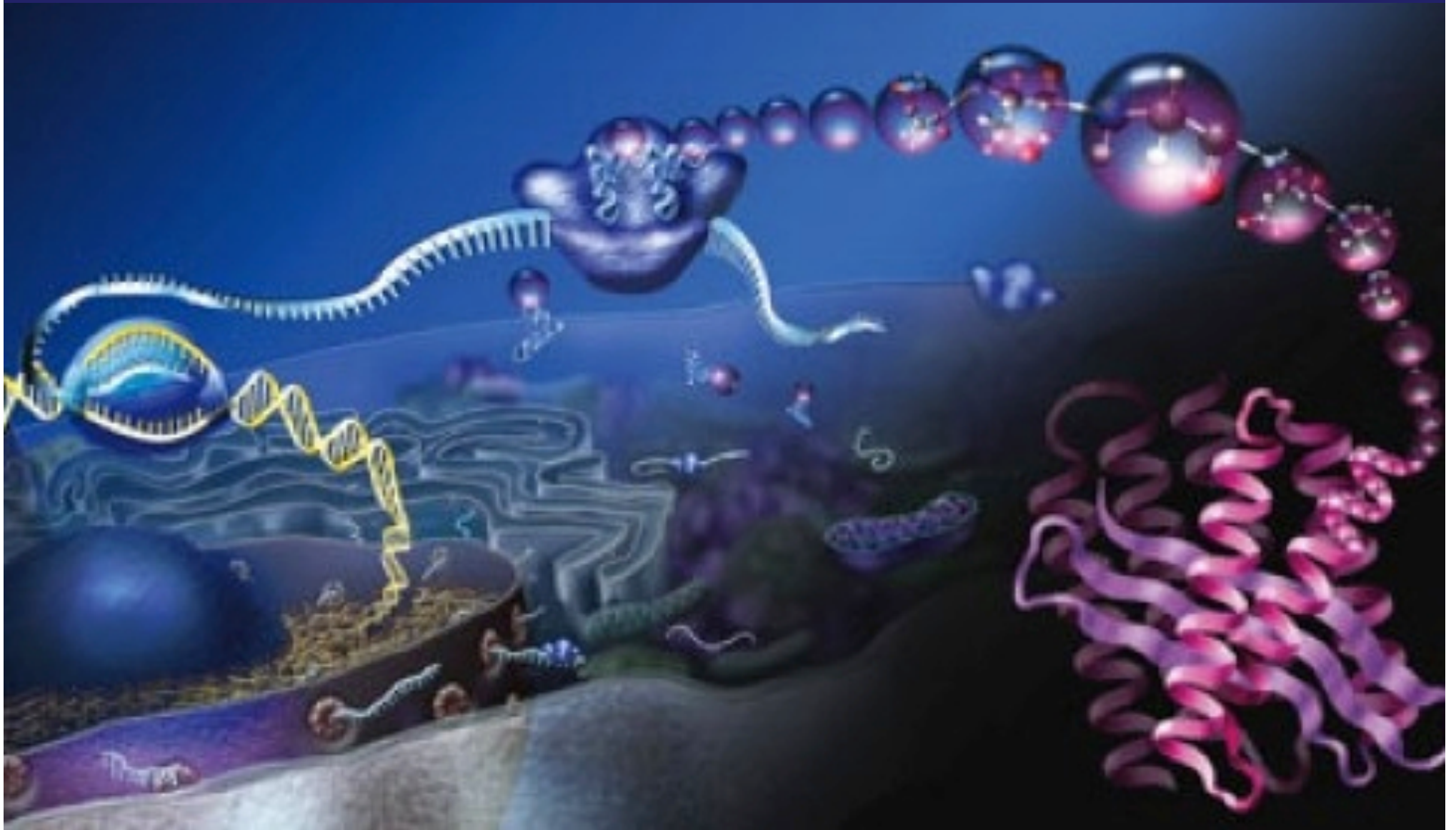


BIOLOGIA MOLECOLARE

Prof. Stefan Schoeftner

AA 2017/2018



BIOLOGIA MOLECOLARE

ORARIO LEZIONI – AA 2018/2018

Lunedì: 11:00 – 13:00 – 2 ore: Aula Morin 2A EDIFICIO H2 bis

Mercoledì: 14:00 – 16:00 – 2 ore: Aula Morin 2A EDIFICIO H2 bis

Venerdì: 12:00 – 13:00 – 1 ora: Aula Morin 2A EDIFICIO H2 bis

OTTOBRE: 02, 04, 06, 09, 16, 18, 20, 23, 25, 27: = 17 ore

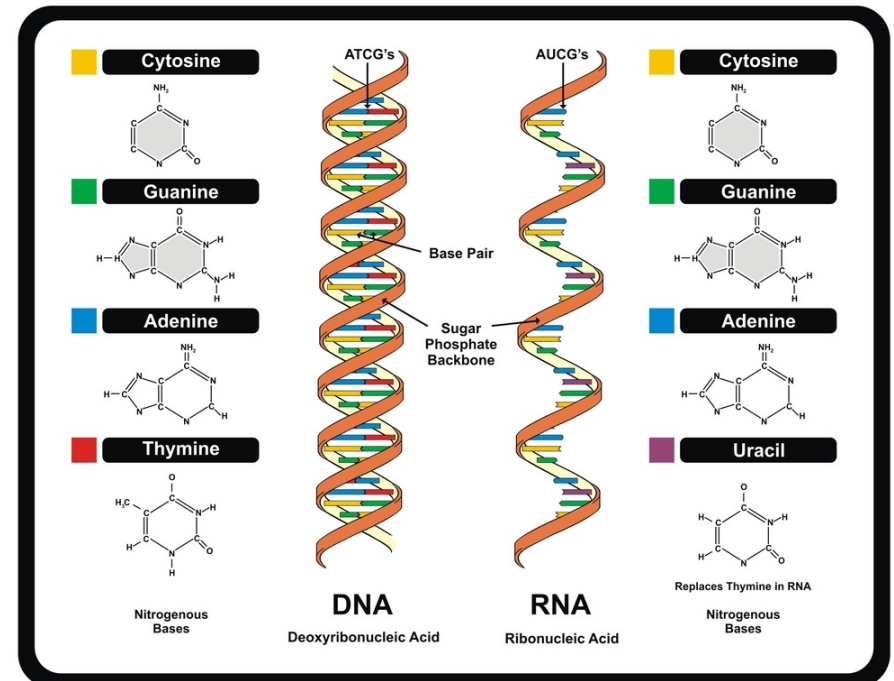
NOVEMBRE: 08, 10, 13, 15, 17, 20, 22, 24, 27, 29: = 17 ore

DICEMBRE: 01, 04, 06, 11, 13, 15, 18, 20: = 12 ore

