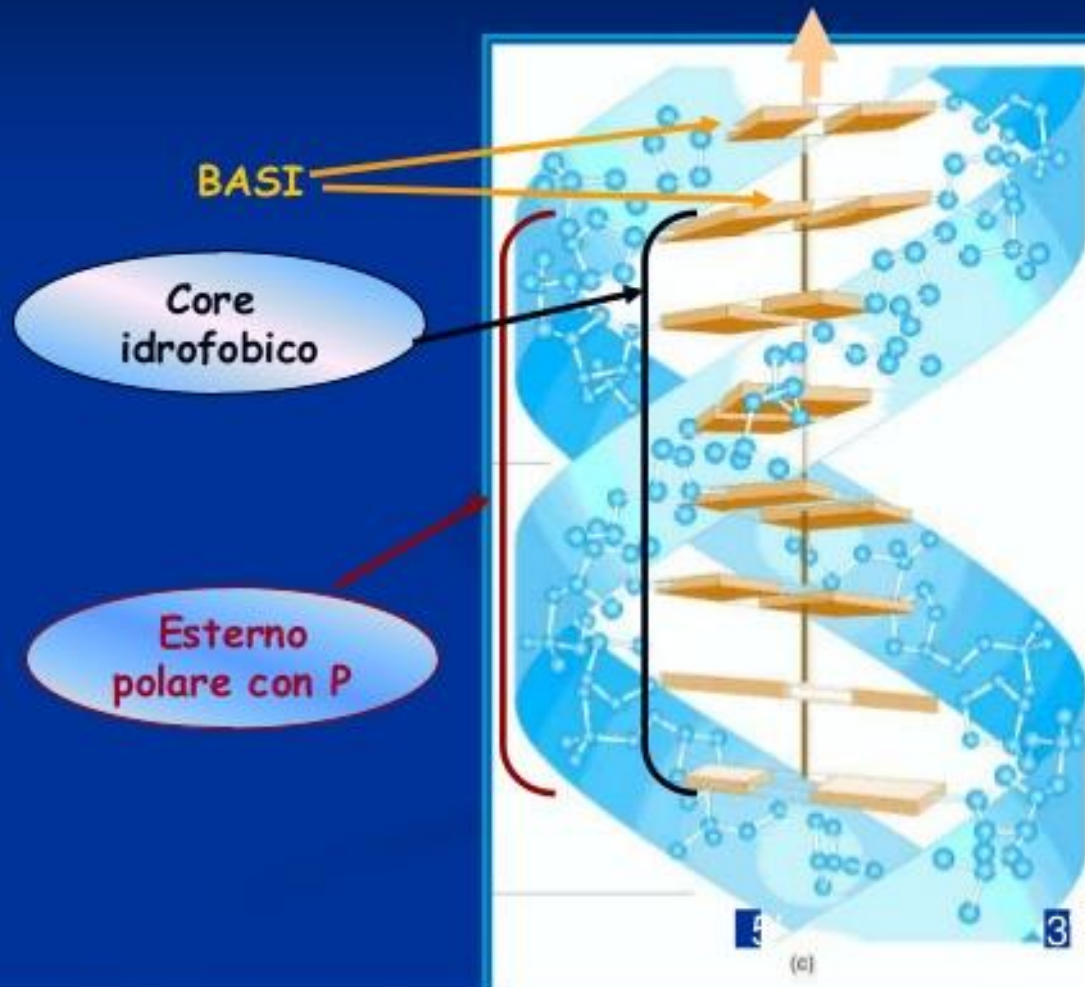


E' data dall'avvolgimento tra loro di due catene polinucleotidiche antiparallele collegate da legami idrogeno tra basi complementari (A:T e C:G).
I legami H e le forze idrofobiche di stacking dovute all'impilamento delle basi disposte sostanzialmente piatte una sull'altra conferisce la forte stabilità alla doppia elica.

Stabilità della doppia elica

Associazione idrofobica tra le coppie di basi

All'interno della molecola le basi apolari, si impaccano così fortemente in senso ortogonale all'asse dell'elica e parallelamente l'una all'altra sullo stesso filamento in modo da escludere l'acqua e formare un ambiente stabile apolare (*core idrofobico*)

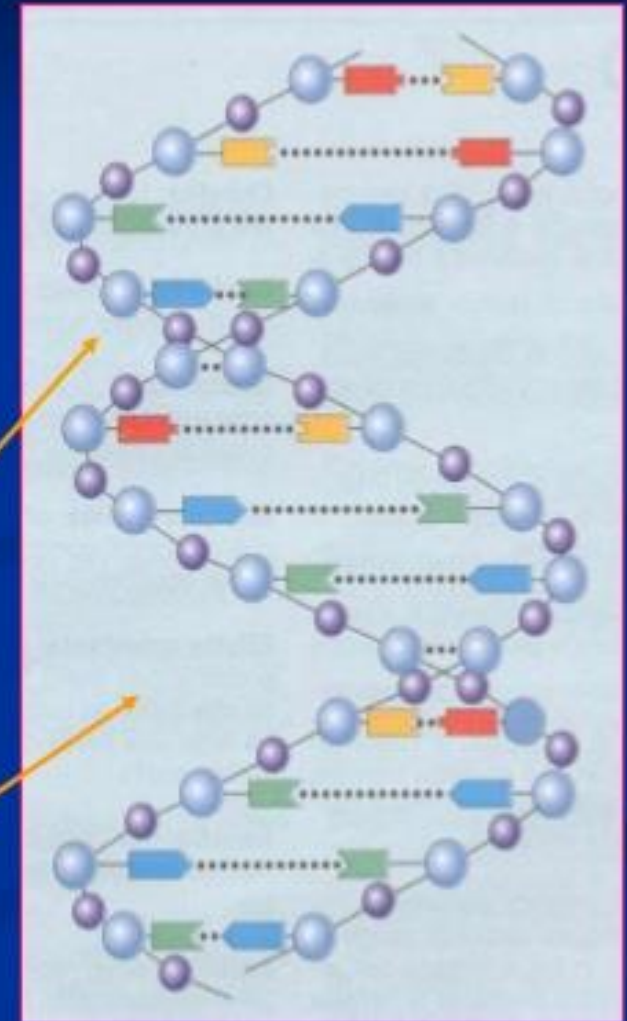


La doppia elica è asimmetrica rispetto all'asse

Le diverse dimensioni delle basi fanno sì che i due filamenti non siano equidistanti dall'asse dell'elica, generando solchi di dimensioni diverse (maggiore e minore)

Solco minore

Solco maggiore



Caratteristiche principali della doppia elica di DNA

- Lo scheletro di ciascun'elica è composto dai residui di deossiribosio uniti mediante legami fosfodiesterici covalenti in posizione 5' e 3' sull'anello dello zucchero.
- I due filamenti (eliche) del DNA sono uniti all'interno della struttura da legami idrogeno che occorrono tra le basi puriniche di una catena e le basi pirimidiniche dell'altra(le basi puriniche e pirimidiniche si trovano all'interno mentre i gruppi fosforici e gli zuccheri sono all'esterno).
- Il piano delle basi è perpendicolare all'asse dell'elica e il piano degli zuccheri forma un angolo quasi retto con quello delle basi.
- L'adenina è sempre accoppiata alla timina e la guanina è sempre accoppiata alla citosina, in base a fattori sterici e di formazione dei legami idrogeno.
- La sequenza precisa delle basi porta l'informazione genetica.
- Le estremità di ciascun filamento di DNA sono chiamate 5'e 3'. Per convenzione, con il 5'si indica la sequenza più vicina all'inizio del gene, con il 3' si indica la sequenza più vicina alla fine del gene.
- I due scheletri corrono in direzioni opposte, sono antiparalleli.
- Il diametro dell'elica è di 20 °A, le basi adiacenti sono separate da 3,4°A lungo l'asse dell'elica e formano tra loro un angolo di 36°.
- La struttura dell'elica si ripete ogni 10 residui di ciascuna catena con intervalli di 34°A.
- Una catena di DNA può ruotare intorno a **6 legami per monomero** (il legame glicosidico tra la base e lo zucchero , il legame C4'- C5' dello zucchero e quattro legami nel ponte fosfodiesterico che unisce il C3' di uno zucchero e il C5' di quello successivo). Il ripiegamento e il diverso orientamento dell'anello di ribosio sono una importante **caratteristica strutturale**.

Specificità dell'accoppiamento delle basi

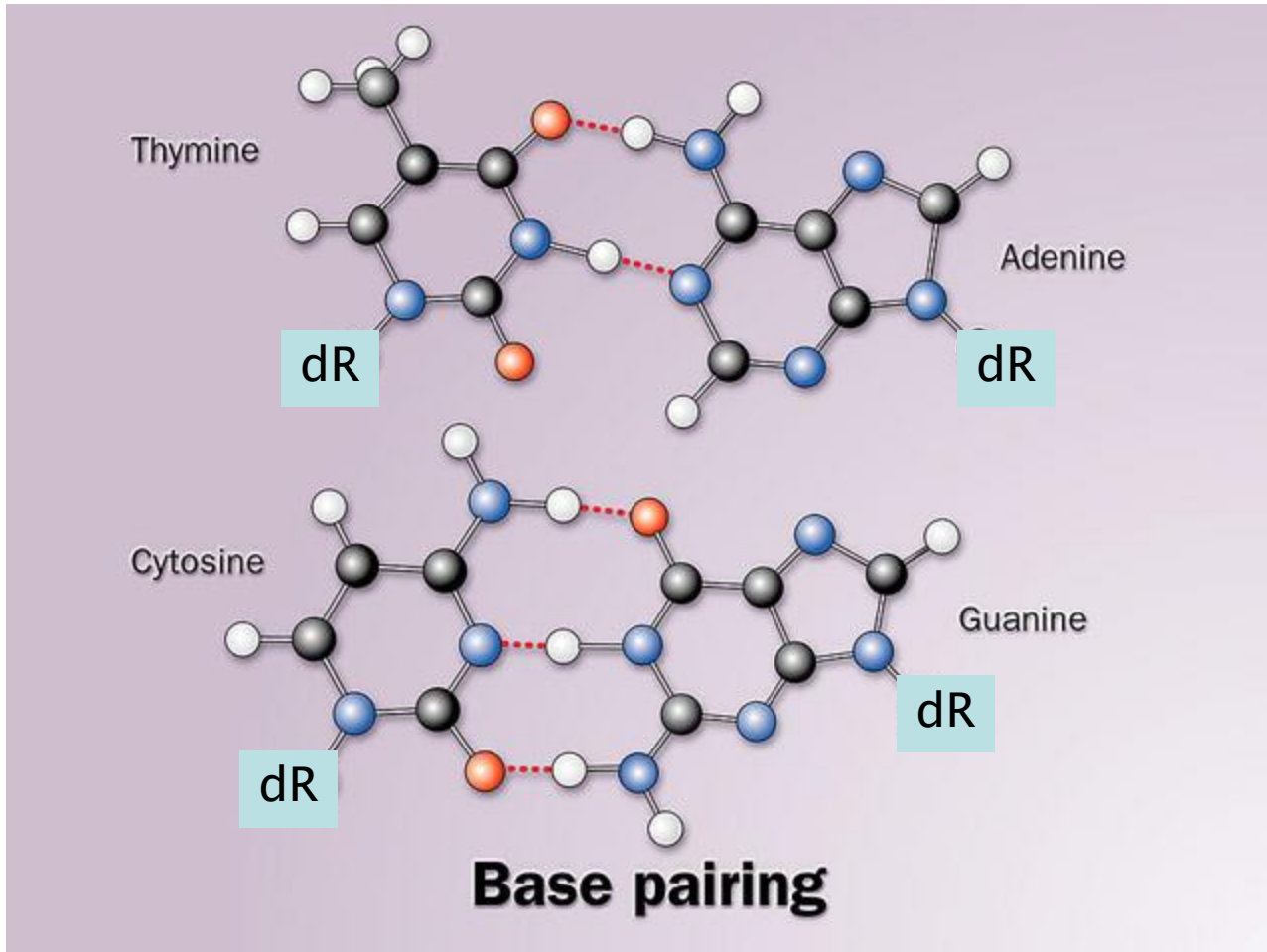
Restrizioni steriche sono imposte dalla natura regolare ad elica dell'ossatura costituita da zuccheri e gruppi fosforici, di ciascuna catena polinucleotidica.

Legami glicosidici di una coppia di basi sono sempre distanti tra loro 10,8°A.

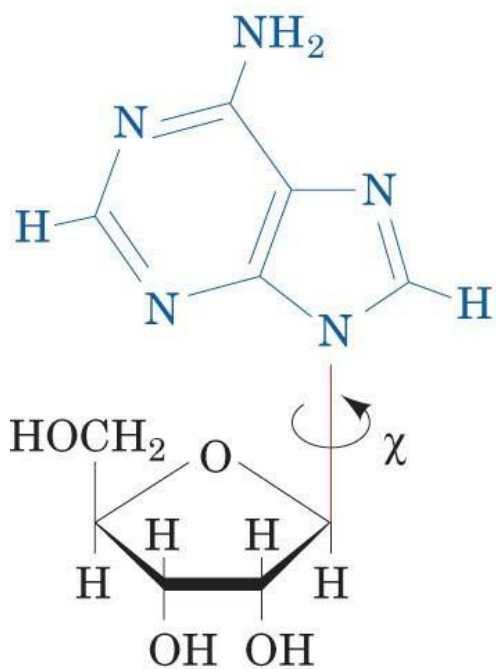
I nucleotidi purinici e pirimidinici possono assumere solo due **conformazioni stabili** rispetto al deossiribosio, chiamate ***sin*** e ***anti***. Le pirimidine sono in genere nella conformazione *anti* a causa di interferenze steriche tra lo zucchero e l'ossigeno carbonilico sul C-2.

Per effetto della risonanza tra gli atomi degli anelli le pirimidine sono planari, le purine sono quasi planari.

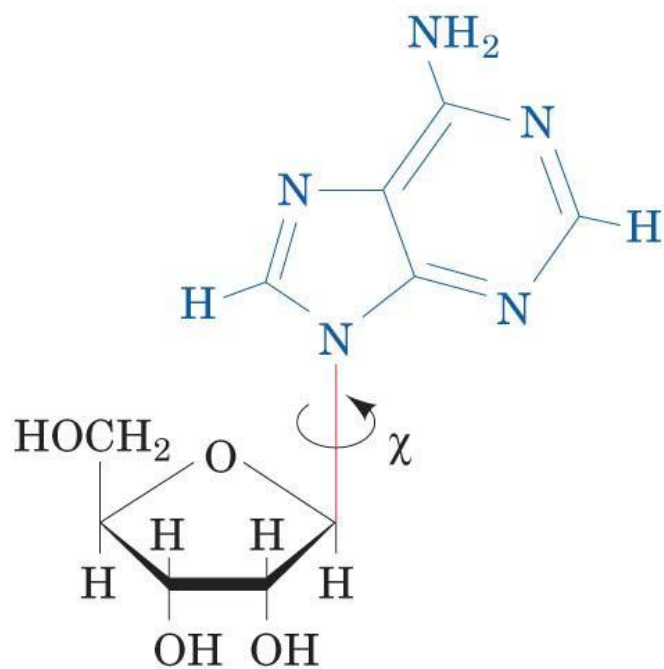
Appaiamenti di Watson e Crick: coppie isomorfe



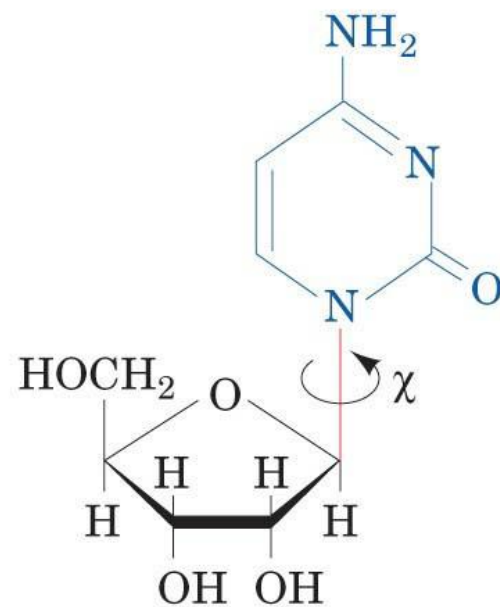
dR = deoxyRibose



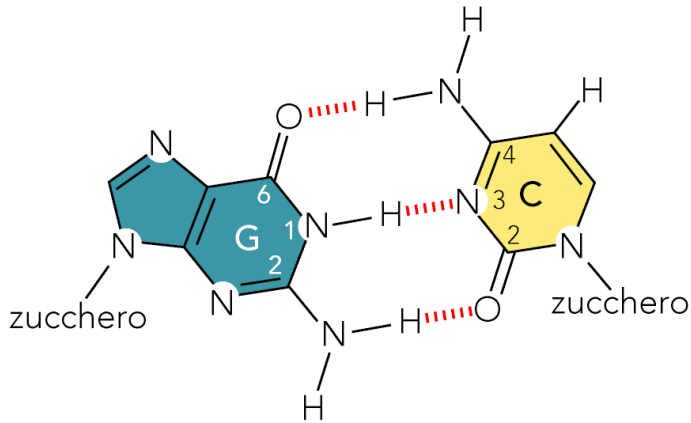
syn-Adenosine



anti-Adenosine



anti-Cytidine



A:T e G:C hanno lo stesso ingombro trasversale

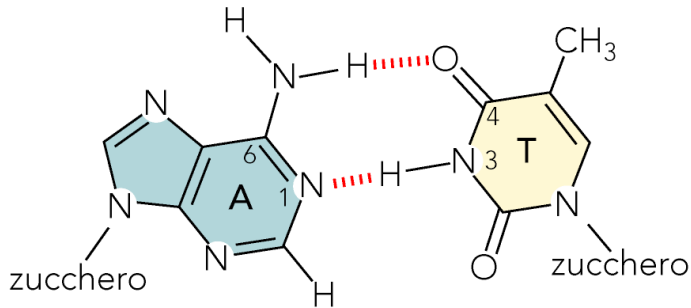
La complementarità tra le basi genera un accoppiamento antiparallelo

L'accoppiamento delle basi è stabilizzato da:

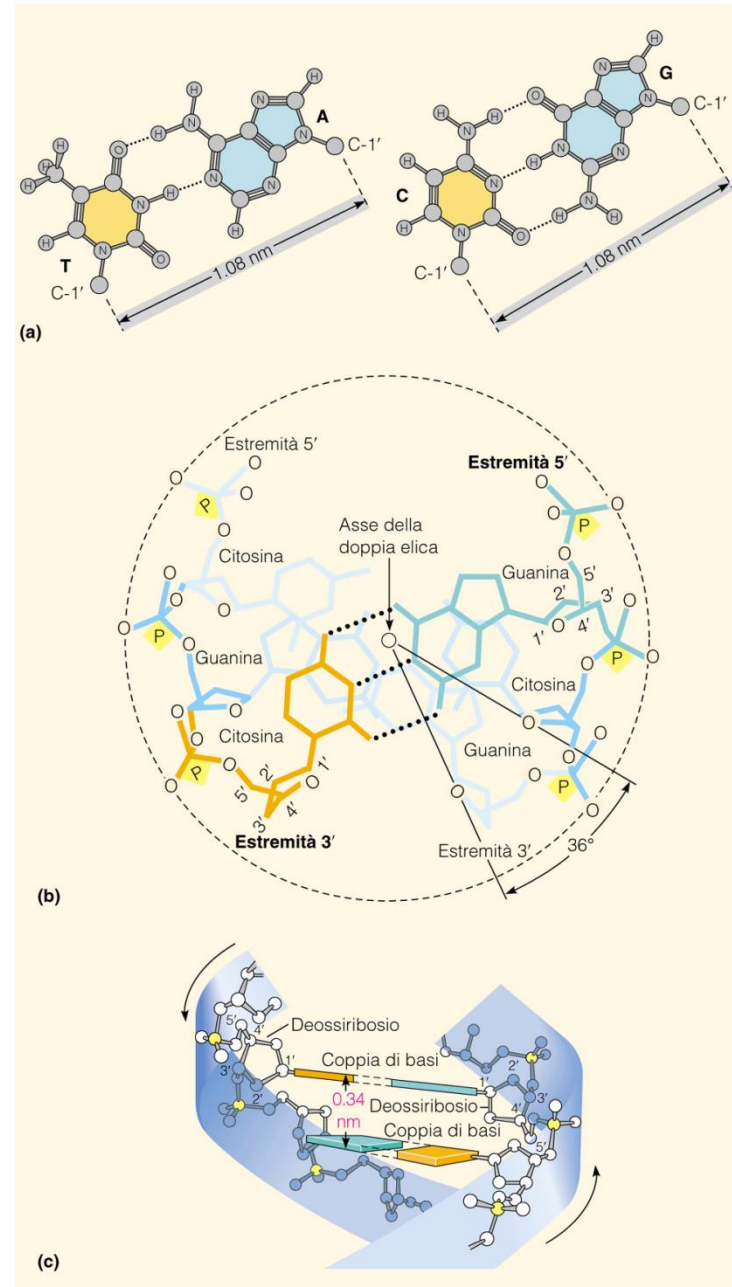
*fattori entropici

*impilamento delle basi (forze di stacking)