GENNAIO: recupero (08, 10, 12, 15, 17,...)

TOTALE: 48 ore = 6 CFU

Rappresentante studenti: ?????



BIOLOGIA MOLECOLARE

MATERIALE DIDATTICA– AA 2016/2017

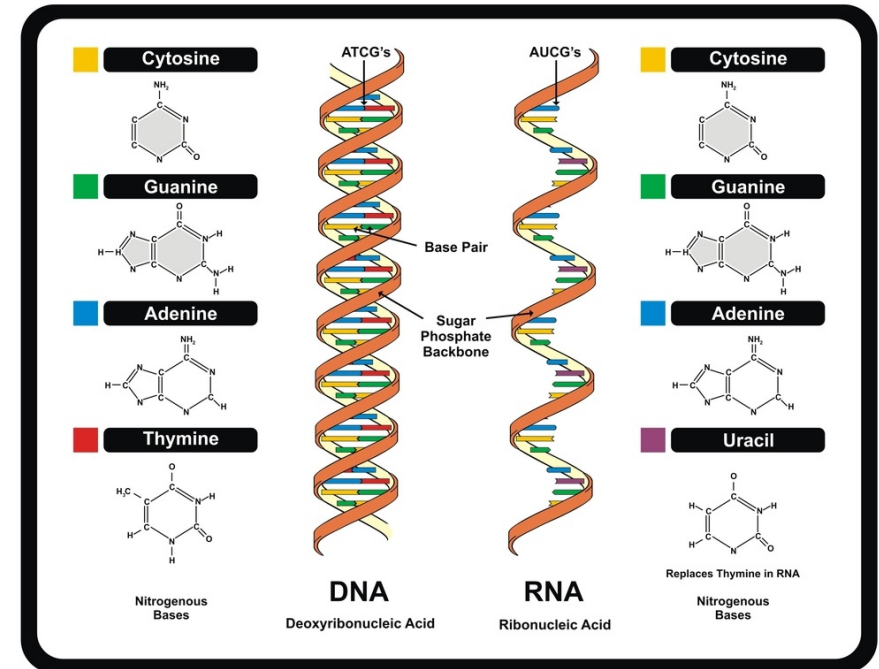
MODALITA DIDATTICA BLENDED VIA PIATTAFORMA “MOODLE FEDERATO”

1. Slides lezioni
2. Registrazione audio
3. Test per autovalutazione
4. Forum per domande
5. Altre contenuti didattici (Film, Lezioni,...)

Tutor disponibile

Materiale didattico (Textbook):

James D Watson, Tania A Baker, Stephen P Bell, Alexander Gann, Michael Levine, Richard Losick-
Biologia molecolare del gene,