* legami H (specificità)

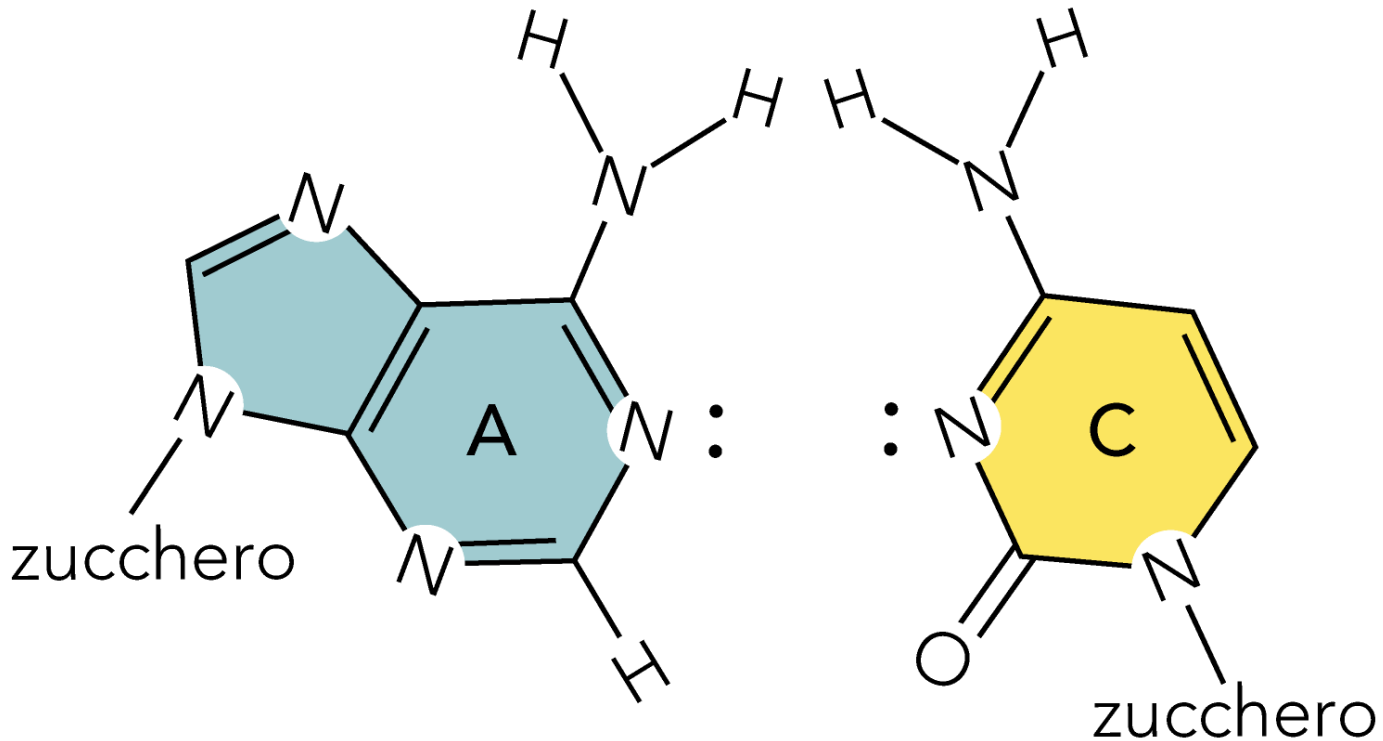


La formazione della doppia elica avviene per accoppiamento tra basi complementari: legame idrogeno e interazioni di “stacking” tra basi aromatiche.



Incompatibilità tra la coppia (esempio)

A:C genera appaiamenti instabili

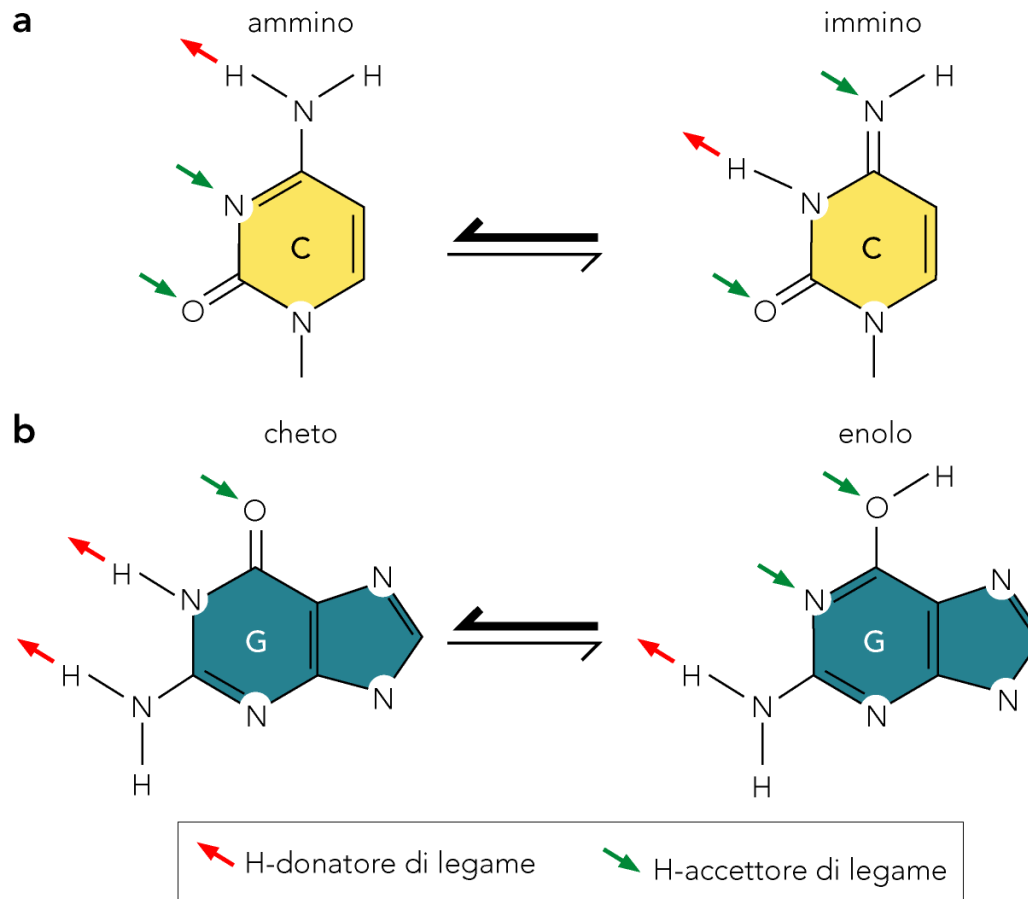


Conformazioni tautomeriche delle basi

a) Equilibrio ammino = immino nella citosina;

b) equilibrio cheto = enolo nella guanina.

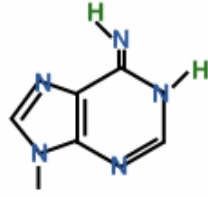
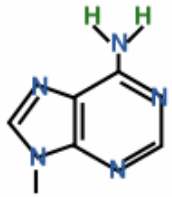
Le forme più stabili amminiche e chetoniche sono quelle prevalenti nella doppia elica.



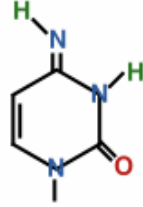
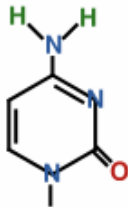
Tautomeric Forms of the Bases

common

rare



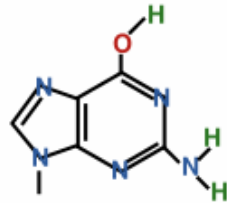
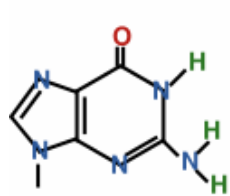
Adenine



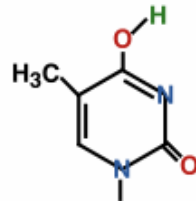
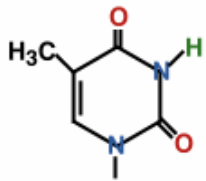
Cytosine

amino form

imino form



Guanine



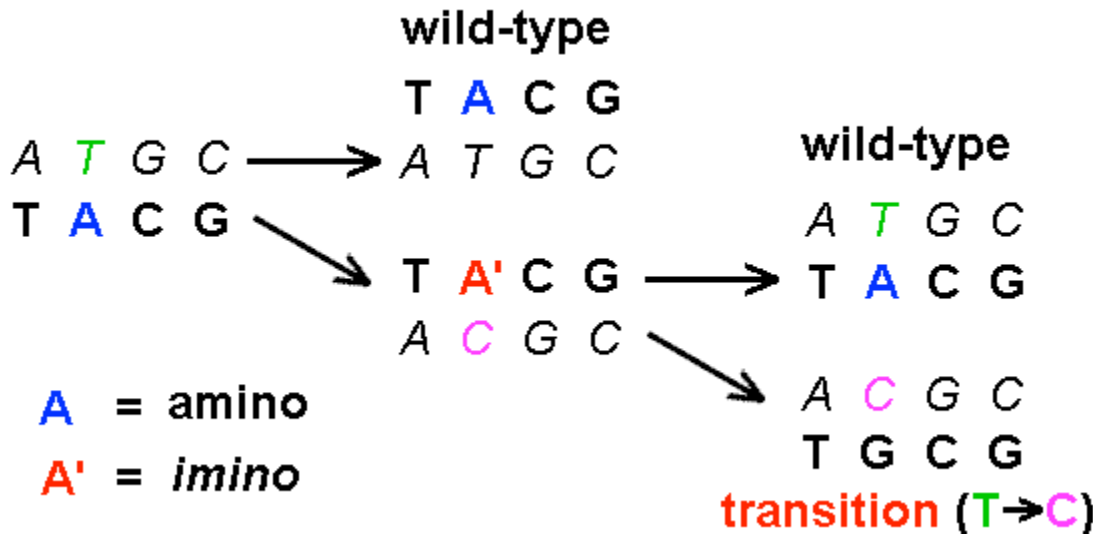
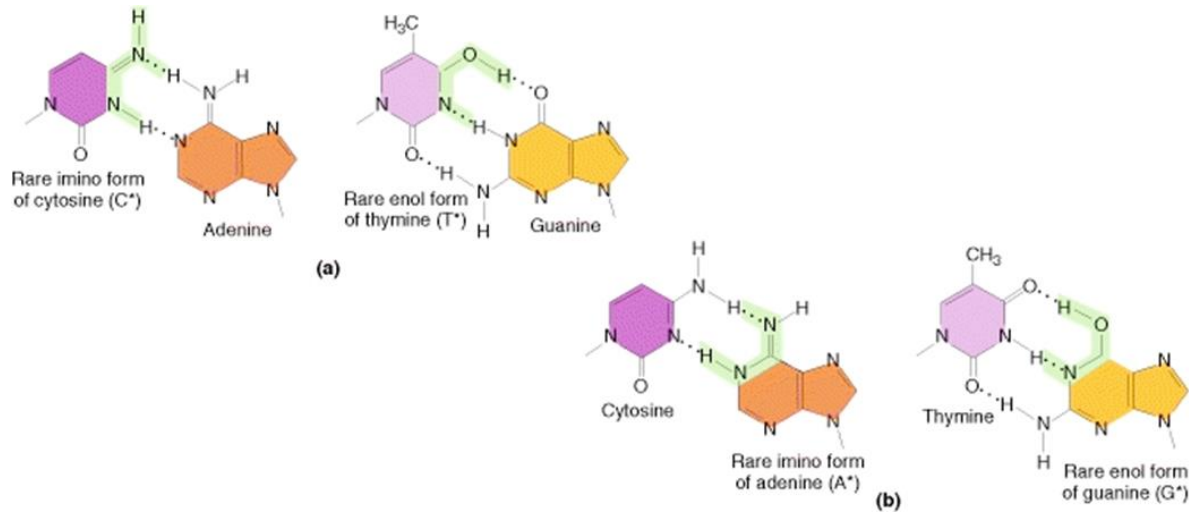
Thymine

keto form

enol form

Le forme più stabili amminiche e chetoniche sono quelle prevalenti nella doppia elica. Tuttavia, la formazione di tautomeri immino-enolo può avvenire e causare errori durante la sintesi del DNA

Appaiamenti non canonici delle forme tautomeriche ed effetti sulla conservazione dell'informazione genetica (mutazioni)



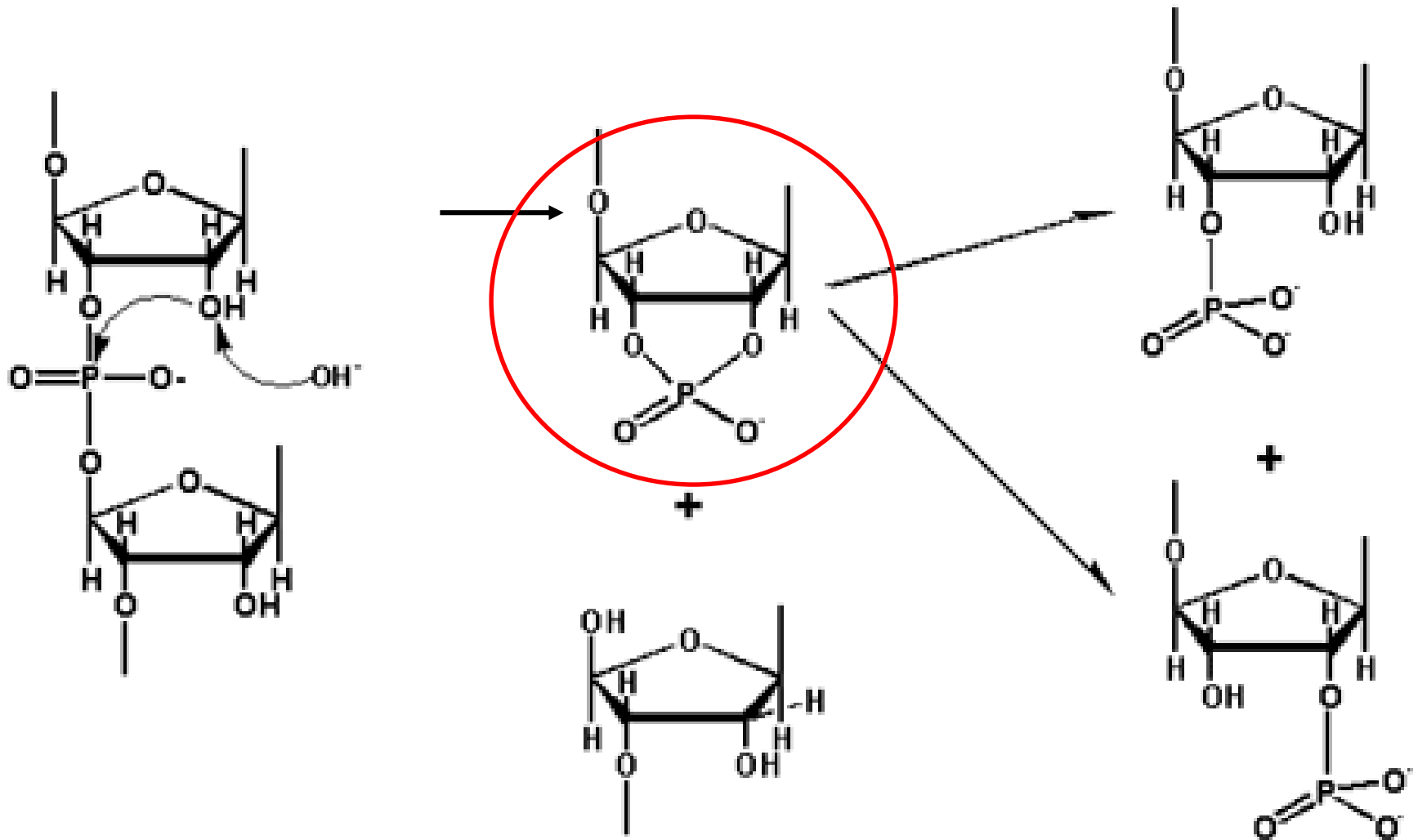
Forme tautomere e proprietà acido-base

Sporadicamente le basi del DNA possono assumere una o più forme alternative tautomere (in cui un atomo di idrogeno risulta spostato in una posizione diversa con riarrangiamento dei doppi legami). **Il fenomeno è raro ma può avvenire anche a pH fisiologico ed essere causa di mutazioni impedendo il normale appaiamento Watson-Crick .**

Alterazioni rilevanti del pH rispetto al valore fisiologico intracellulare (ca. 7) inducono reazioni di protonazione (pH acidi) o deprotonazione (pH basici) delle basi del DNA, con conseguente perdita della normale struttura secondaria a doppia elica.

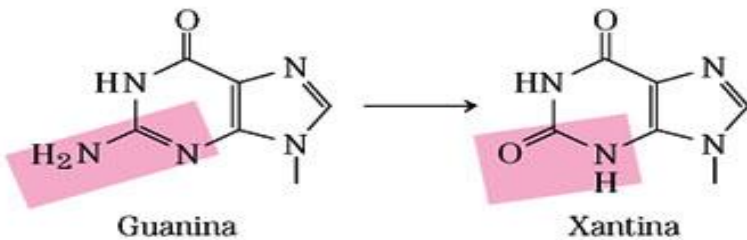
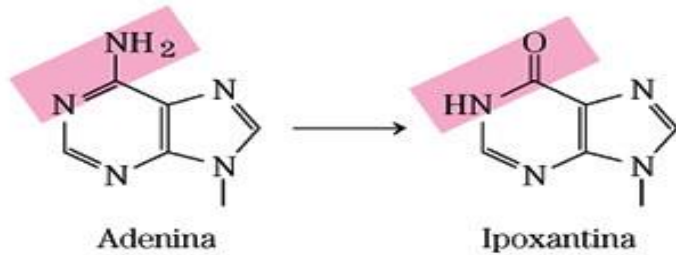
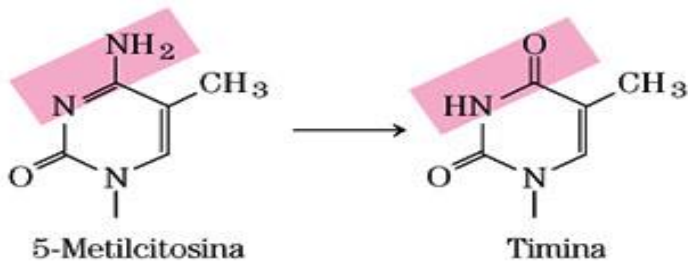
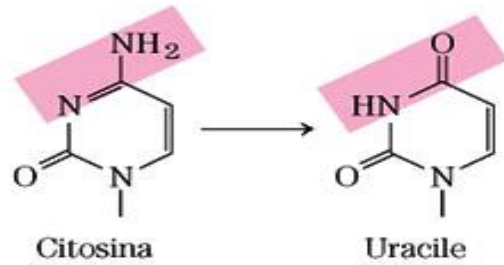
In particolare pH basici (circa 12) vengono normalmente usati in laboratorio per denaturare il DNA in soluzione, provocando la perdita del protone imminico alle T e alle G e quindi dell'appaiamento Watson-Crick. Il ripristino del pH 7 consente la rinaturazione del DNA con cinetiche più o meno veloci a seconda dei casi. Più complessi ma meno rilevanti in pratica sono i fenomeni indotti dall'acidificazione.

Attenzione: Il valore di pH=12 denatura il DNA ma non lo degrada (cioè non idrolizza i legami fosfodiesteri). Per contro tale pH degrada l'RNA, che viene quindi facilmente depolimerizzato. Ciò dipende dalla presenza di un intermedio "facile" nell'idrolisi alcalina dell'RNA, che la struttura del DNA non consente.

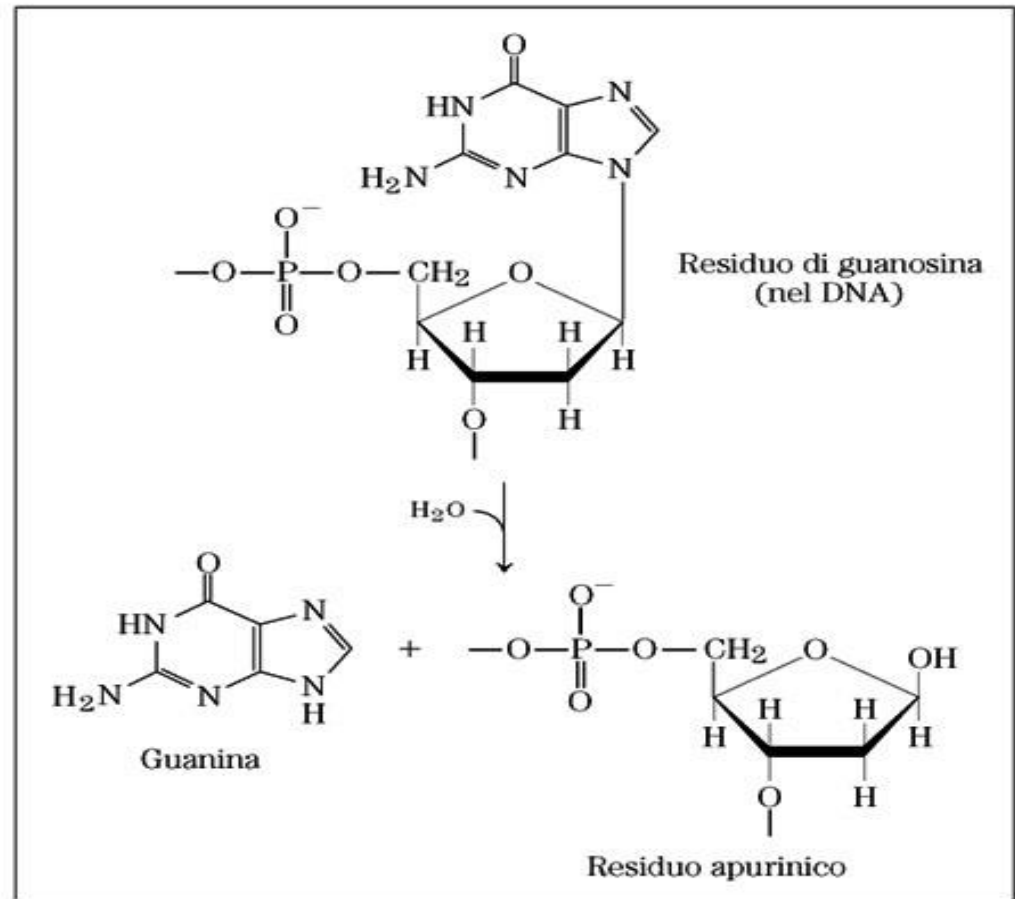


L'idrolisi alcalina dell'RNA è facilitata dalla presenza dell'ossidrile 2' del ribosio, che consente l'intermedio fosfodiesterico ciclico, impossibile nel caso del DNA.

Trasformazioni non enzimatiche dei nucleotidi

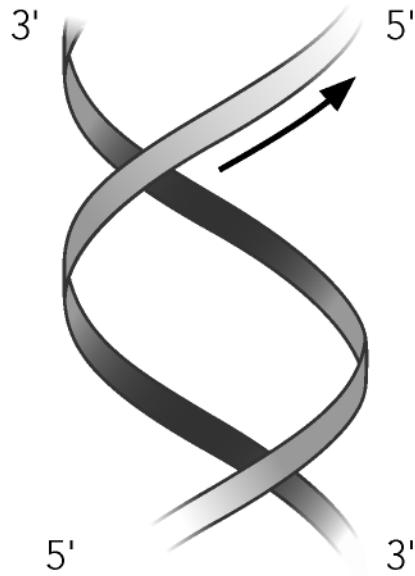
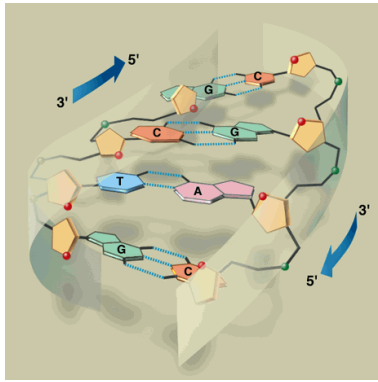


(a) Deamminazione

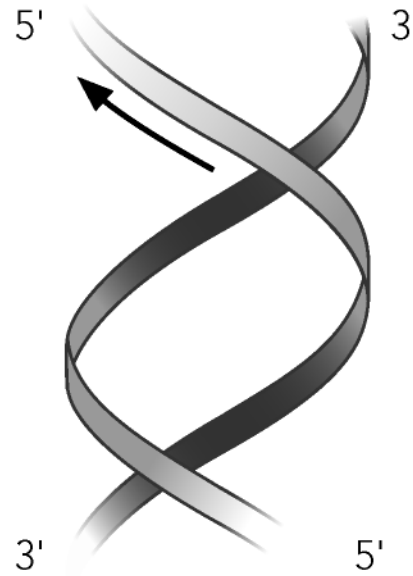


(b) Depurinazione

LE DIVERSE STRUTTURE SECONDARIE DEL DNA



destrogiro



levogiro

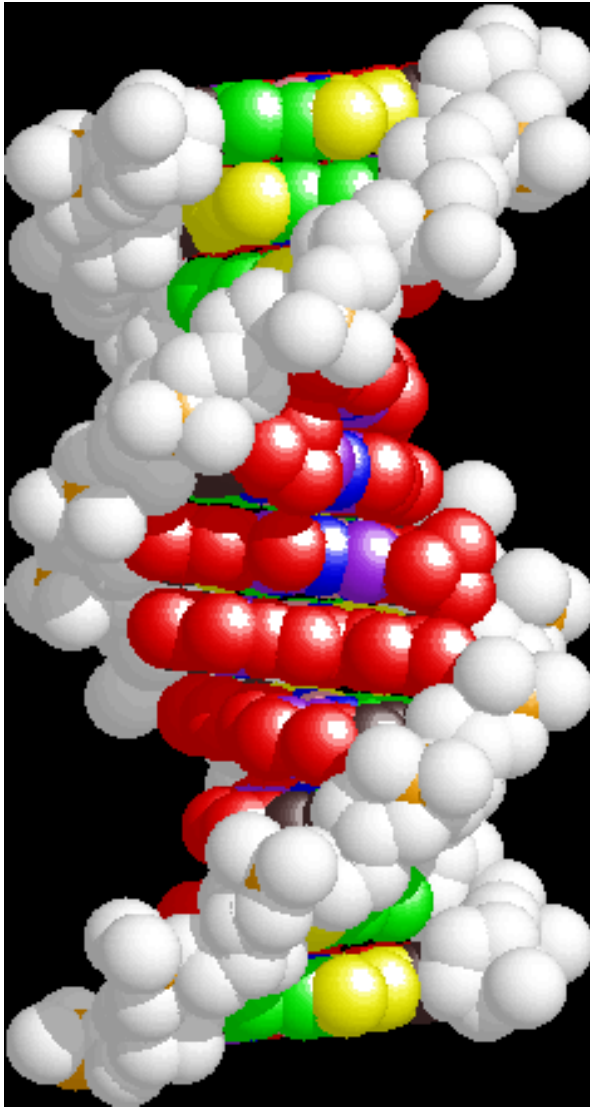


Eliche destrogiro e levogiro

La doppia elica più stabile del DNA è destrogiro

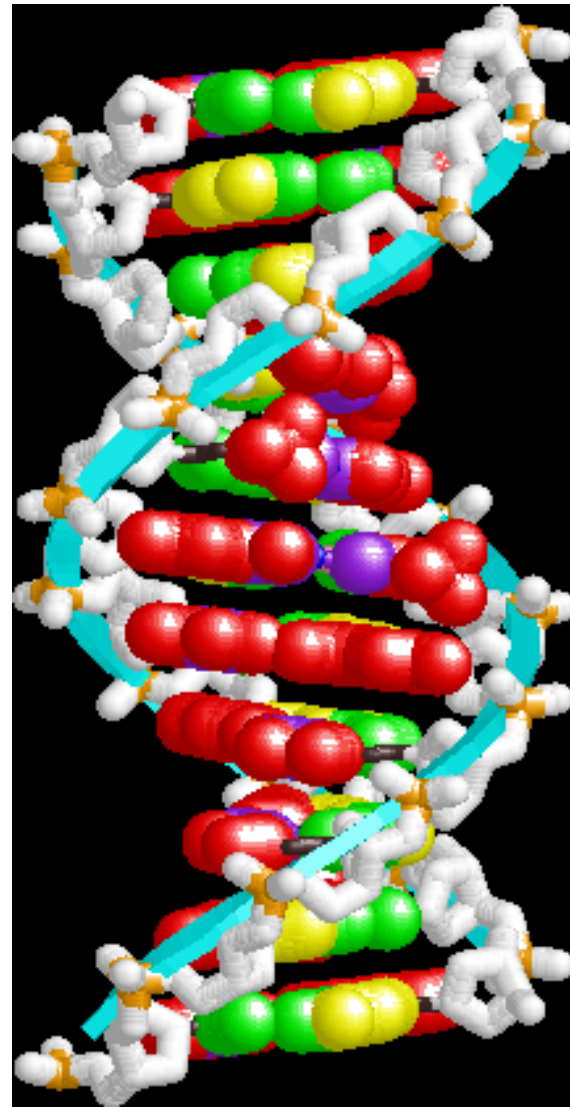
Minor groove

Major groove

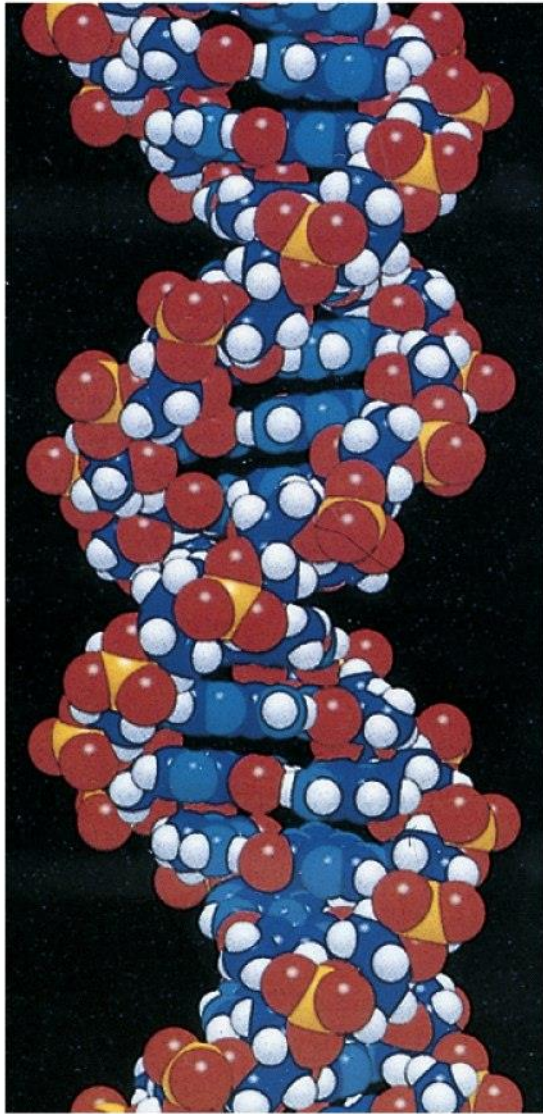


Solco maggiore

Solco minore



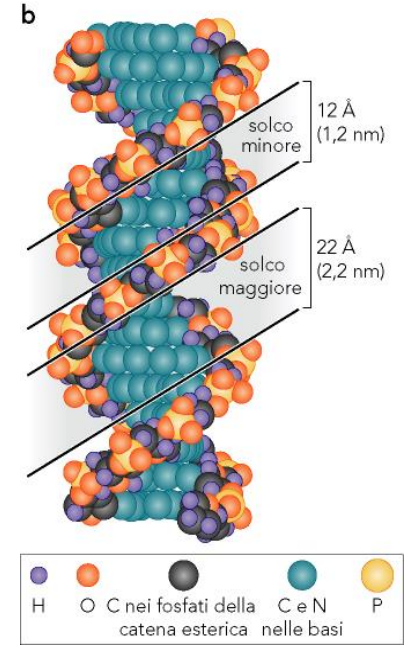
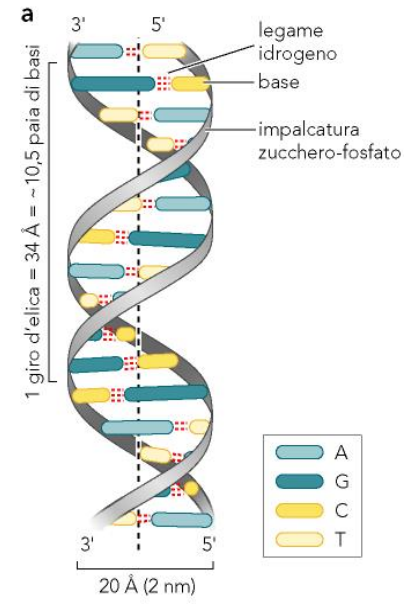
I solchi maggiore e minori sono dovuti all'asimmetria dei ribosi (coppie di basi quasi perpendicolari rispetto all'asse centrale dell'elica)



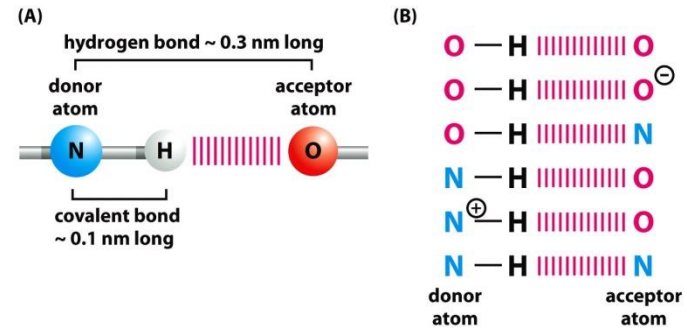
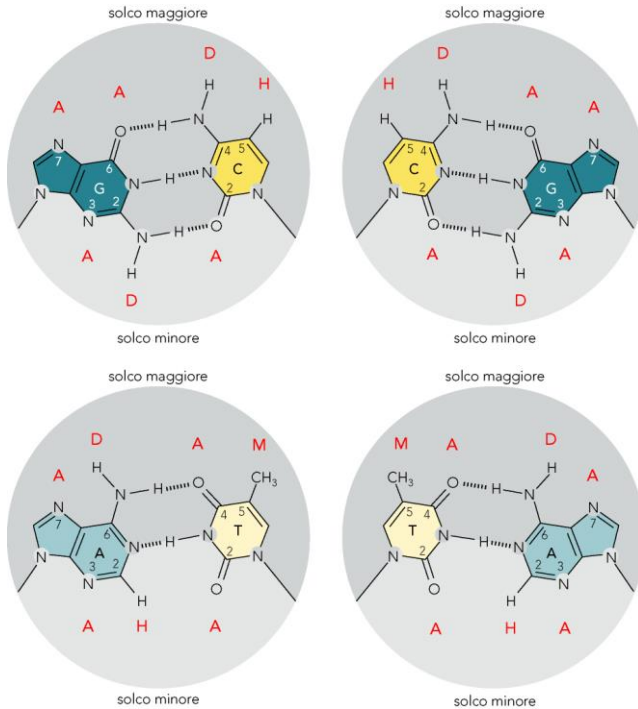
minor groove

major groove

2 nm



I bordi di ciascuna coppia di basi si affacciano nei solchi maggiore e minore creando un sistema di donatori ed accettori di legami H e superfici di van der Waals che permettono di specificare le coppie di basi e permettono l'interazione specifica con proteine



A=accettore legami H
 D=donatore legami H
 H=idrogeni non polari
 M=gruppi metilici

I gruppi chimici delle basi esposti nei due solchi

La formazione di due solchi di dimensioni diverse dipende dalla geometria della coppia di basi: **l'angolo fra i legami glicosidici è 120° da un lato e 240° dall'altro.**

Quello meno ampio genera il solco minore, l'altro il solco maggiore.

I due solchi offrono una diversa informazione chimica per quanto riguarda la capacità di formare legami a H e interazioni idrofobiche, bersaglio delle proteine.

Il solco maggiore ha molti più atomi che possono essere donatori o accettori di legami H e quindi il linguaggio di questo solco è molto più vario e ricco. Di conseguenza è nel solco maggiore che si legano i domini ad α -elica delle proteine

SOLCO MAGGIORE

A:T **ADAM**, T:A **MADA**
G:C **AADH**, C:G **HDAA**

SOLCO MINORE

A:T **AHA**, G:C **ADA**

A differenza dei legami peptidici delle proteine che sono planari, i legami fosfodiesteri negli acidi nucleici possono assumere una grande varietà di conformazioni, definite dagli angoli torsionali α , β , e γ . Ulteriore complessità deriva dalle possibili conformazioni degli anelli dello zucchero. Nel DNA l'atomo C2' è endo rispetto a C5'

Inoltre, le basi possono assumere conformazioni syn e anti rispetto al legame glicosidico. Infatti, le nucleobasi possono adottare conformazioni syn (dalla stessa parte) o anti (parte opposta) rispetto al ribosio.

Queste piccole differenze hanno molta importanza nel definire la struttura secondaria e terziaria dell'acido nucleico.

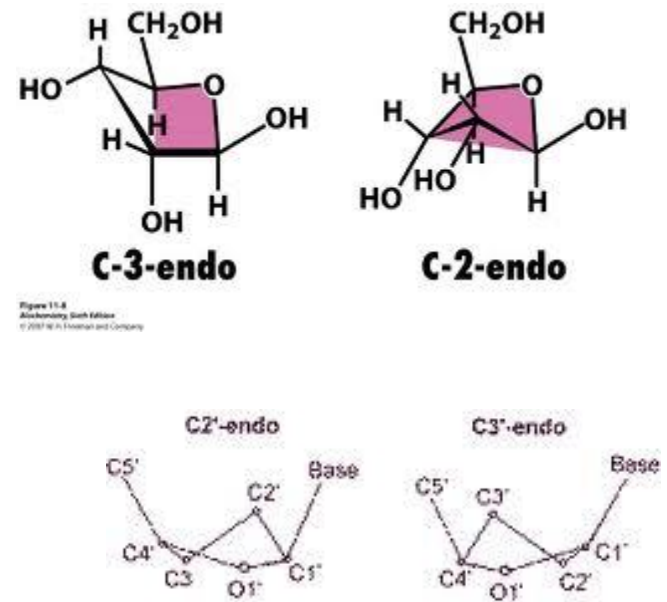
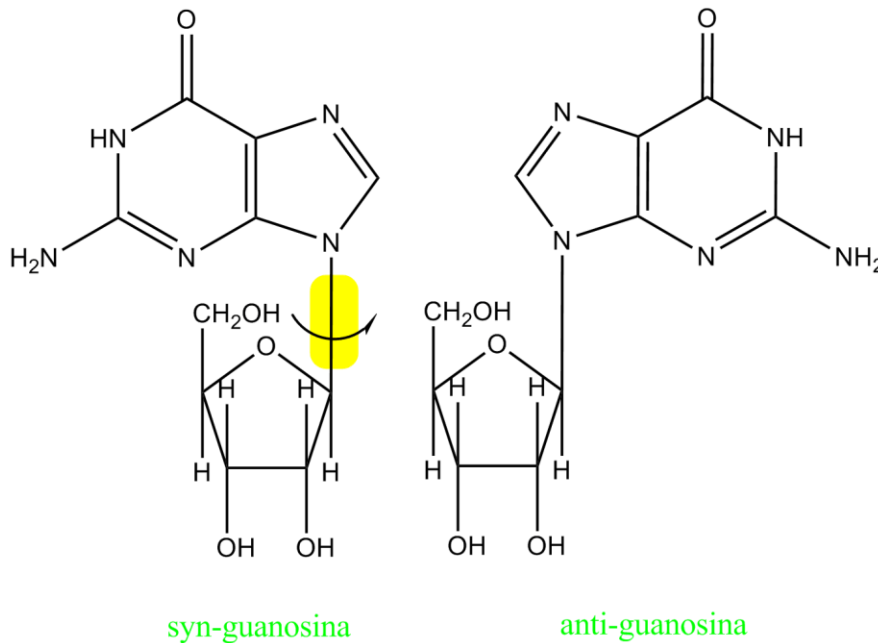
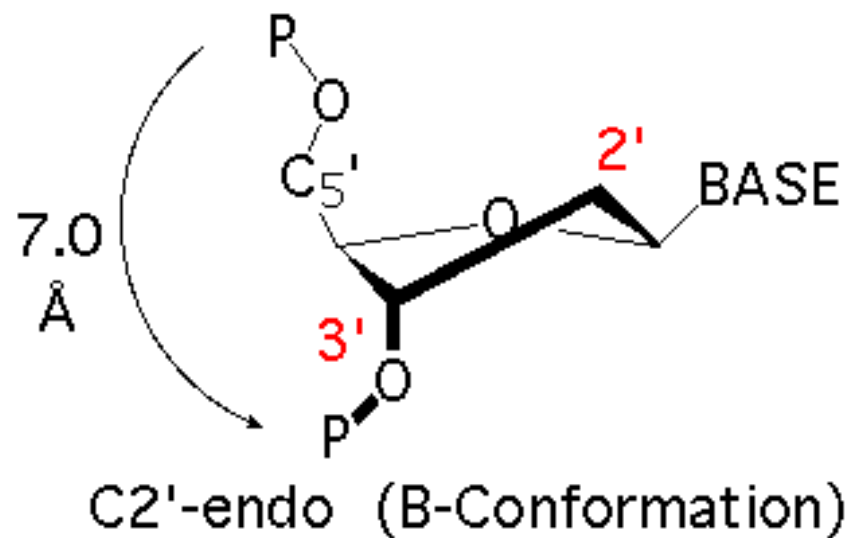
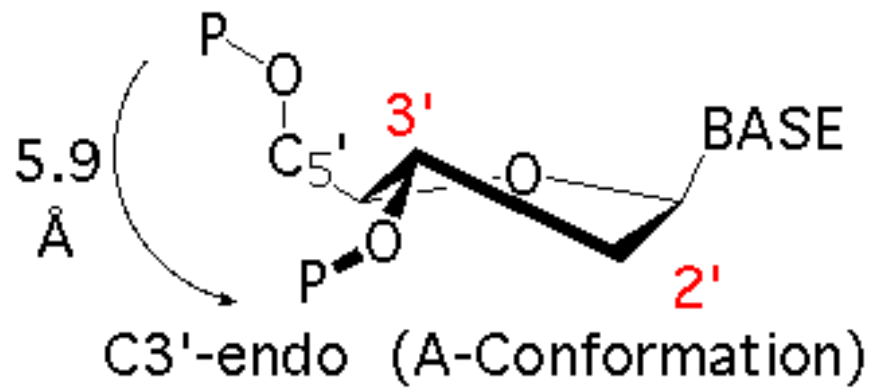