PASSWORD MOODLE FEDERATO: biomol

BIOLOGIA MOLECOLARE

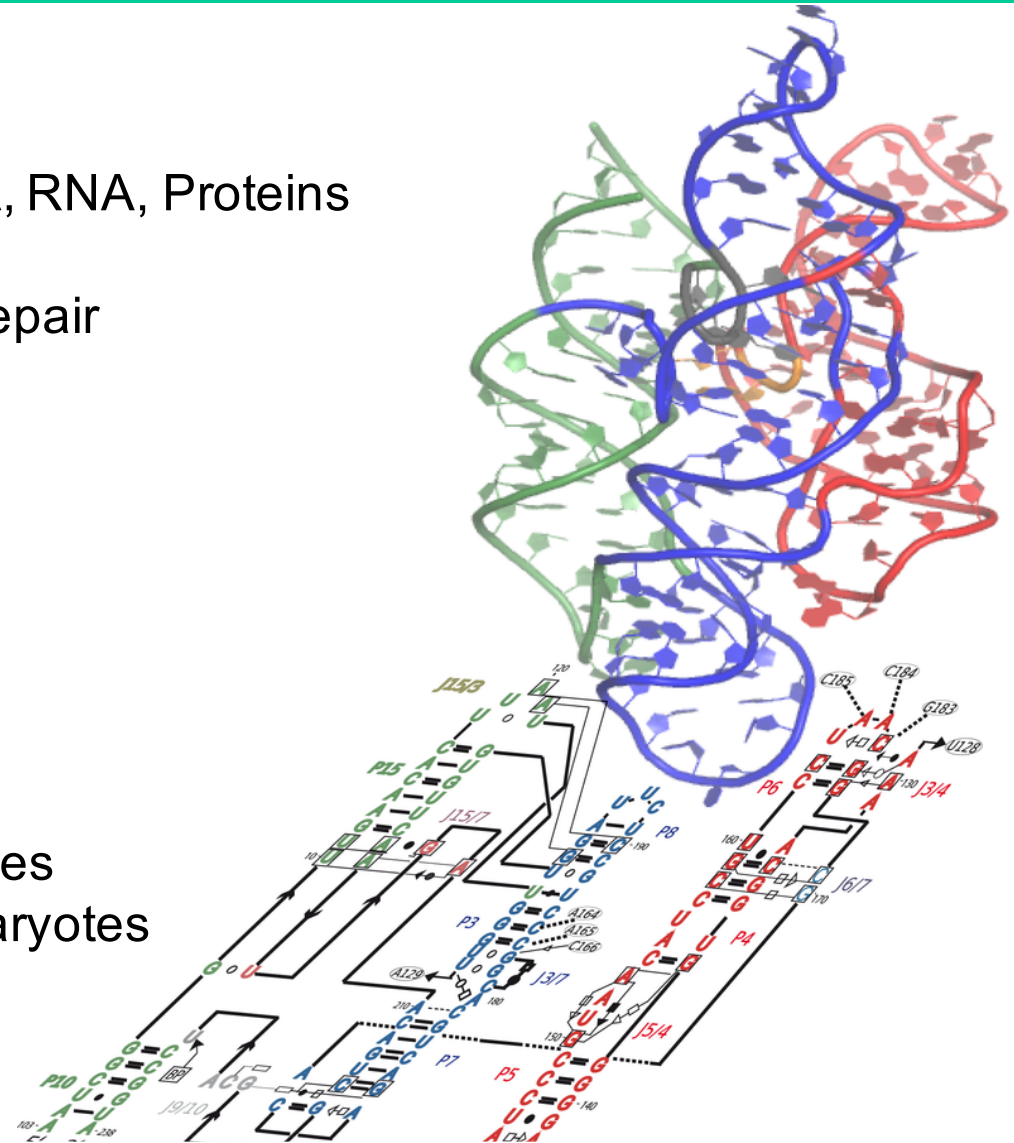
6 CFU – 48 ore di lezioni
Prof. Stefan Schoeftner
(Docente di riferimento)

Programma del corso:

Ottobre | L1+L2+L3: Pro- and Eukaryotes; DNA, RNA, Proteins
L3: Genomes
L4+L5+L6: DNA Replication + DNA Repair
L7+L8: Recombination

Novembre | L9+L10: Transposition
L11+L12: Transcription
L13+L14: RNA Processing
L15+L16+L17: Translation

Dic. | L18+L19: Gene Expression Prokaryotes
L20+L21+L22: Gene Expression Eukaryotes



SYLLABUS: 192SM - BIOLOGIA MOLECOLARE E CELLULARE

Conoscenza e comprensione:

Acquisire conoscenze fondamentali sulla struttura e sull'organizzazione della cellula eucariotica, sui principi della comunicazione intercellulare, e sui meccanismi che controllano proliferazione, differenziamento, e morte cellulare. La studentessa/lo studente dovrà dimostrare di conoscere i meccanismi fondamentali che, all'interno delle cellule procariotiche ed eucariotiche sono essenziali per il mantenimento dell'informazione genetica e il flusso dell'informazione genetica. La studentessa/lo studente deve mostrare di conoscere i termini scientifici ed i nomi delle biomolecole chiave trattate durante le lezioni. La studentessa/lo studente deve conoscere gli approcci sperimentali che hanno portato alle principali scoperte scientifiche della moderna biologia cellulare e molecolare

Capacità di applicare conoscenza e comprensione:

Lo studente acquisisce gli strumenti concettuali necessari per lo studio approfondito di fisiologia, anatomia, patologia, e biologia molecolare avanzata.

MODALITA ESAME

RULES ESAME “ BIOLOGIA MOLECOLARE”

1. MODALITY OF THE EXAM:

The exam comprises a WRITTEN test that comprises two parts:

Short answer part:

11 Questions; 1 point/question

This part of the exam can consist: questions with multiple choice or questions with short written answers or questions that require a simple, schematic drawing/diagram as answer.

Detailed answer part:

4 Questions, 5 points/question

Questions of this part of the exam will address a general concept of molecular biology or central processes in molecular biology. Students are asked to give a detailed and focused answer (max. 1 page). A focus will be given on the use of specific scientific terms that relate to the respective topic of the question. The question can also be formulated in a manner that evaluates the logic understanding of topics addressed during the lecture.

Duration of the exam:

2 hours

What to bring:

Carta d'Identità

2 pens with different colors (useful for answers that require simple drawings)

Max. Points:

11+20 → **30** (31)

MODALITA ESAME

2. RESULTS OF THE EXAM:

Students that participated in a call/appello will be informed via e-mail when the results of the exam have been published. Results will be published on the Moodle federale (Moodle 2) webpage, where also the material for the lecture “Biologia Molecolare” is available. Students are asked to open the folder “RESULTS EXAM” and check the results of the respective appello/call.

3. REGISTRAZIONE VOTI

After publishing the results of the exam, students have 7 days time to decide whether they refute the vote.

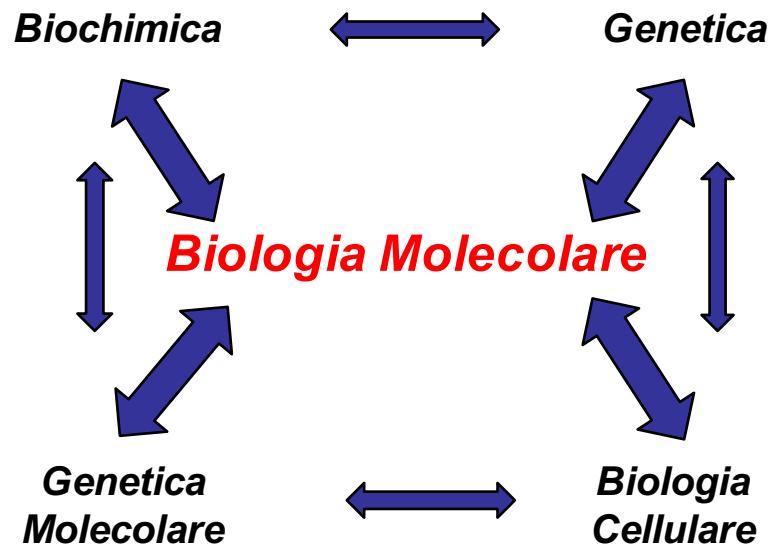
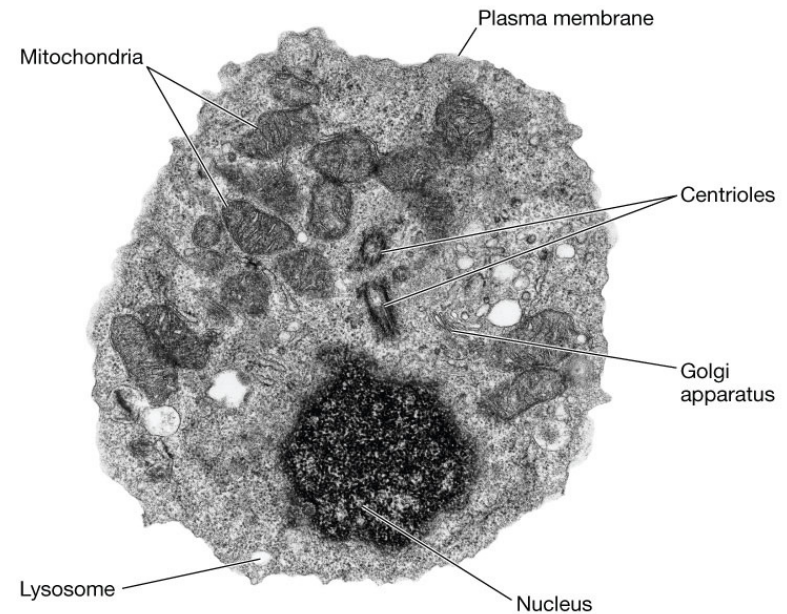
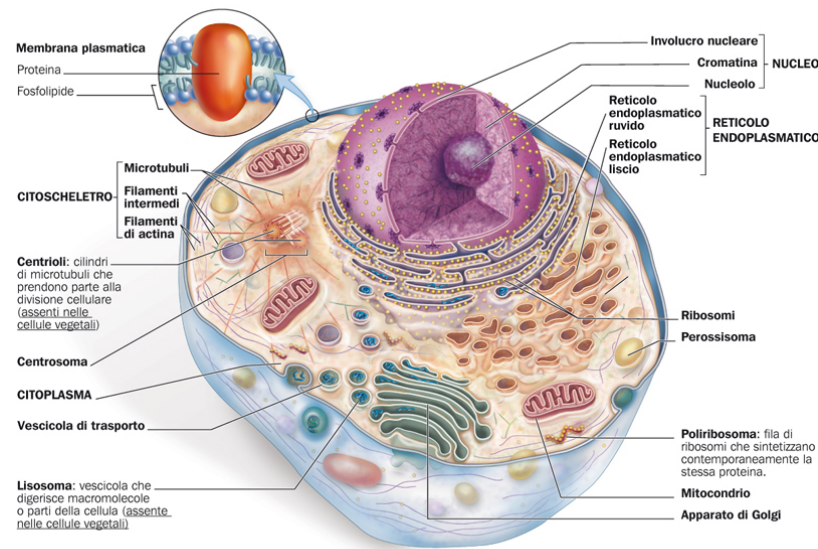
If a student desires to refute a voto, the student needs to use ESSE 3 – BIOLOGIA MOLECOLARE and make an inscription to an appello named “RIFIUTO VOTO – DATA APPELLO”. As a consequence the result of the respective appello will not be considered. If a student DOES NOT make an inscription to this list, the voto will be automatically used for registration.

IMPORTANT: 8 days after the publication of the voti in Moodle federale, it is no longer possible to refute the voto. At this point all voti will be used for registration (together with the voto from Biologia Cellulare (II semester)). NO EXCEPTIONS WILL BE MADE.