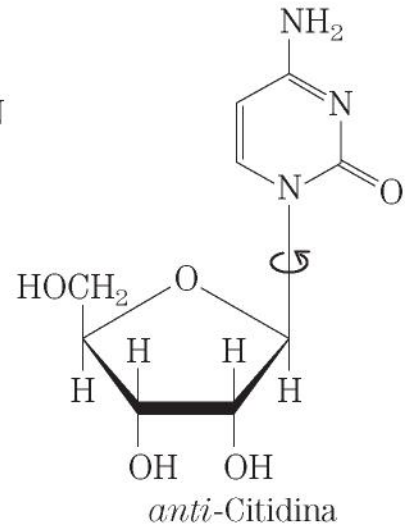
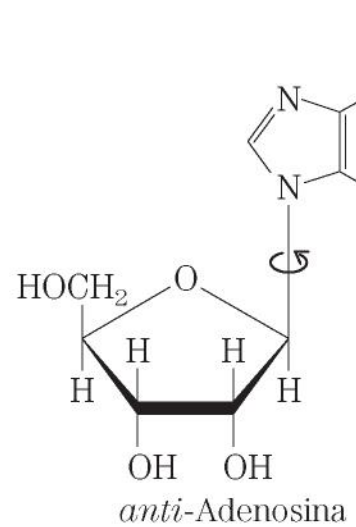
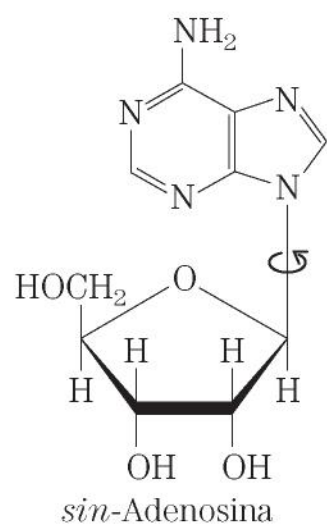
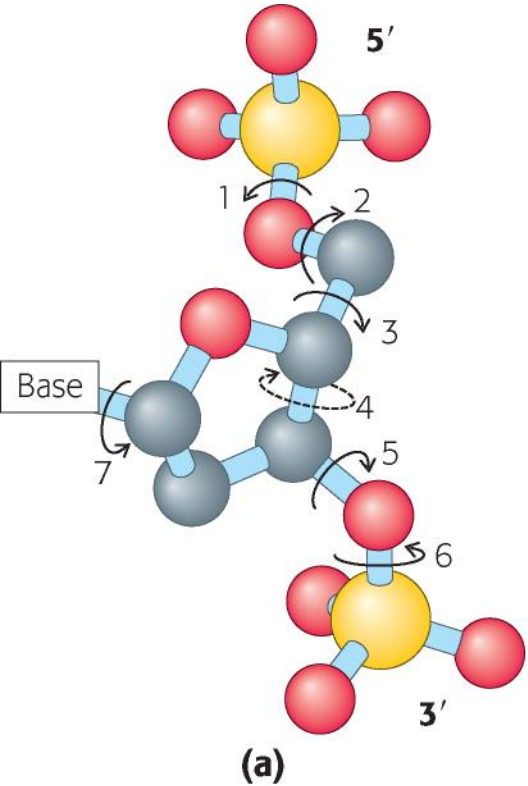
Figure 11-8
Biochemistry Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company



Principali conformazioni degli zuccheri furanosidici

Flessibilità dello scheletro zucchero-fosfato

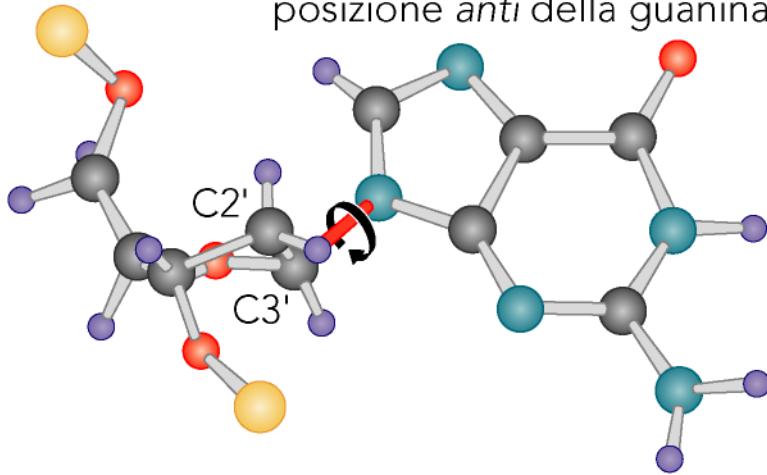
E' grazie alle rotazioni attorno ai legami covalenti semplici dello scheletro che gli acidi nucleici possono assumere diverse conformazioni. Queste dipendono da 3 fattori:
a) conformazione endo-eso degli zuccheri, b) rotazioni attorno ai legami dello scheletro, c) rotazione attorno al legame glicosidico (base-zucchero) in C1'.



(b)



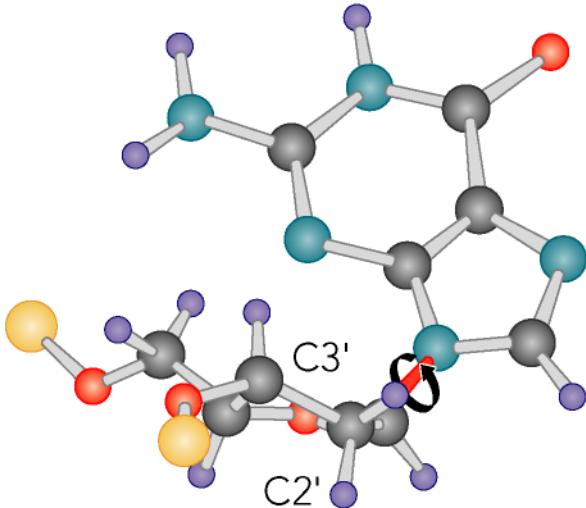
posizione *anti* della guanina



deossiguanosina nel DNA in forma B



posizione *sin* della guanina



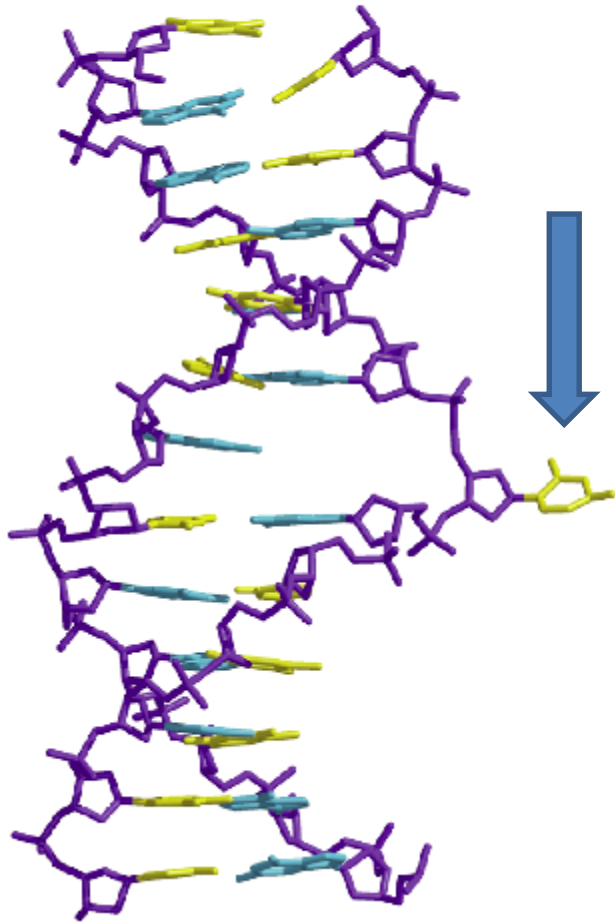
deossiguanosina nel DNA in forma Z

Conformazioni anti e syn delle purine

Per rotazione del legame glicosidico, le purine possono assumere due conformazioni, dette anti e sin.

Ciò non è possibile con le pirimidine, che restano sempre in forma anti.

Base flipping



Energeticamente facile

Permette l'accesso alle basi per

- Metilazione
- Rimozione di basi
- Verifica complementarietà

Principali caratteristiche strutturali del B-DNA

- vi sono 10 paia di basi per giro d'elica in fibra, e circa 10,5 in soluzione acquosa fisiologica;

-il piano medio delle basi è quasi perpendicolare all'asse dell'elica; per cui, essendo lo spessore di van der Waals delle basi circa 0,34 nm è semplice valutare la lunghezza L di una doppia elica estesa dato il numero di paia di basi componenti

$$n_{pb}: \quad L = n_{pb} \times 0,34 \text{ nm}$$

(lunghezza del DNA umano 3×10^9 bp \times 0,34 nm = 1,02 metri)

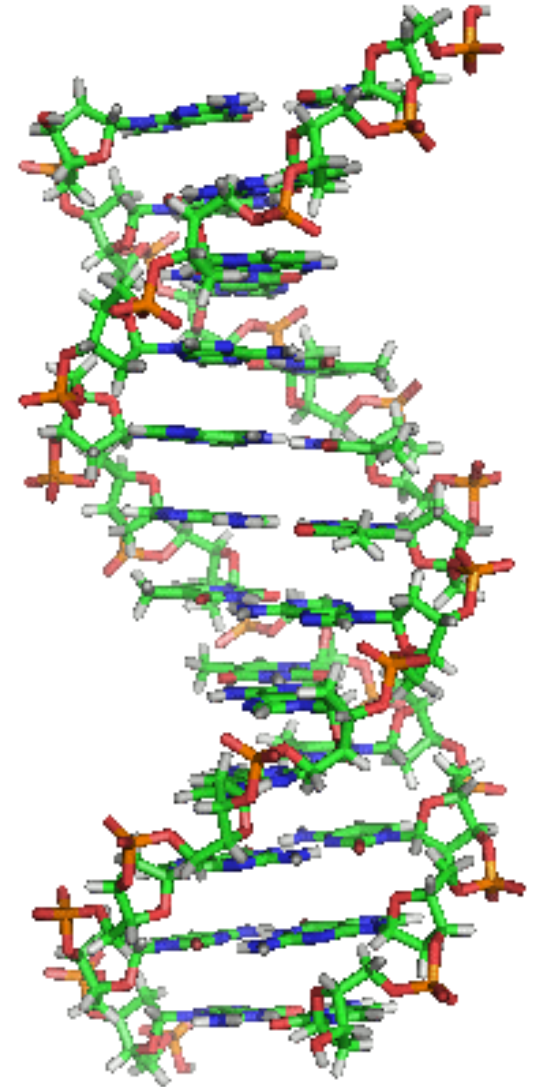
- le paia di basi sono centrate approssimativamente sull'asse dell'elica;

- il diametro medio della doppia elica è **2 nm**;

- la conformazione del deossiribosio è di tipo **2'endo**;

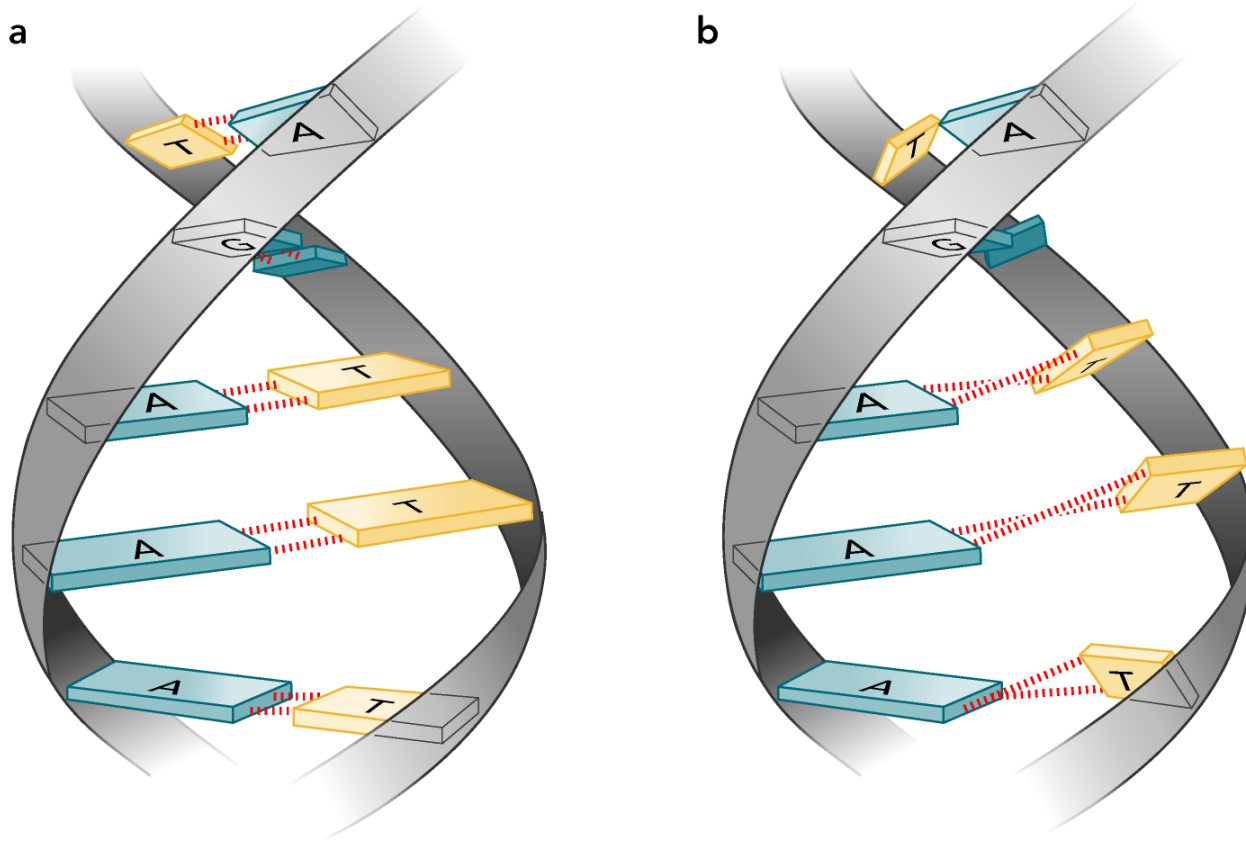
- la conformazione del legame N-glicosidico è di tipo **anti**;

- lateralmente le paia di basi sono esposte in un **solco maggiore** e in un **solco minore**.



Le coppie di basi nel modello di Watson-Crick e in una doppia elica reale

Particolarmente importante è l'avvitamento delle coppie di basi attorno al loro asse lungo (propeller twist) per ottimizzare la forza dei legami a H e delle interazioni di stacking



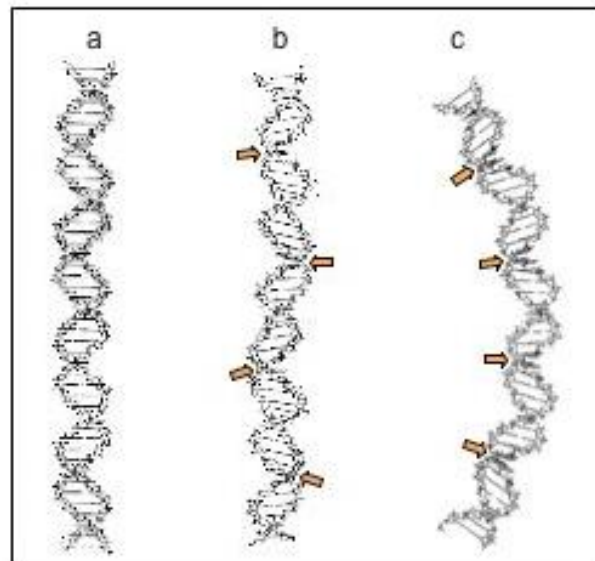
I parametri della struttura B del DNA a doppia elica, come descritti da Crick e Watson, descrivono una doppia elica molto regolare (FIGURA a).

Nella realtà dei fatti lungo la molecola del DNA ci sono piccole variazioni strutturali locali che in alcuni casi possono influenzare la struttura complessiva della molecola. Un caso ben studiato è quello del DNA intrinsecamente "curvo".

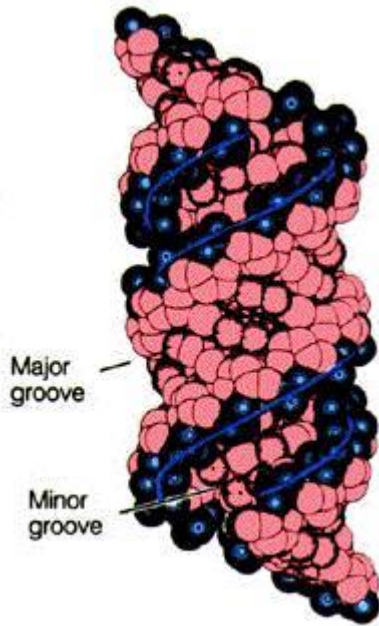
Due coppie di basi A:T adiacenti hanno una intrinseca tendenza a piegarsi dalla parte del solco minore, mentre due paia G:C hanno una tendenza inversa. Ne risulta che la doppia elica non è perfettamente dritta ma presenta piccoli piegamenti. Questi, essendo la sequenza di nucleotidi eterogenea e casuale, tendono a elidersi a vicenda cosicché nell'insieme la struttura della molecola, pur con qualche deformazione, resta più o meno dritta (FIGURA b).

Se però un tratto di DNA contiene, per esempio, due o tre paia di basi A:T con una periodicità di circa 10 paia di basi (cioè ripetute ogni giro di elica), i piccoli angoli introdotti si sommeranno tra loro producendo così una apprezzabile curvatura dell'asse della molecola di DNA (Figura c).