APPELLO STRAORDINARIO: SOLO PER STUDENTI FUORI CORSO O MOTIVI RELEVANTI

- **Comunicazione utilizzando esclusivamente l'indirizzo di posta istituzionale del ateneo**
 - **Chi sei (corso di laurea, etc...); Domanda/Interesse...**
- **Incontri e appuntamenti: dopo lezioni (da Gennaio 2018: via e-mail)**
- **Appelli straordinari: ...solo via rappresentati studenti**

BIOLOGIA MOLECOLARE – UNA DEFINIZIONE

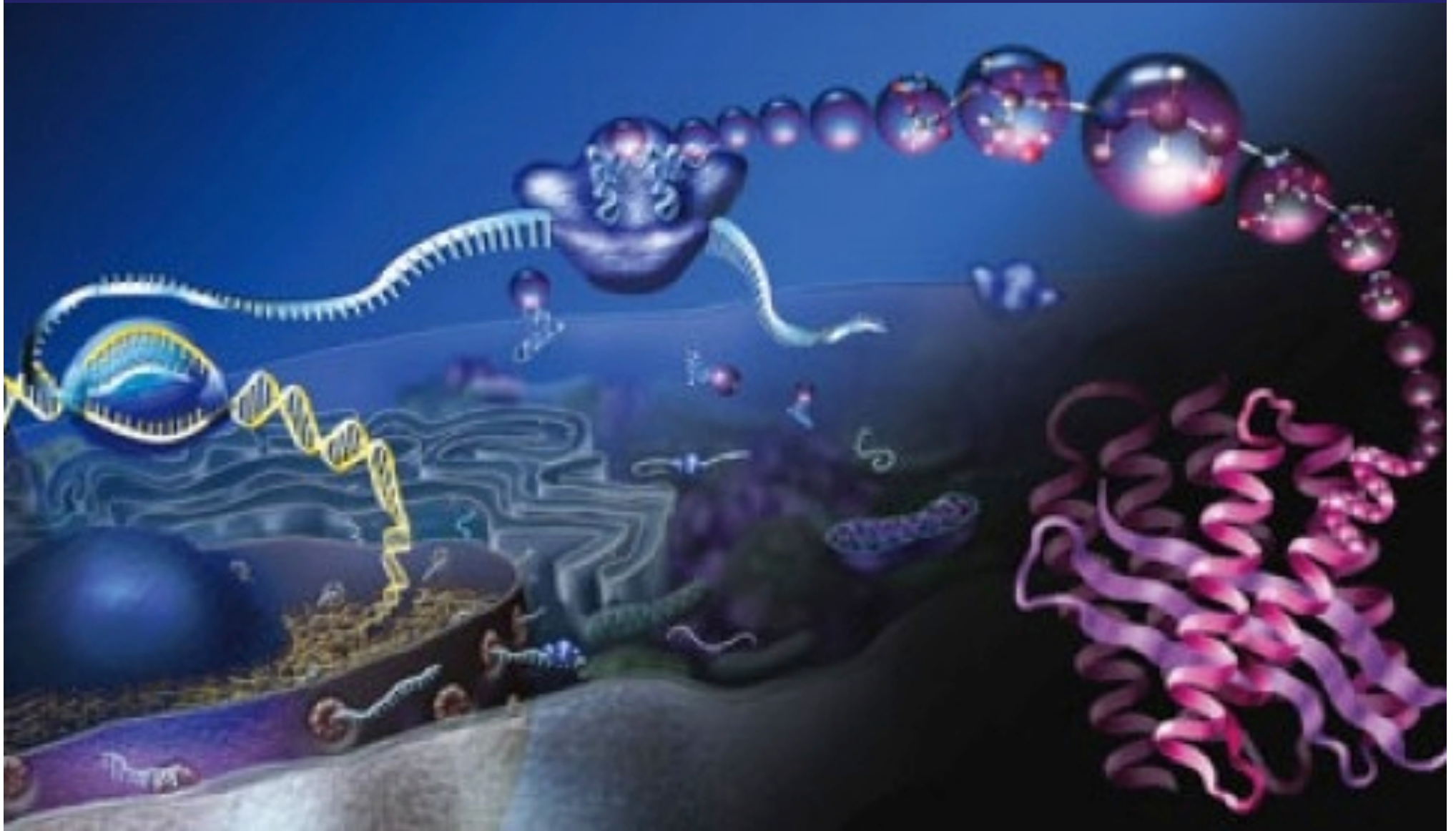


Il confine tra la **biologia molecolare** e le discipline affini, come la genetica e la biochimica era inizialmente molto chiaro, mentre oggi non è più ben definito. Una definizione classica vedeva infatti **la biologia molecolare come lo studio dei processi molecolari di replicazione, trascrizione, splicing e traduzione del materiale genetico**. La **genetica** classica si occupa invece dello studio dell'ereditarietà dei caratteri, servendosi per esempio dei mutanti: la **genetica molecolare** utilizza tecniche e nozioni della biologia molecolare al fine di studiare l'ereditarietà, fornendo un ponte tra queste due discipline. La **biologia cellulare** si occupa di meccanismi sul livello cellulare, La **biochimica** è lo studio delle sostanze chimiche e del metabolismo degli esseri viventi.

BIOLOGIA MOLECOLARE

Prof. Stefan Schoeftner

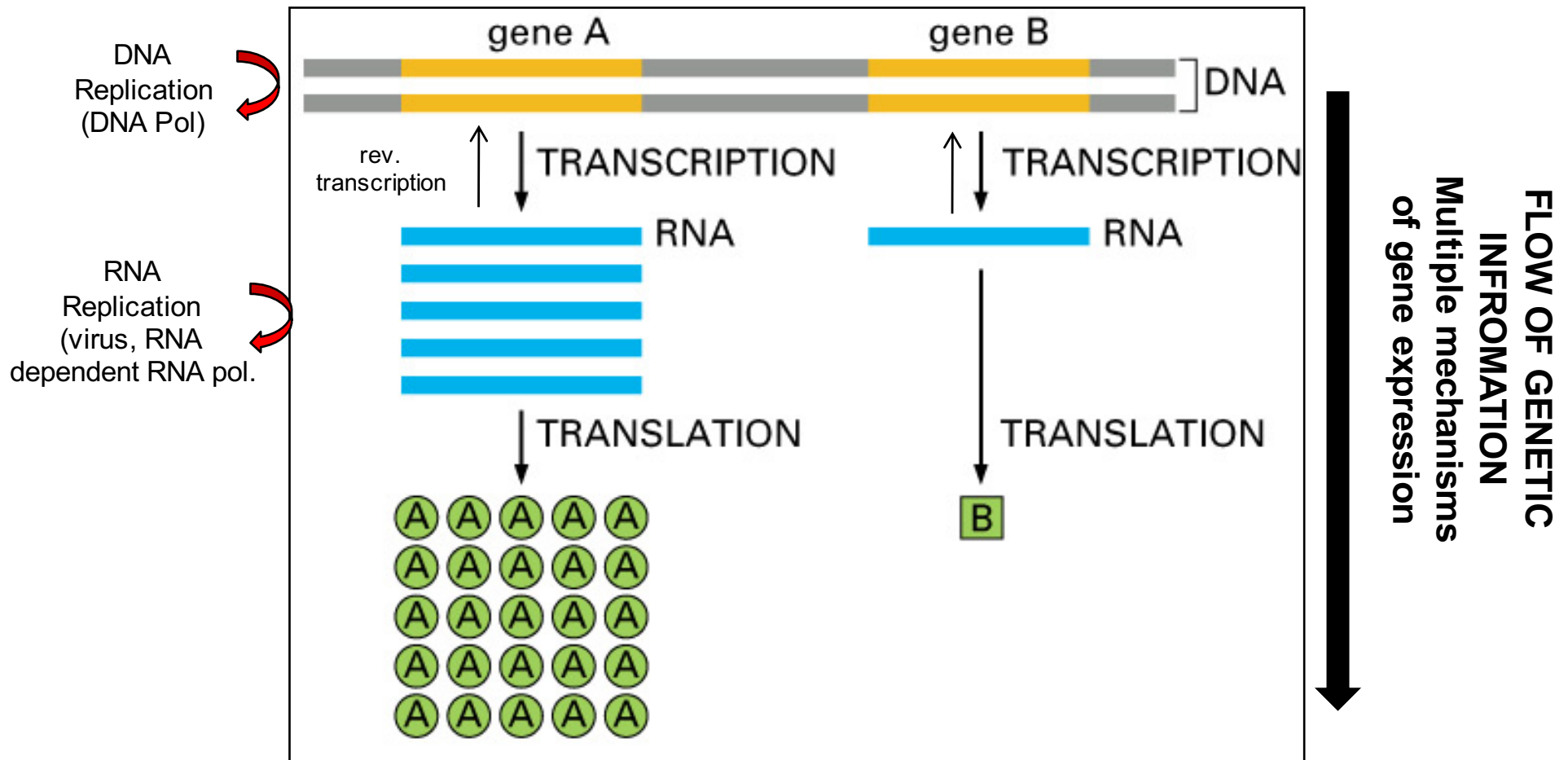
AA 2017/2018



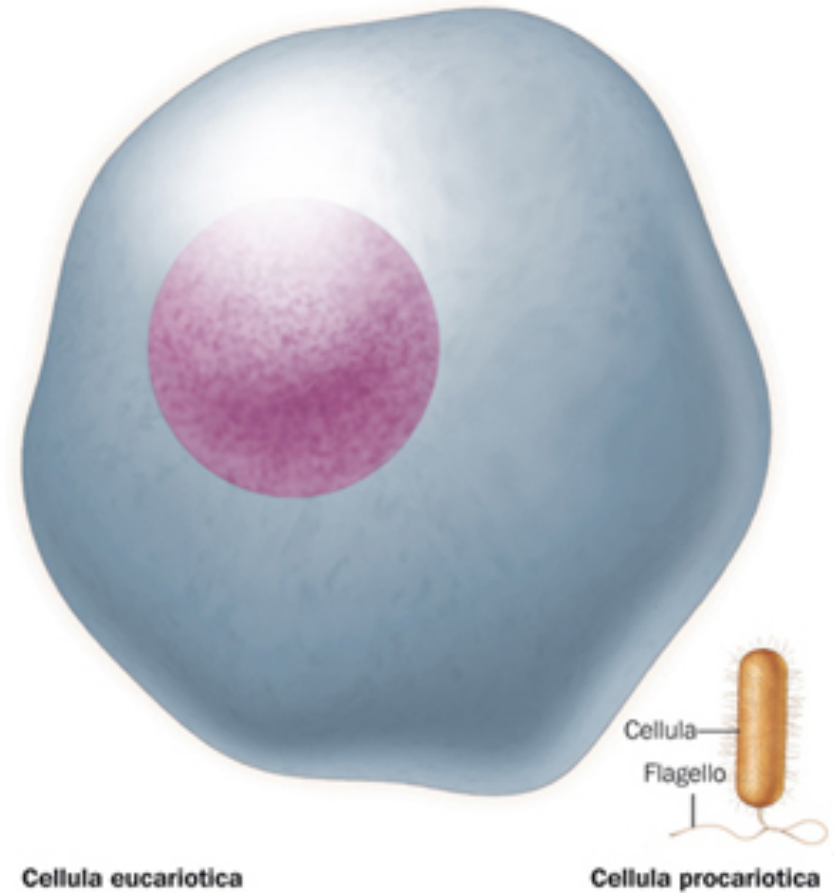
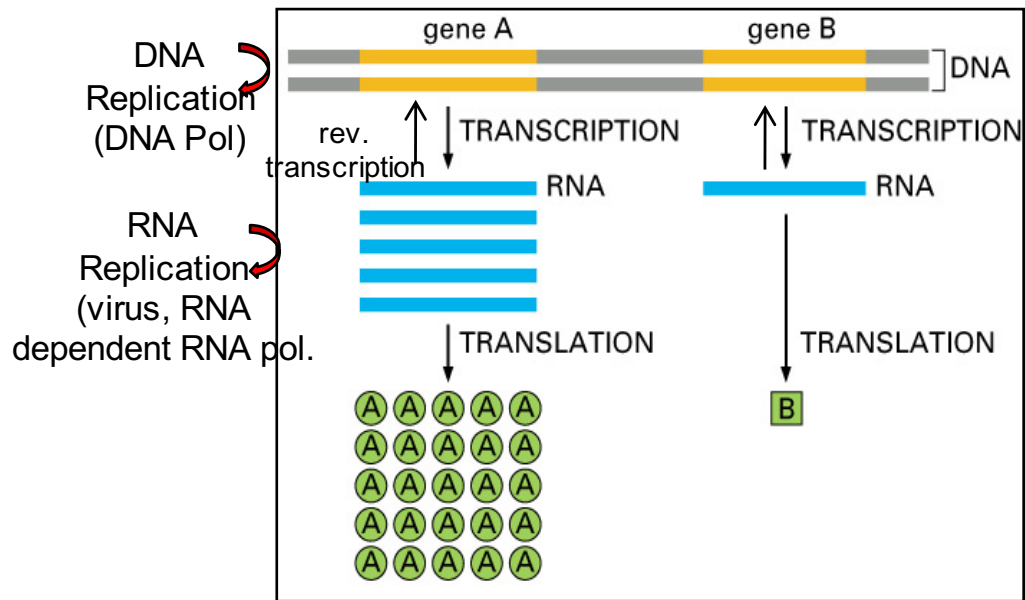
“IL DOGMA CENTRALE”

DNA → RNA → PROTEIN

***Crick, F (1970). "Central dogma of molecular biology.". Nature 227 (5258):
The central dogma of de molecular biology deals with the detailed residue-by-residue transfer of sequential information. It states that such information cannot be transferred back from protein to either protein or nucleic acid.***