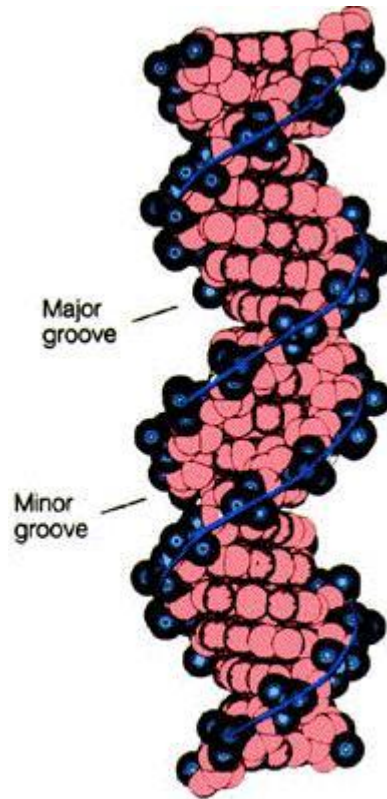
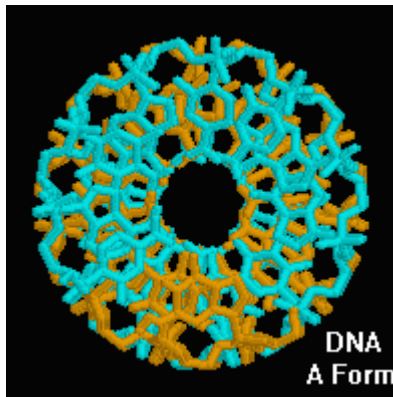
Queste curvature intrinseche del DNA si trovano alle volte in punti specifici del genoma, per esempio a monte di vari promotori, e in alcuni casi possono avere una rilevanza funzionale.



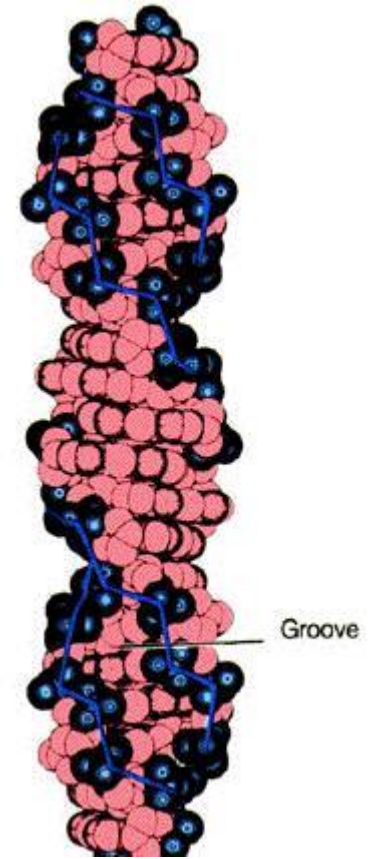
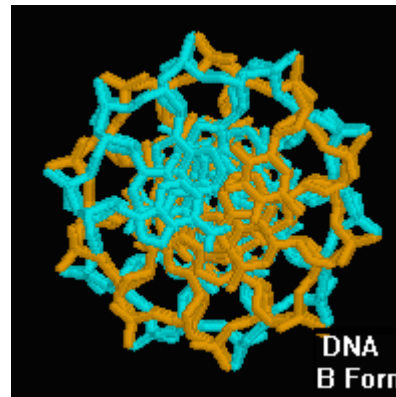
Per il DNA in condizioni non fisiologiche (fibra anidra) ma fisiologiche nel caso di dsRNA o ds DNA/RNA



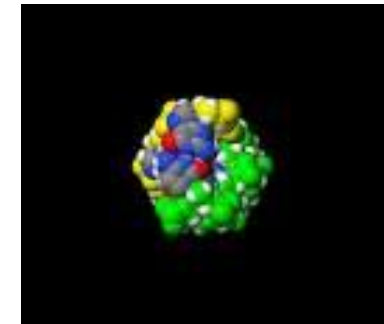
A-DNA



B-DNA

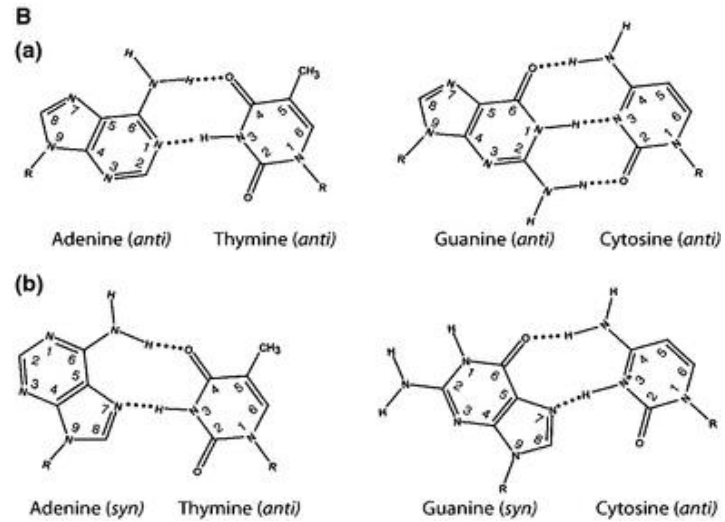
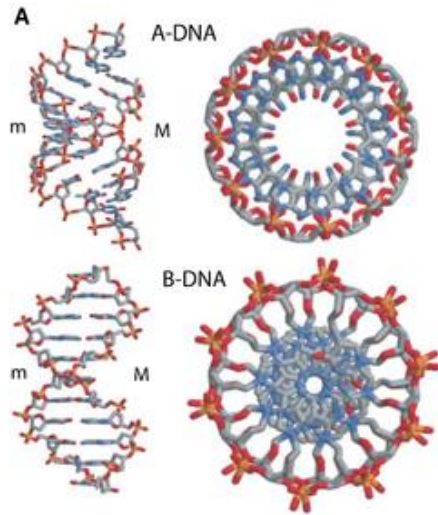


Z-DNA



Solo per sequenze alterne $(YR)_n$ in condizioni particolari

DNA structure and function



Le conformazioni A-DNA, B-DNA e Z-DNA sono le principali osservate nei sistemi biologici naturali.

La conformazione *B* è la più frequente nelle condizioni standard delle cellule.

La forma *A* è una spirale destrorsa (il solco minore è largo ma poco profondo, quello maggiore è più stretto e profondo), con un passo di 2,9 nm (circa 11bp) ed un diametro di 2,5 nm. Tale conformazione è presente in condizioni non fisiologiche, quando il DNA viene disidratato.

La conformazione *Z* è tipica invece delle sequenze che presentano modificazioni chimiche come la metilazione (tratti di DNA ricchi di basi C e G). Essa assume un andamento sinistrorso, opposto rispetto alla conformazione *B*.

Confronto fra le forme A, B e Z

Caratteristiche generali comuni:

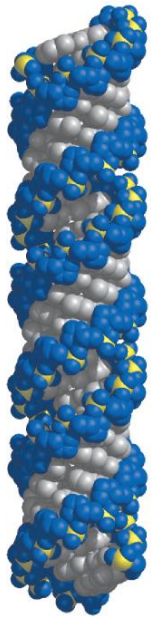
1. Le due catene sono antiparallele
2. L'appaiamento delle basi è a geometria Watson-Crick

	Forma A	Forma B	Forma Z
Senso dell'elica	Destrorsa	Destrorsa	Sinistrorsa
Diametro	26 Å	20 Å	18 Å
Coppie basi/giro	11	10.5	12
Distanza fra le basi	2.6 Å	3.4 Å	3.7 Å
Piegamento basi rispetto alla normale all'asse	20°	6°	7°
Solco maggiore	stretto, profondo	largo, medio	assente
Solco minore	largo, poco prof.	stretto, medio	stretto, profondo
Conformazione	C3'-endo	C2'-endo	C2'-endo (Pyr)
Conformazione legame N-glicosidico	Anti	Anti	Syn (Pur) Anti (Pyr)

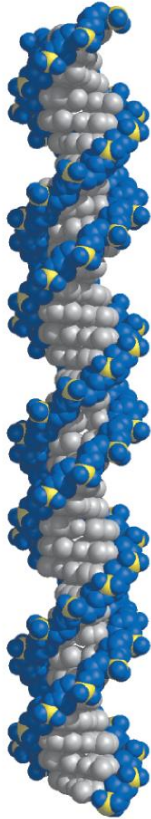
Le strutture A e B possono sussistere per qualsiasi sequenza di basi purchè vi sia complementarità tra le due catene, la struttura Z solo per sequenze alterne pirimidina-purina in condizioni particolari (alta conc. salina o stress torsionale)

RIASSUMENDO.....

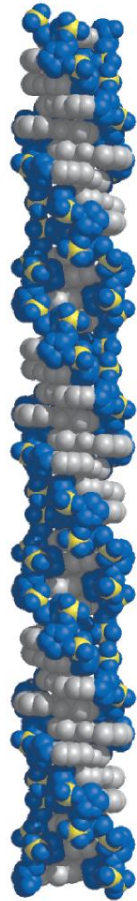
28 Å



Forma A



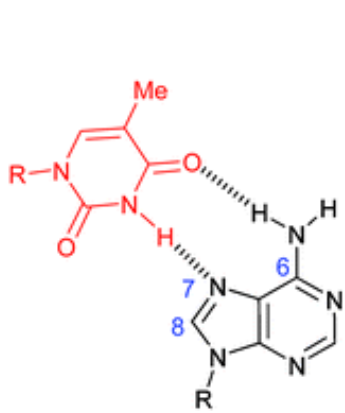
Forma B



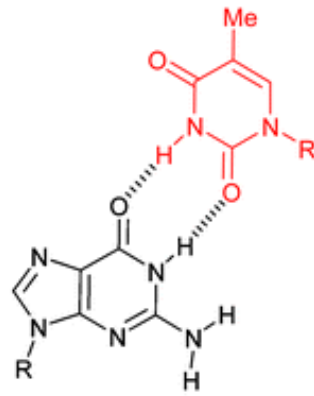
Forma Z

La forma più stabili del DNA a doppia elica

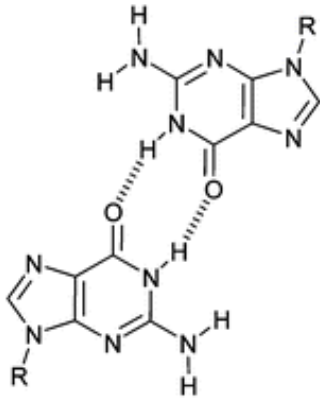
- **Forma B:** molto simile a quella prevista da W-C, è la più stabile in condizioni fisiologiche (10.5 bp/giro, bp perpendicolari all'asse dell'elica).
- **Forma A:** panciuta, favorita in soluzioni a minor % acqua (11 bp/giro, piano delle bp piegato di 20° rispetto all'asse dell'elica)
- **Forma Z:** sinistrorsa, allungata (12 bp/giro), favorita da sequenze Py-Pu alternate, es. (CG)_n, Pu è sin, Py è anti (doppia elica a zig-zag), con probabile funzione regolativa nell'espressione genica e nella ricombinazione.



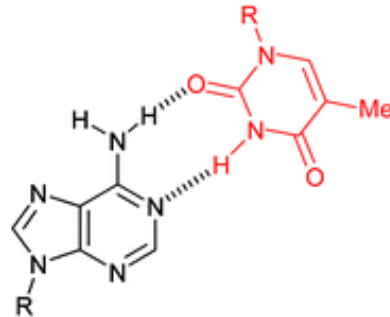
Hoogsteen (TA)



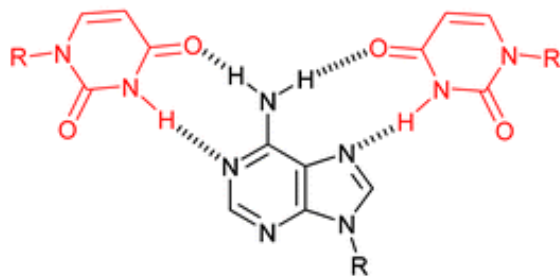
Wobble (GT)



Self-dimerization (GG)



Reverse Watson-Crick (AT)



UAU base triplet (Watson-Crick and Hoogsteen)

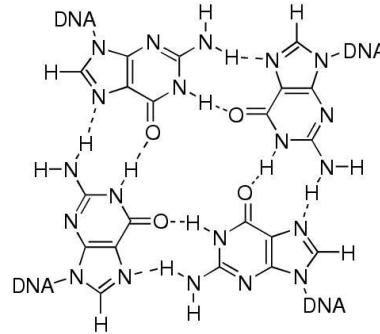
Molto raramente nel DNA, più spesso nell'RNA si possono trovare appaiamenti di legame idrogeno tra basi con geometria diversa da quella di Watson e Crick. Ecco alcuni esempi.

Altre strutture che possono formarsi
nel DNA

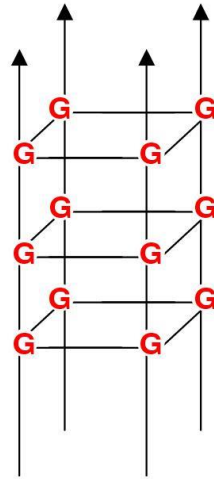
NON SOSTITUISCONO la doppia elica
ma coesistono con essa (prima o dopo
tratti di doppia elica)

G-quadruplex (nelle estremità dei telomeri ed in alcune regioni introniche)

Appaiamenti Hoogsteen

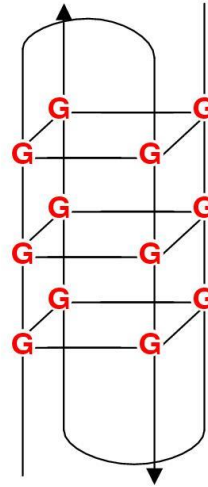


A. G-tetrad structure



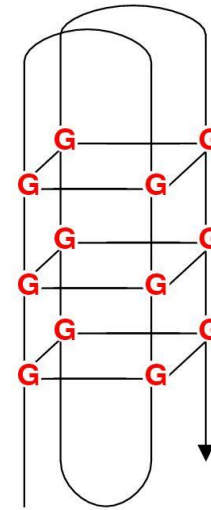
B.

G4-DNA intermolecolare

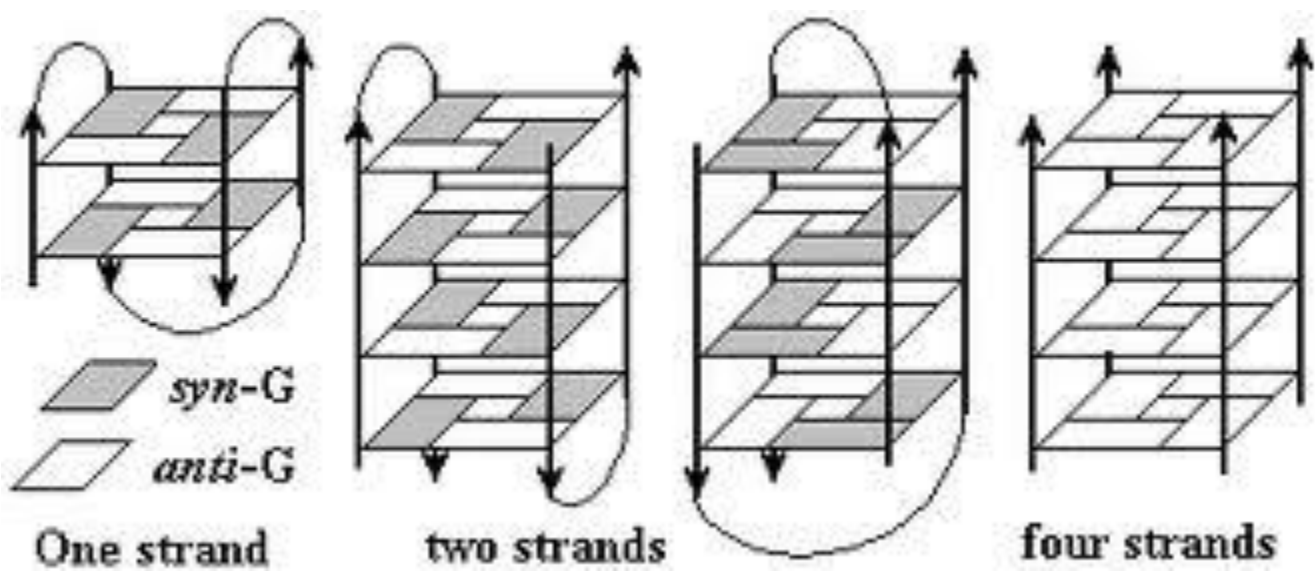


C.

G4-DNA intramolecolare
Tipo basket

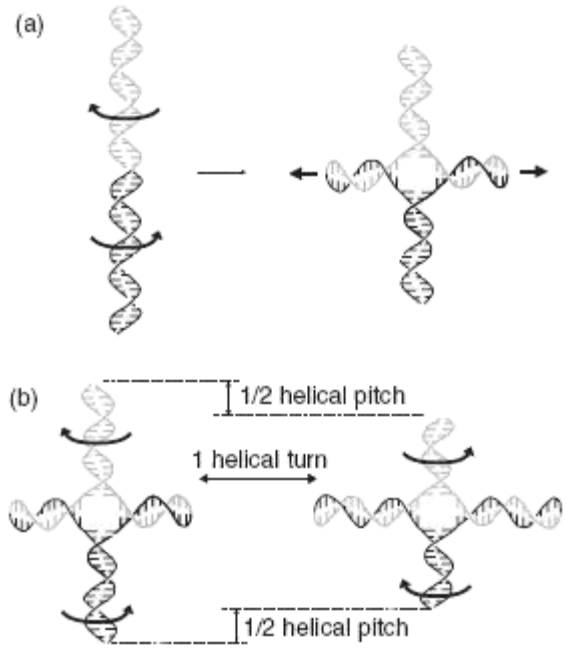
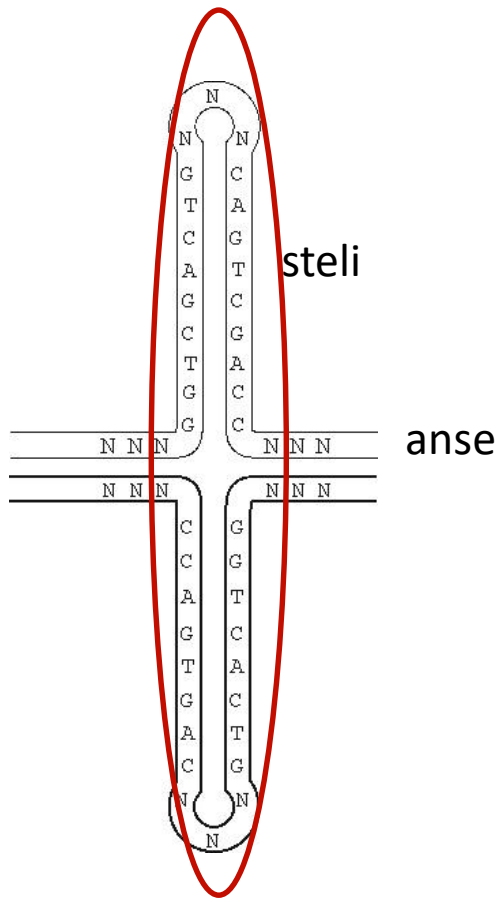


D.



CRUCIFORMI

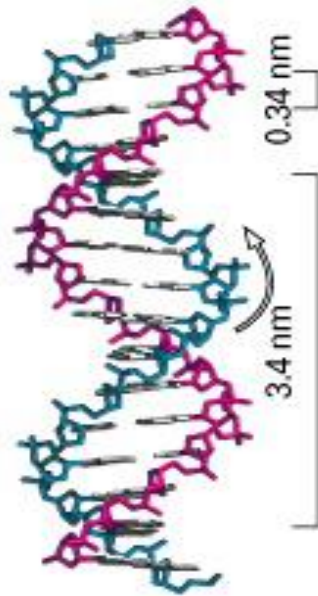
(quando sono presenti a breve distanza due coppie della stessa sequenza in orientamento opposto-palindromi-)



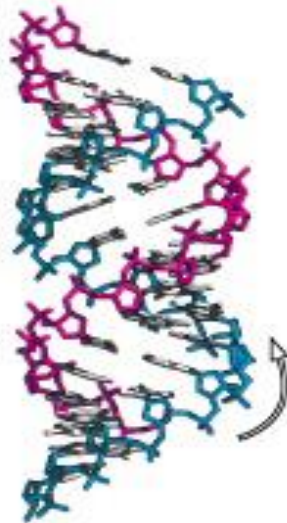
NB: importanti funzionalmente soprattutto per l'RNA

DNA forms

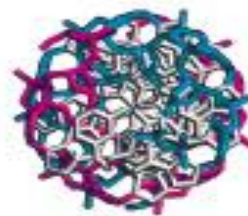
(a) B DNA



(b) A DNA

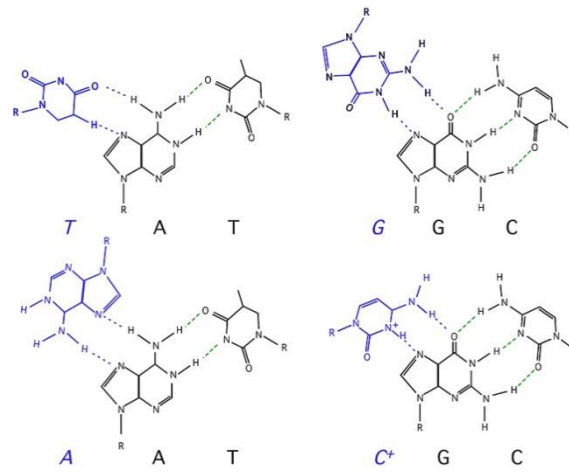


(c) Z DNA

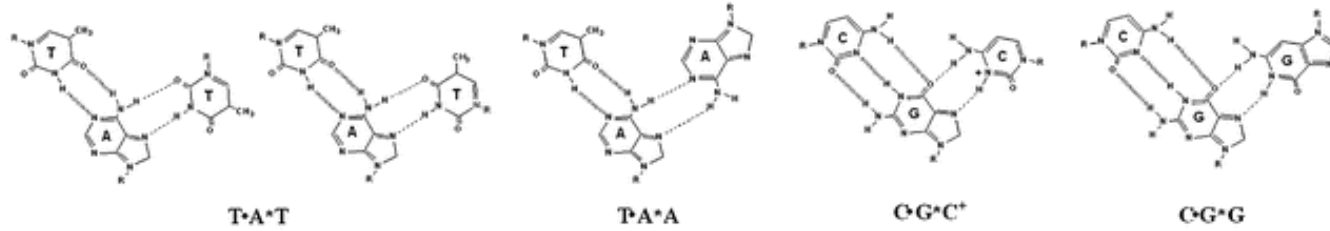


(d) Triple-Helical DNA

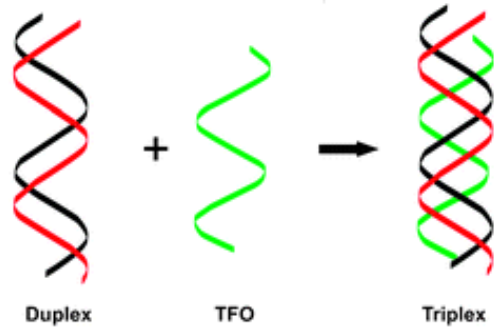




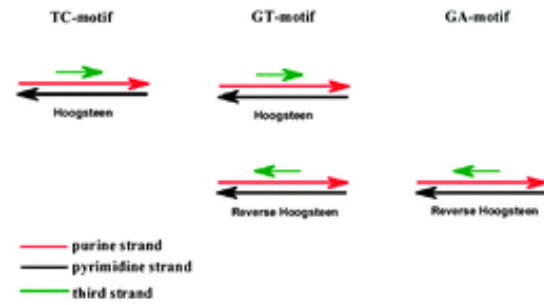
A

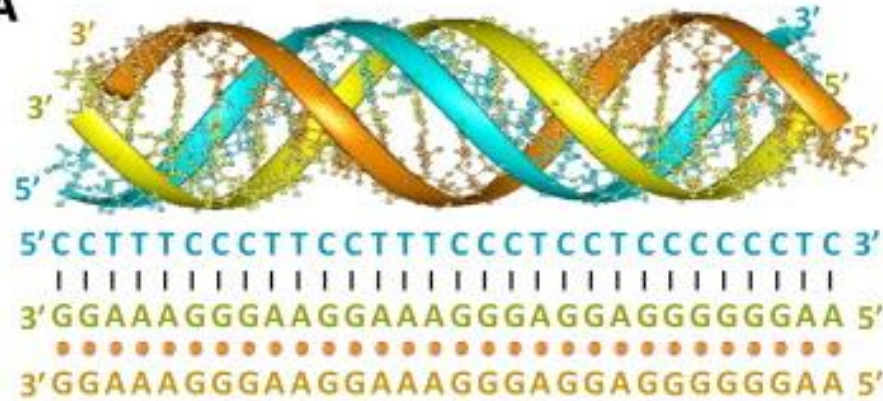
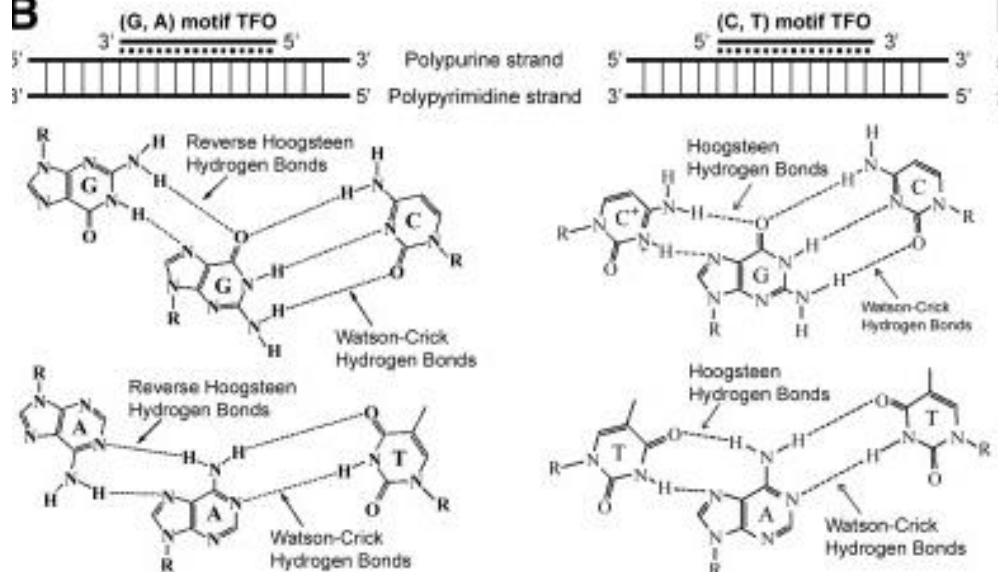


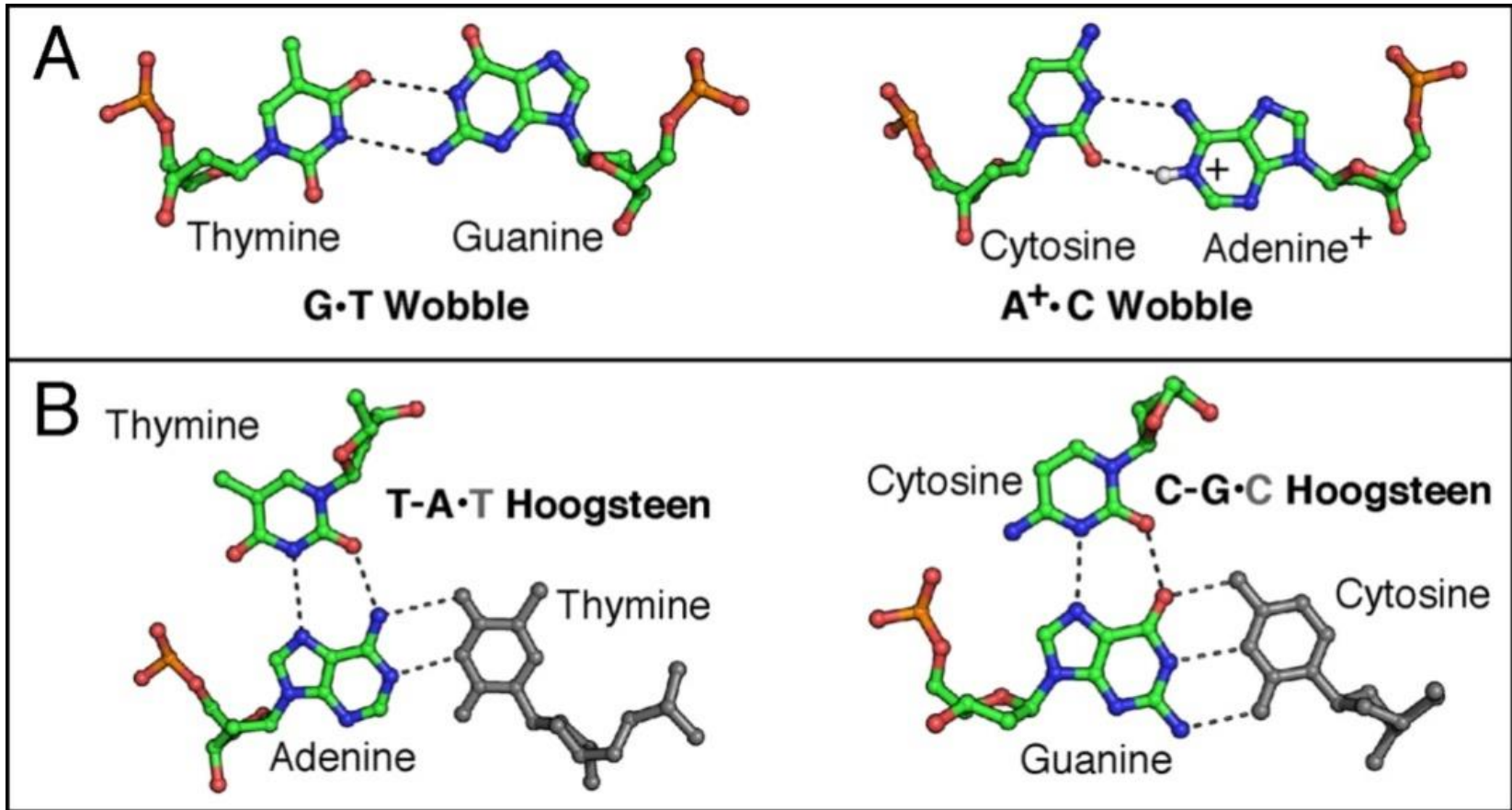
B



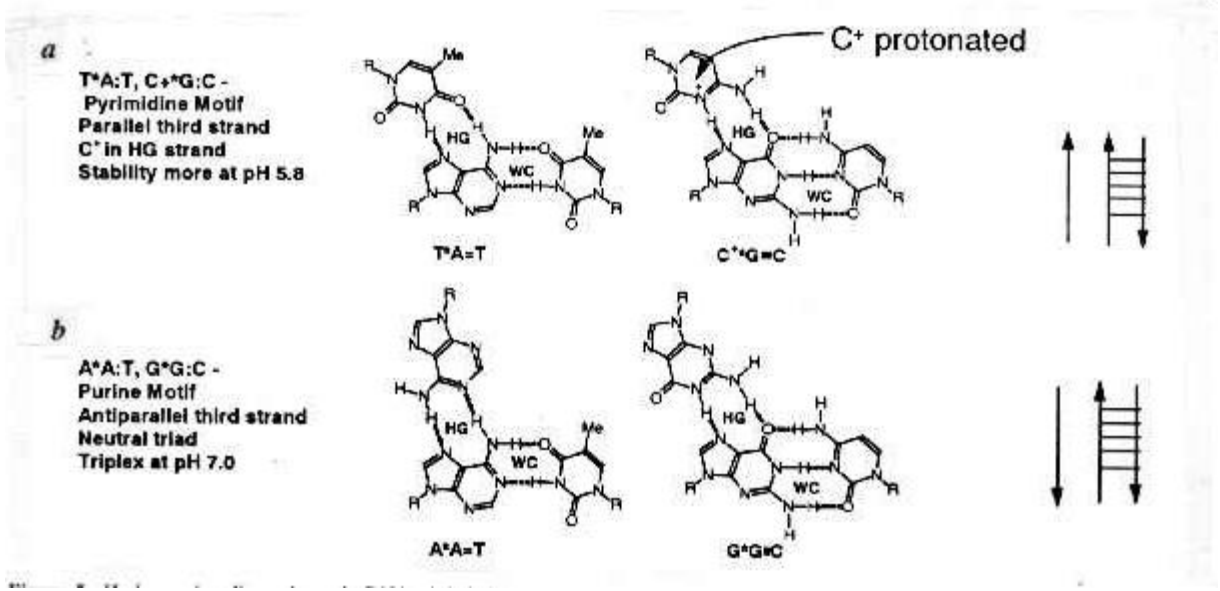
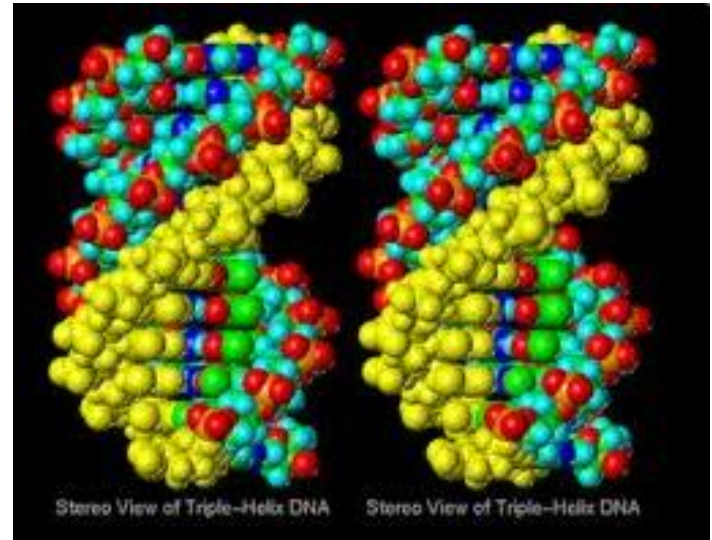
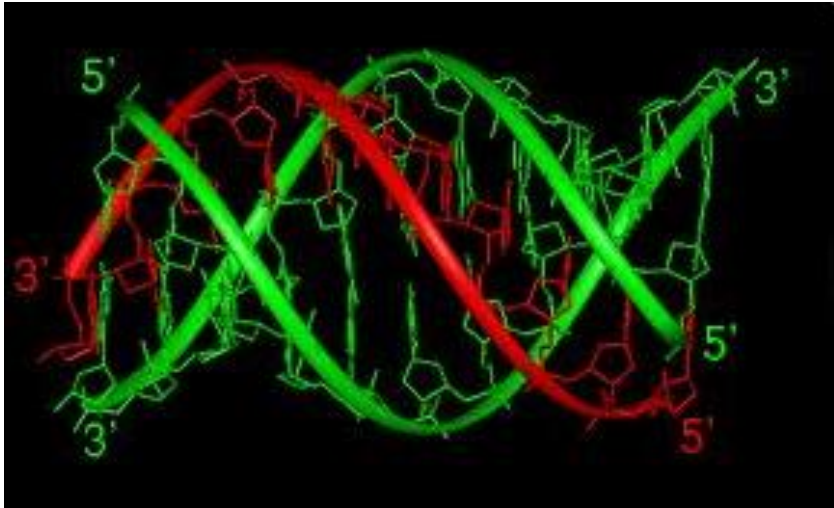
C



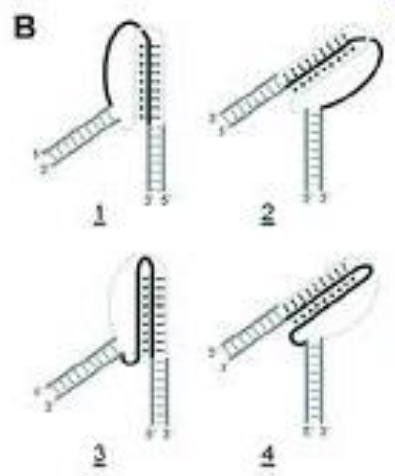
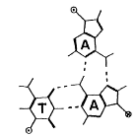
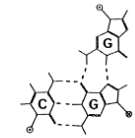
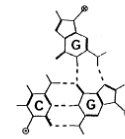
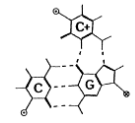
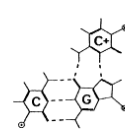
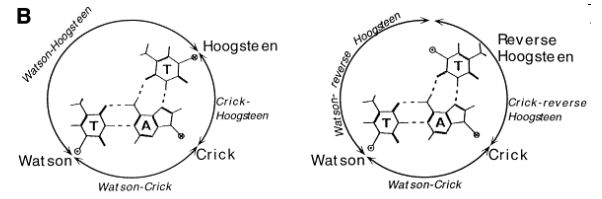
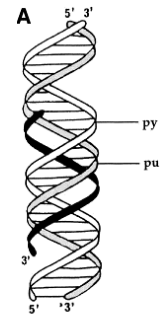
A**B**



Hoogsteen base pairs take advantage of the Hoogsteen edge of a purine base, which is orthogonal to and, thus, can be accessed without disrupting the Watson-Crick base pairing edge ([Fig. 3B](#)). Consequently, Hoogsteen interactions allow the assembly of multi-stranded DNA complexes, including triplet helices and G-quadruplexes.

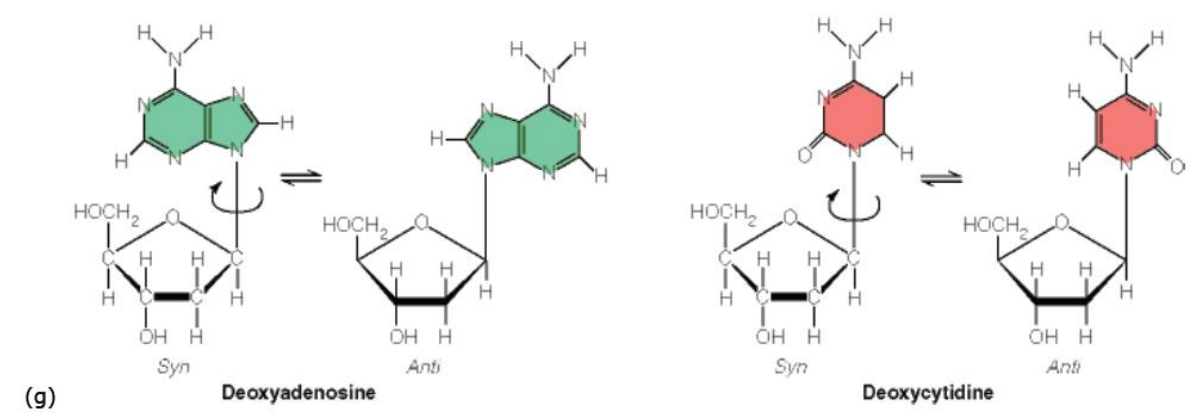
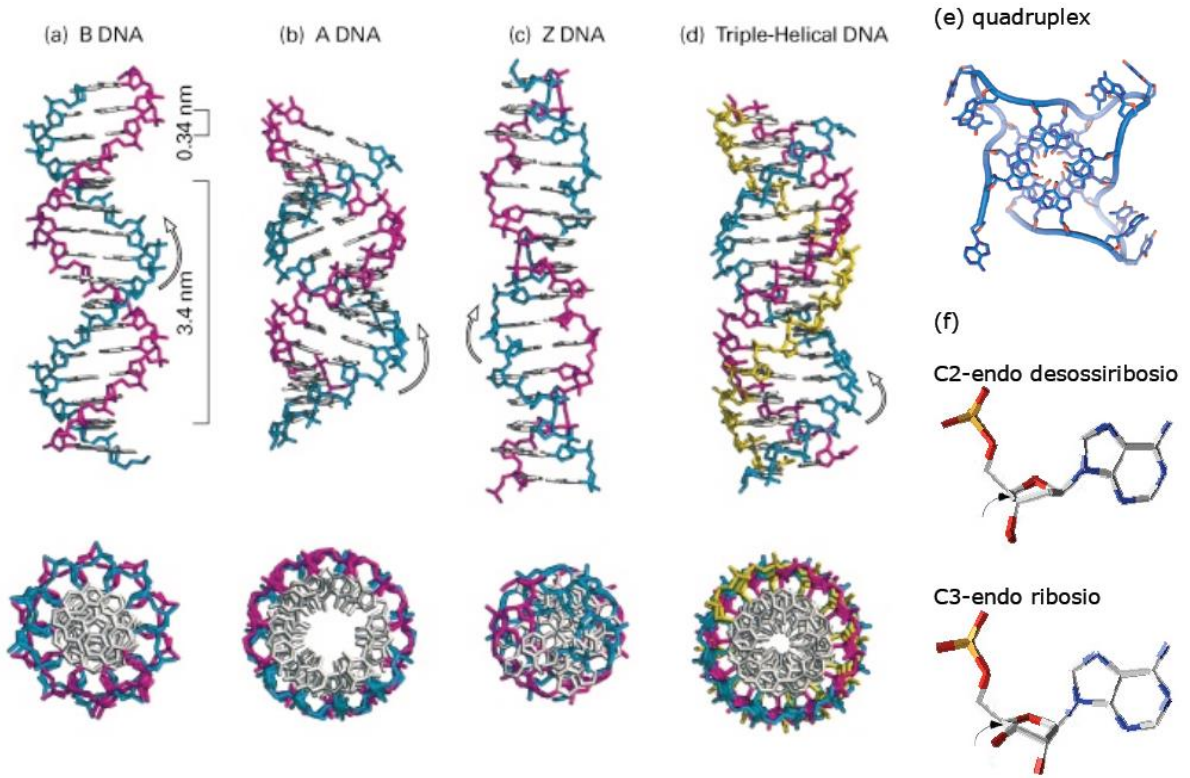


Tripla elica di DNA (DNA-H)



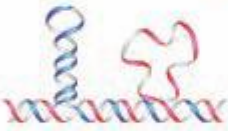
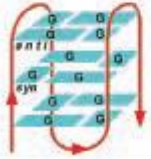





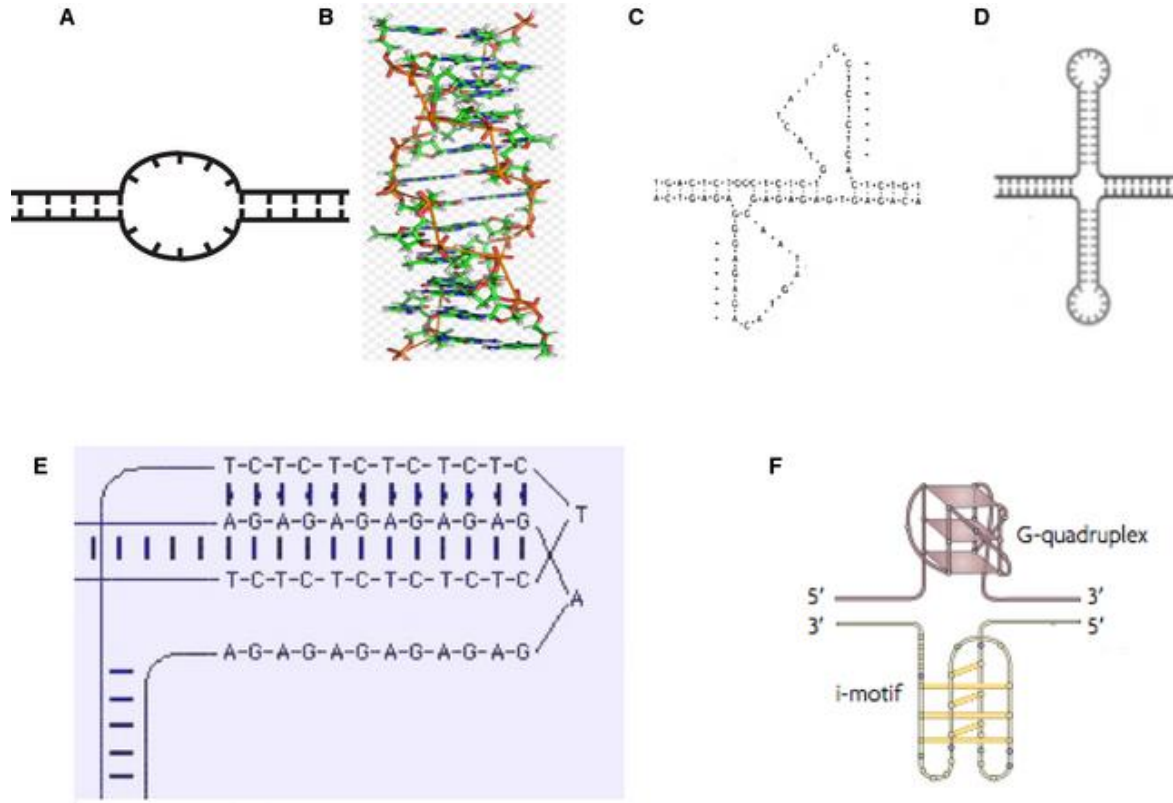
tripla elica del DNA in fase gassosa



Non-B DNA structures

Name	Conformation	General Seq. Requirements	Sequence
Cruciform		Inverted Repeats	$\begin{array}{c} \text{TCGGTACCGA} \\ \text{AGCCATGGCT} \end{array}$
Triplex		$(R \cdot Y)_n$ Mirror Repeats	$\begin{array}{c} \text{AAGAGGGGAGAA} \\ \text{TTCTCCCTCTT} \end{array}$
Slipped (Hairpin) Structure		Direct Repeats	$\begin{array}{c} \text{TCGGTTCGGT} \\ \text{AGCCAAGCCA} \end{array}$
Tetraplex		Oligo $(G)_n$ Tracts	$AG_3(T_2AG_3)_3$ single strand
Left-handed Z-DNA		$(YR \cdot YR)_n$	CGCGTGCGTGTG GCGCACGCACAC

DNA structure and function



- Il DNA è una molecola dinamica e le conformazioni che può assumere giocano un ruolo molto importante nella modulazione di molte funzioni biologiche.
- E' interessante notare come le conformazioni non-B del DNA siano responsabili di patologie come la sindrome dell'X-Fragile, la corea di Huntington e l'Alzheimer.

Disease associations with Z-DNA

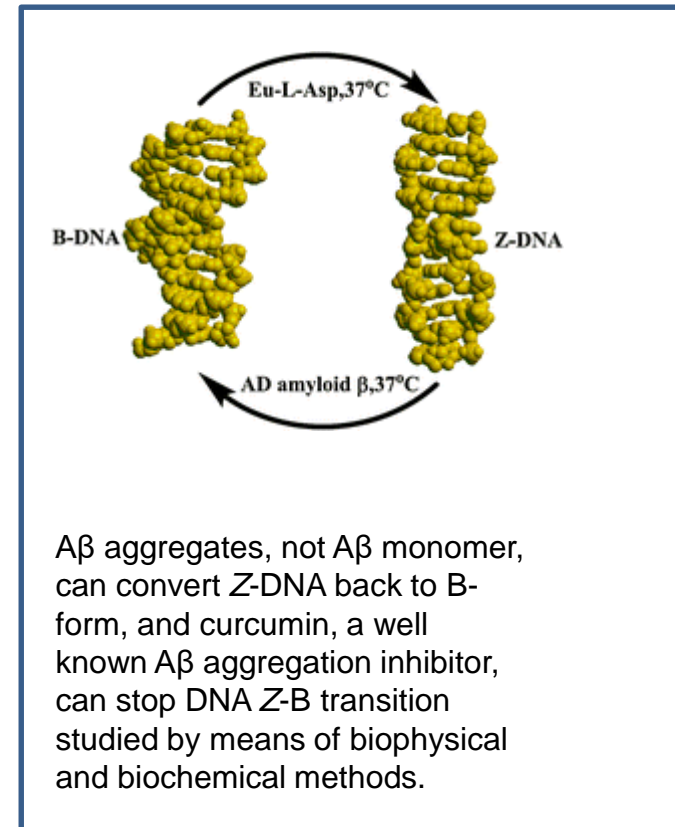
- Rheumatoid arthritis
- Multiple sclerosis
- Type 1 Diabetes
- Infectious disease susceptibility
- Chronic hepatitis C
- Leukemia
- Lymphoma

Protozoa also indicated a link to transcription. Ciliated protozoa have two nuclei: the macronucleus, which is the site of transcription, and the micronucleus, which contains DNA that is involved in sexual reproduction. Anti-Z-DNA antibodies stained the macronucleus of the ciliated protozoan *Stylonychia*, but not its micronucleus.

Z- DNA and disease

Alzheimer's disease: presence of Z-DNA in the hippocampal region of severely affected Alzheimer's disease (AD) brain samples.

- Severely infected – Z DNA conformation
- Moderate - probable B-Z intermediate form
- Normal- B-DNA conformation
- Amyloid Beta and aluminum (an etiologic factor) can modulate helical alterations *in vivo*
- Alternate purine pyrimidine sequences found in promoter regions of AD specific genes (amyloid precursor proteins, presenilin and ApoE)



H-DNA e ATASSIA di FRIEDREICH

Espansione della tripletta GAA nel primo introne del gene per l'atassia di Friedreich che si trova sul cromosoma 9 (normale 8-30; patologico >30 fino a 1000)
Gravità direttamente correlata al numero di espansioni

INIBIZIONE DELLA TRASCRIZIONE DEL GENE della fratassina (proteina mitocondriale) PER LA FORMAZIONE DELLA TRIPLA ELICA

Prevalenza: 1/30-50.000, eredità autosomica recessiva

Patogenesi: Atrofia cellule a T dei gangli spinali, atrofia-degenerazione cordoni post. + degeneraz. tratto spino-cerebellare dorsale e ventrale

Gene: FRDA, mappato su cromosoma 9q13-21, per la fratassina (proteina mitocondriale)

Clinica: Esordio < 25 aa., progressiva atassia della marcia senza remissione



Table 1. Some of the ataxias associated with DNA triplet repeat expansions and their repeat number in normal and various neuro-logical disorders

Disease	Repeat	Repeat range		
		Normal	Intermediate	Affected
Fragile XA	CGG	6–50	50–200	> 200
Fragile XE	GCC	7–35	130–150	230–750
FRDA	GAA	10–21	40–60	> 100
Dentato rrubral-pallido luisian atrophy (DRPLA)	CAG	6–39	–	49–75
Spinocerebellar ataxia SCA I	CAG	6–39	–	40–81
SCA II	CAG	15–24	–	35–59
SCA III	CAG	12–40	–	50–84
SCA VI	CAG	4–16	–	21–27
SCA VII	CAG	4–35	28–35	37–200
SBMA	CAG	15–31	–	40–62
Huntington disease HD	CAG	10–35	36–39?	36 +
Mitonic distrophy (DM)	CTG	5–37	50–100	> 100

J. Biosci. 37(3), July 2012

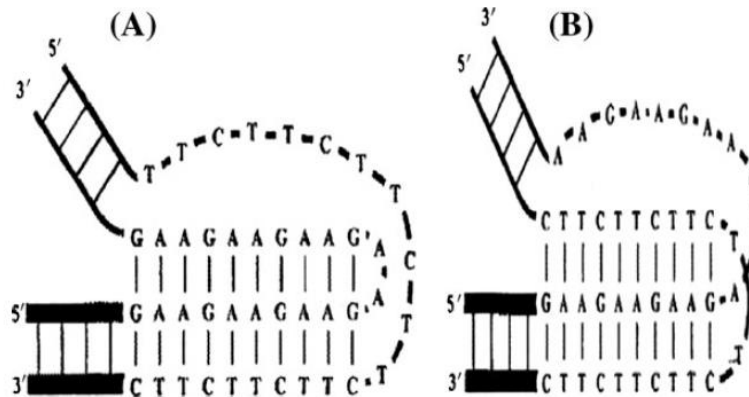
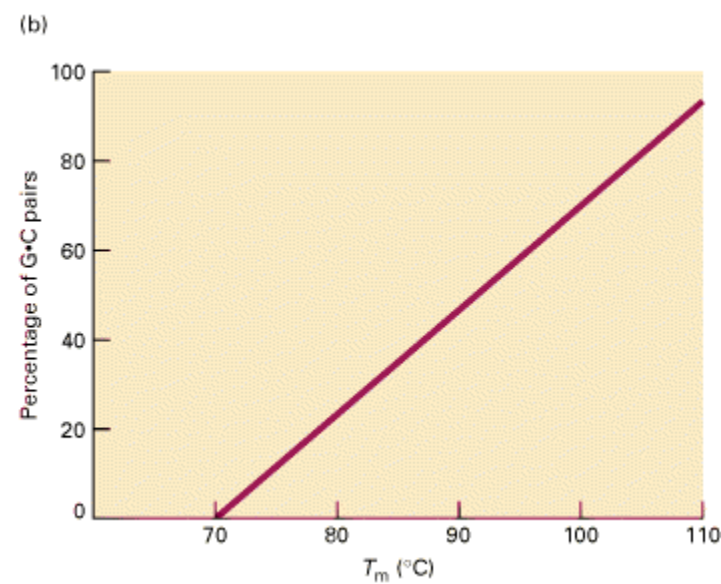
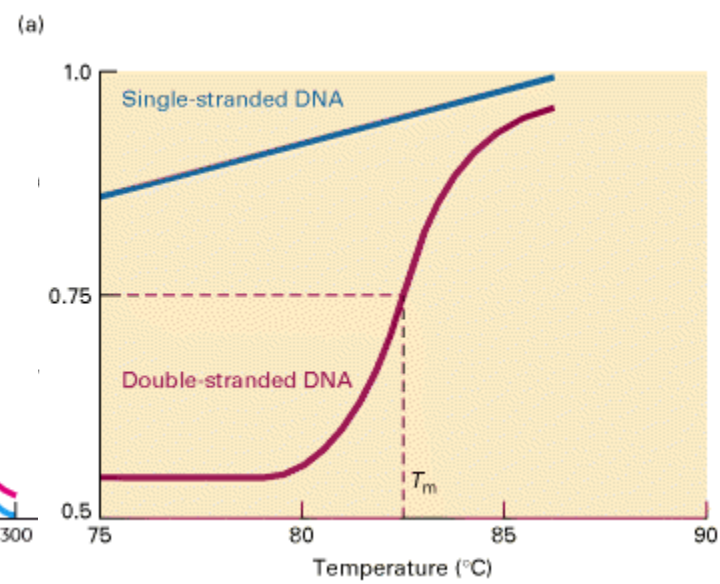
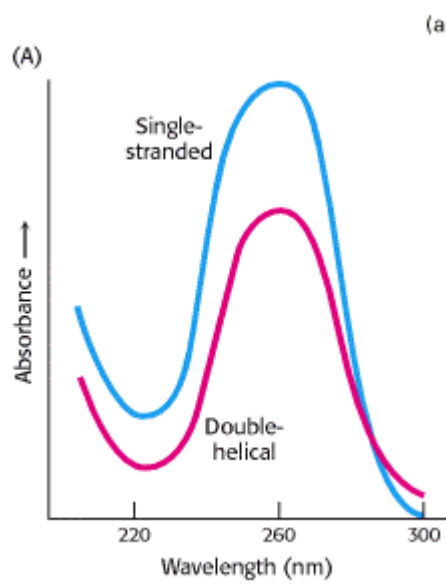
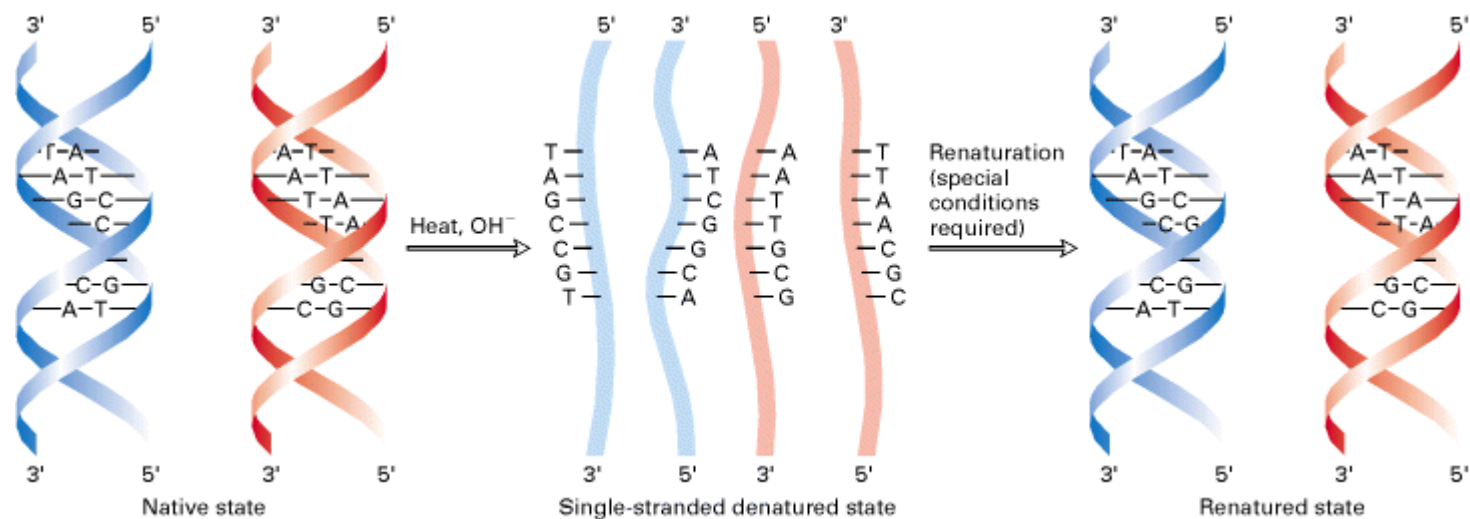
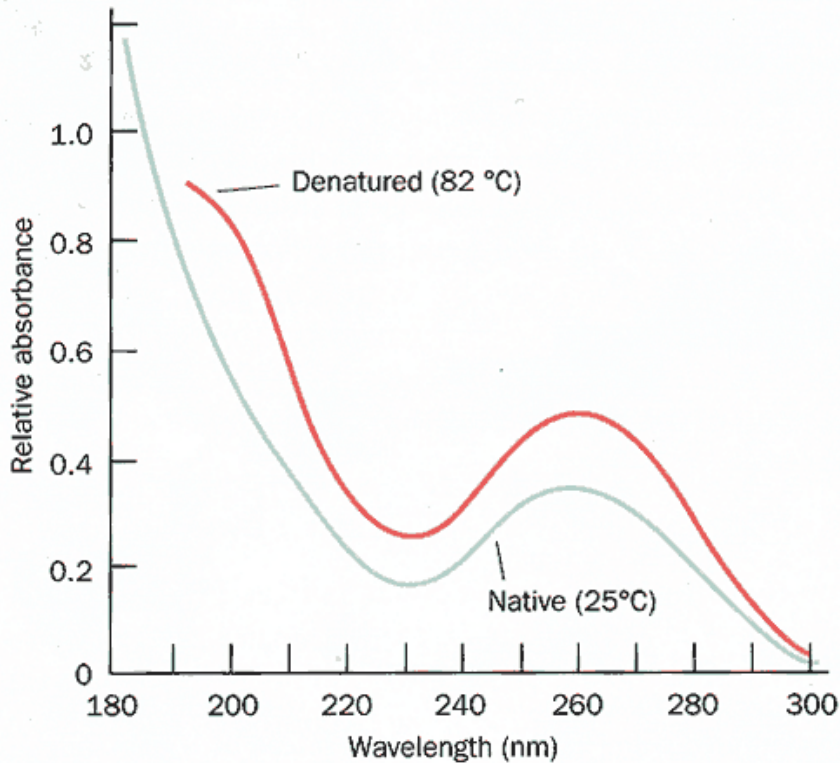


Figure 4. Schematic representation of (A) purine (R*R·Y) and (B) pyrimidine (Y*R·Y) motifs in intra-molecular DNA triple helices.

STABILITA' DEL DNA

- Stabilità termodinamica del duplex di DNA e sua denaturazione: dipendenza da fattori intrinseci (composizione in basi, peso molecolare) ed estrinseci (temperatura, pH, forza ionica, co-soluti caotropi).
- Cinetiche di rinaturazione del DNA e loro dipendenza dalla complessità.

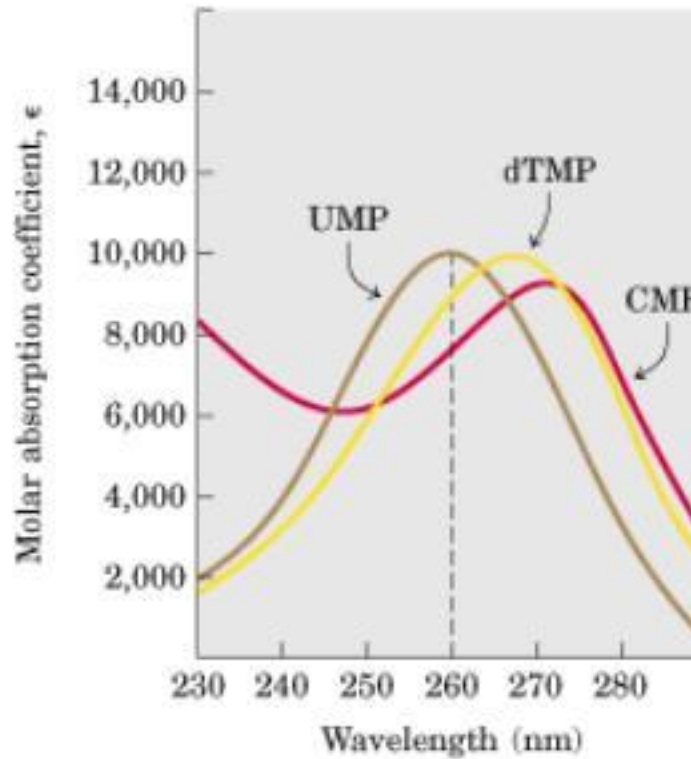
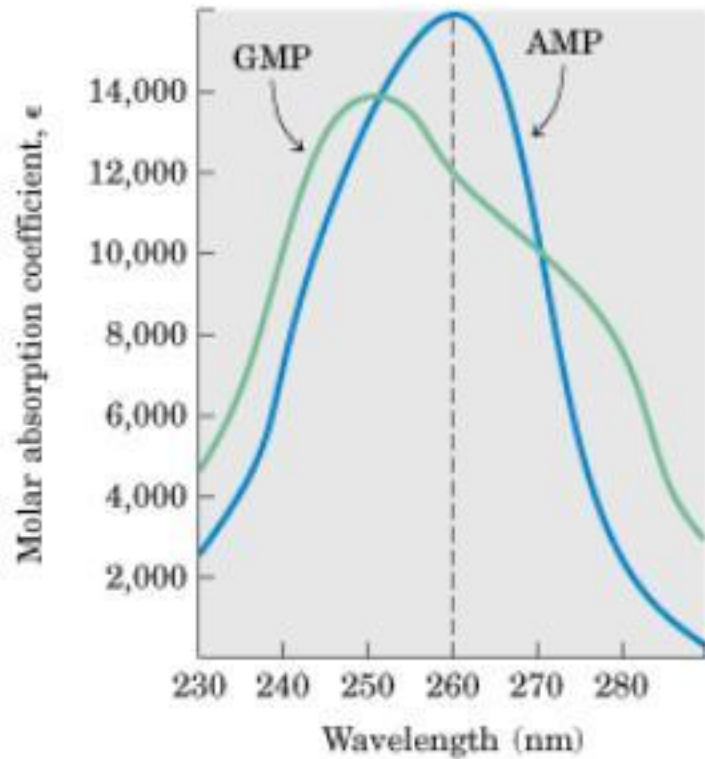




Il fenomeno dell'ipercromismo del DNA.

Le basi del DNA assorbono la luce UV tra 300 e 230 nm (con massimo di assorbimento attorno a 260 nm). Ma l'entità dell'assorbimento a parità di concentrazione è maggiore di quasi il 50% per il DNA denaturato rispetto al DNA "nativo", cioè a doppia elica. Pertanto misure di assorbimento UV a 260 nm, facilmente ottenibili con uno spettrofotometro, si sono rivelate particolarmente comode nello studio della denaturazione (e della rinaturazione) del DNA.

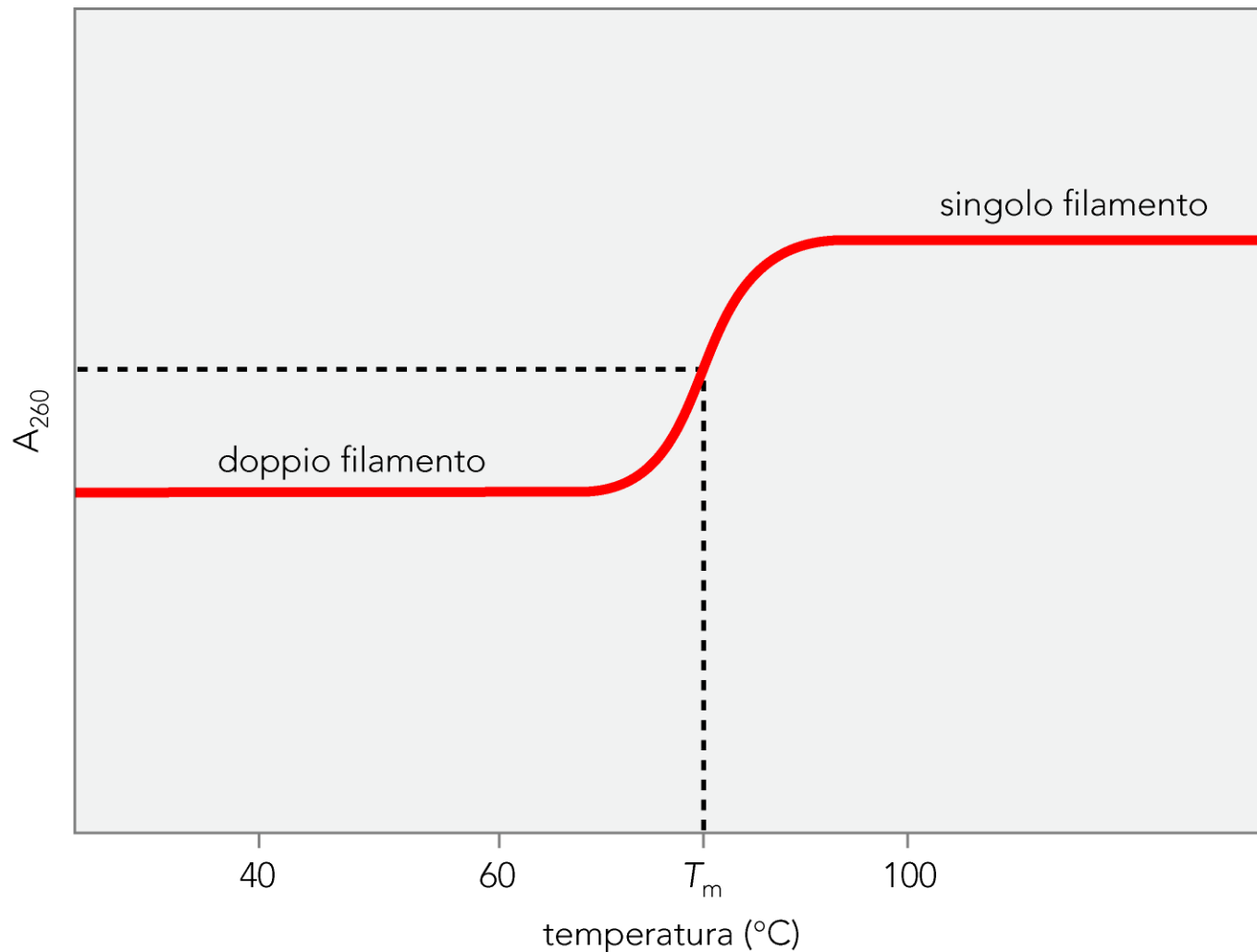
Nucleotides strongly absorb UV light at ~260nm



Molar absorption coefficient at 260 nm, ϵ_{260} ($M^{-1}cm^{-1}$)	
AMP	15,400
GMP	11,700
CMP	7,500
UMP	9,900
dTMP	9,200

Gli spettri di assorbimento UV dei singoli nucleotidi sono leggermente diversi l'uno dall'altro, sia come posizione del massimo che come intensità. La banda centrata a 260 nm del DNA è la media pesata per la composizione in basi del dato DNA.

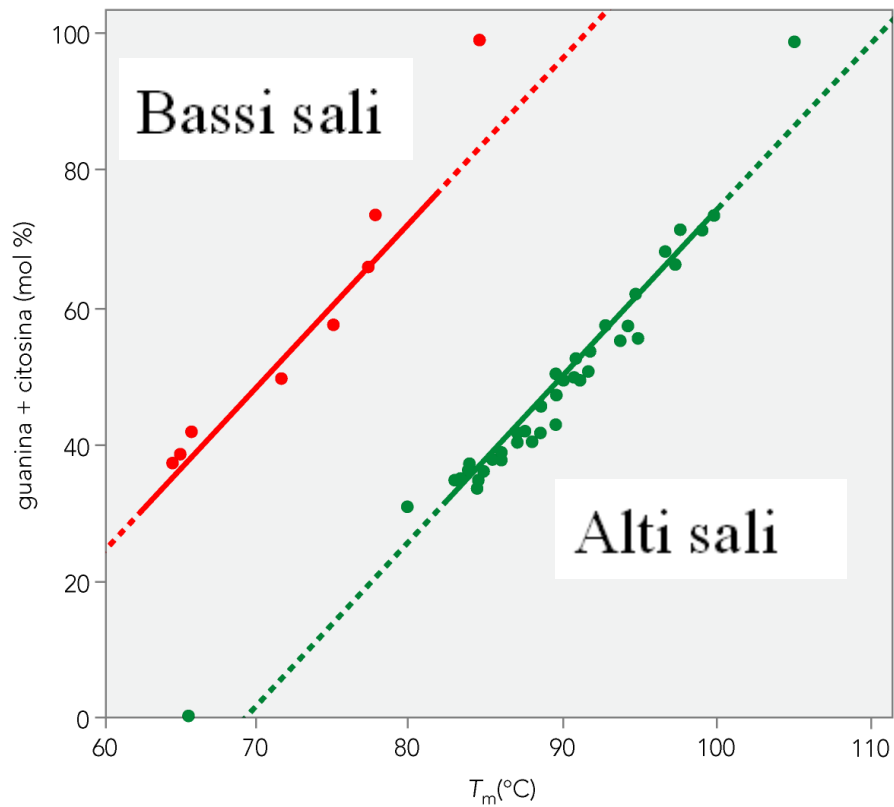
Da notare che gli spettri somma delle coppie C:G e A:T sono molto simili, per cui la composizione di un DNA duplex influisce molto poco sull'assorbimento del DNA.



Effetto ipercromico

L'assorbimento di luce UV a 260 nm da parte del DNA permette di seguirne la denaturazione termica. Infatti le basi nella doppia elica hanno coefficiente di assorbimento della luce minore che nello stato a singolo filamento, a causa dello stacking delle basi.

La transizione è cooperativa e il punto di mezzo T_m è detto temperatura di fusione (melting).



Ogni DNA ha una T_m caratteristica, che cresce linearmente con la % di coppie GC e la forza ionica della soluzione.

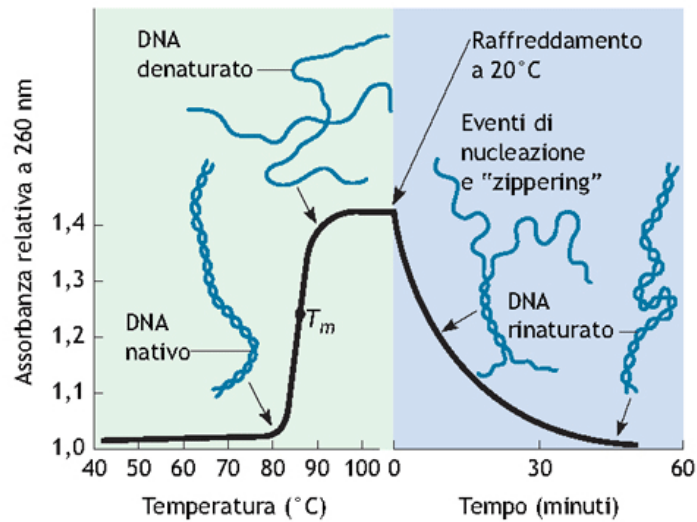
Ciò dipende dall'aumento del numero di legami a H e dall'aumento dell'energia di stacking della coppia GC rispetto a quella AT.

La forza ionica agisce con effetto di schermo esercitato dai cationi nei confronti della repulsione elettrostatica fra i gruppi fosfato (negativi) dei due filamenti vicini.

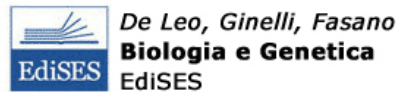
Cinetiche di rinaturazione

In genere la denaturazione termica del DNA in soluzione è un processo molto rapido. Per contro il processo inverso, la rinaturazione (riformazione del duplex) in seguito ad abbassamento della temperatura, è un processo la cui velocità (cinetica) può essere estremamente variabile a seconda della natura del DNA all'esame, andando da velocità non molto minori di quelle di denaturazione nel caso di oligonucleotidi, o DNA costituito da sequenze brevi ripetute, a velocità talmente basse da richiedere giorni o addirittura mesi per osservare un grado di rinaturazione apprezzabile.

La formula finale $N = k \cdot C_{bp} \cdot t_{1/2}$ dice che, nota la concentrazione del DNA in termini di paia di basi e nota la costante cinetica, il tempo di semi-rinaturazione fornisce la misura della cosiddetta "complessità" del genoma, cioè la lunghezza totale del DNA (non ripetitivo) che lo costituisce.



■ **Figura 1.66 Denaturazione e rinaturazione del DNA.** Riscaldando lentamente una soluzione di DNA nativo (a doppia elica), il DNA fonde, cioè le due eliche si separano. Quando la soluzione viene raffreddata si osserva una riassociazione delle due eliche con una cinetica che dipende dalla concentrazione iniziale del DNA e dalla sua lunghezza. I due filamenti si “urtano” e quando collidono tratti complementari c’è l’inizio della “nucleazione” e il successivo “zippering” delle basi complementari.



A roughly approximate formula for the semi-denaturation temperature of duplex DNA in Celsius degrees is:

$$T_m = 81.5 + 16.6(\log_{10} M) + 0.41(\% \text{ GC}) - 0.61(\% \text{ form}) - 500/L - \% \text{ mx}$$

where

- M** is the molarity of salt or better its ionic strength
- %GC** is the percentage of G:C base pairs in the duplex
- %form** is the percentage of formamide in solution
- L** is the length of the duplex in base pairs
- %mx** is the percentage of mismatched base pairs

Confrontando le cinetiche di rinaturazione di genomi da organismi diversi si ottengono informazioni sul grado di complessità genomica. I DNA eucariotici contengono sequenze altamente/mediamente ripetute (rinaturazione rapida) e seq. uniche (rinaturazione lenta)

Cot: frazione di DNA rinaturato

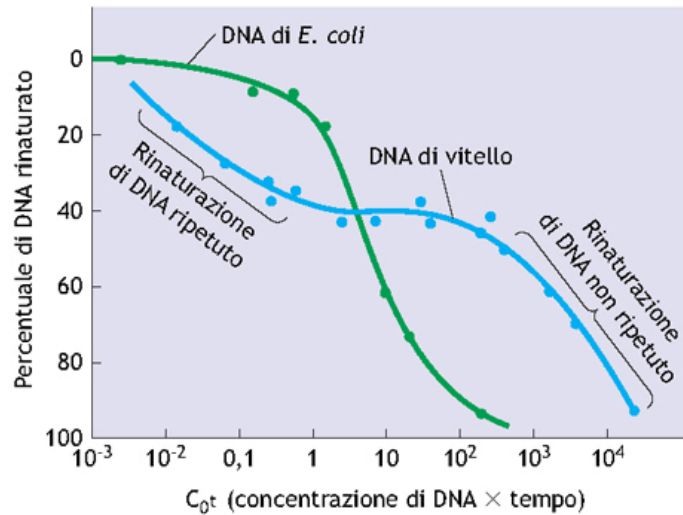


Figura 1.68 Curve di C_0t . Confronto fra le curve di rinaturazione di DNA estratto da cellule di vitello e di *E. coli*. La frazione che si rinatura rapidamente è quella costituita da sequenze ripetute.

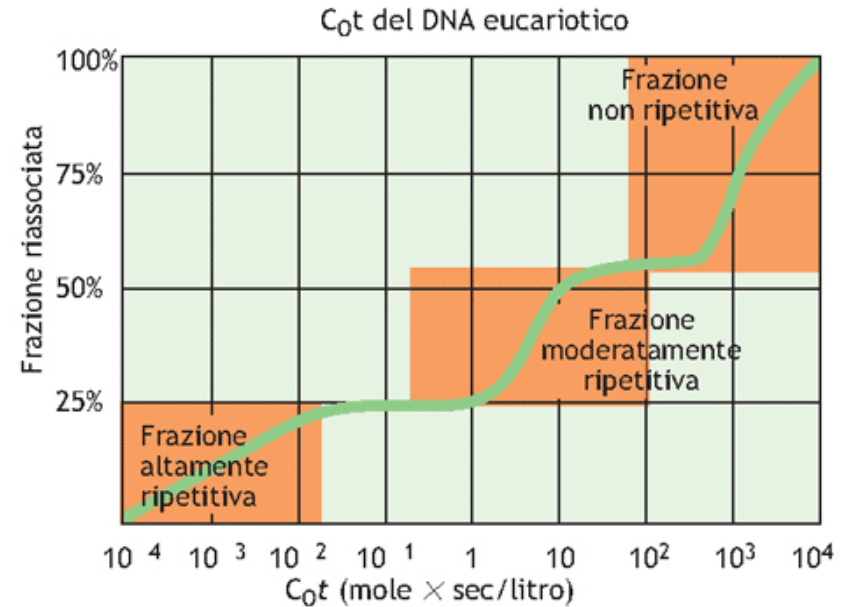
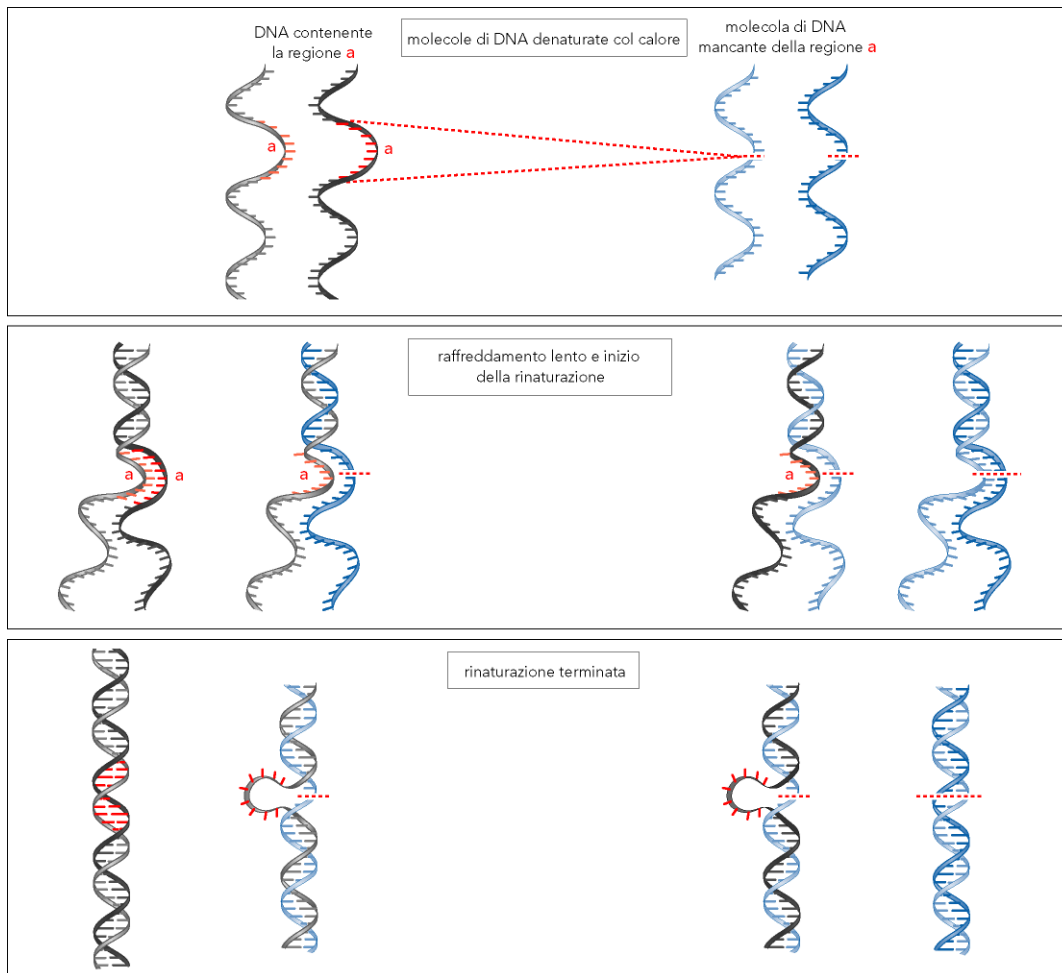


Figura 1.69 Curva di C_0t del DNA eucariotico. Circa il 25% del DNA eucariotico è costituito da sequenze altamente ripetute, il 30% da sequenze mediamente ripetute e la restante parte da DNA a singola copia.



Denaturazione, rinaturazione e ibridazione

Il dsDNA può essere denaturato alzando la Temperatura (o il pH). Il processo può essere reso reversibile purché il raffreddamento sia fatto lentamente.

Molecole di DNA, che differiscono in qualche zona (cioè non sono esattamente complementari-mismatches-), possono rinaturare purché le zone complementari siano abbastanza lunghe da formare doppie eliche ibride stabili. Doppie eliche ibride si possono formare anche fra DNA ed RNA. Ciò è alla base di alcune tecniche fondamentali di biologia molecolare (blotting e microarray).