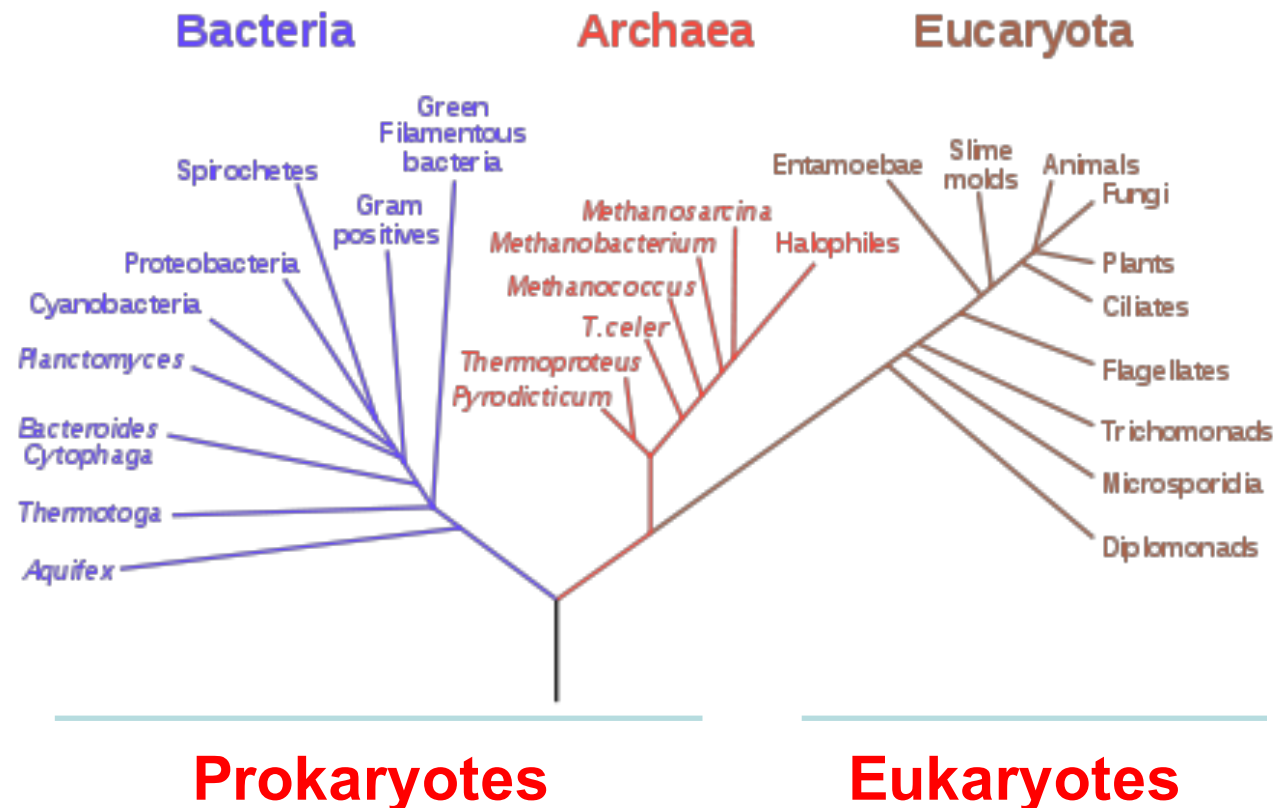


PRO- AND EUKARYOTES



L'albero della vita – The tree of life

Phylogenetic Tree of Life

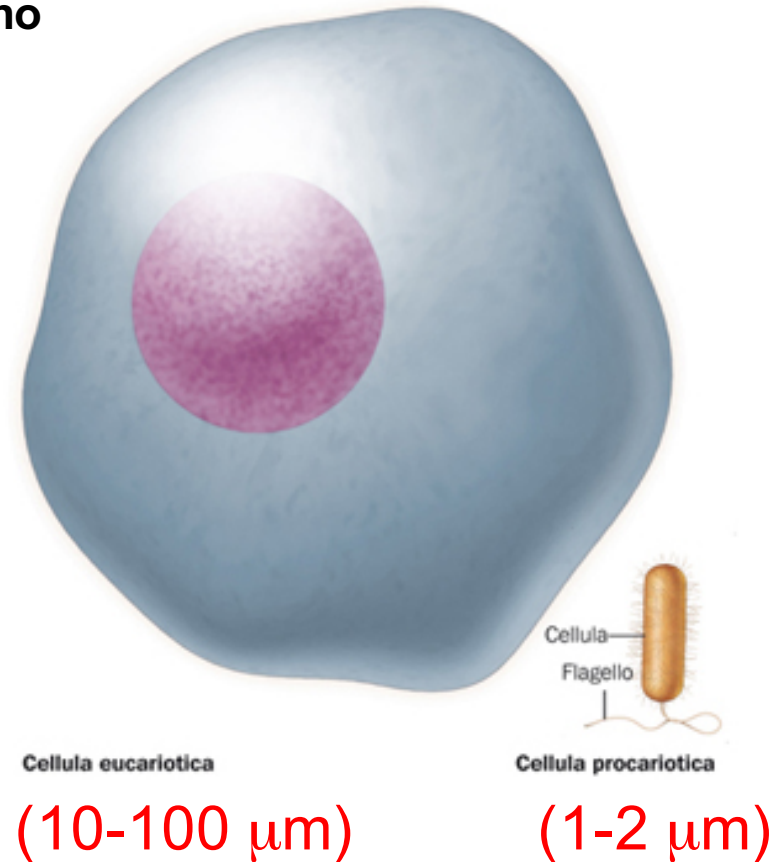
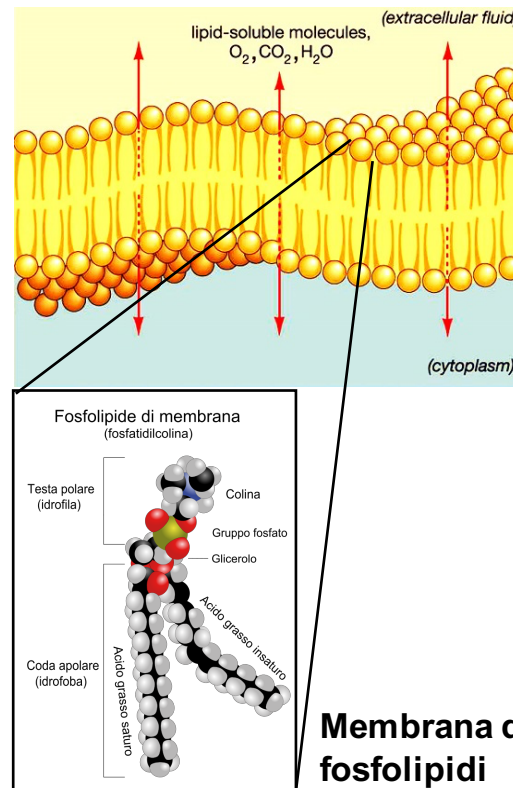
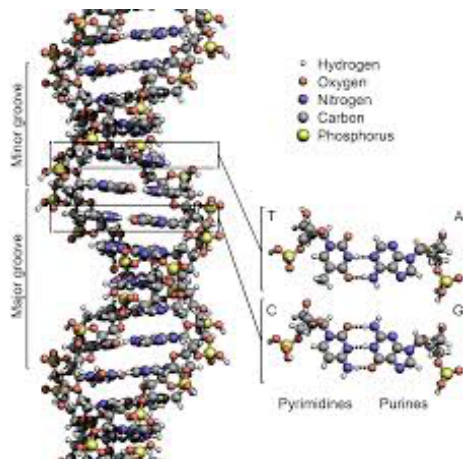


A phylogenetic tree based on 16S rRNA data, showing the separation of bacteria, archaea, and eukaryotes (3 domains/domini)

PROCARIOTI - EUCARIOTI

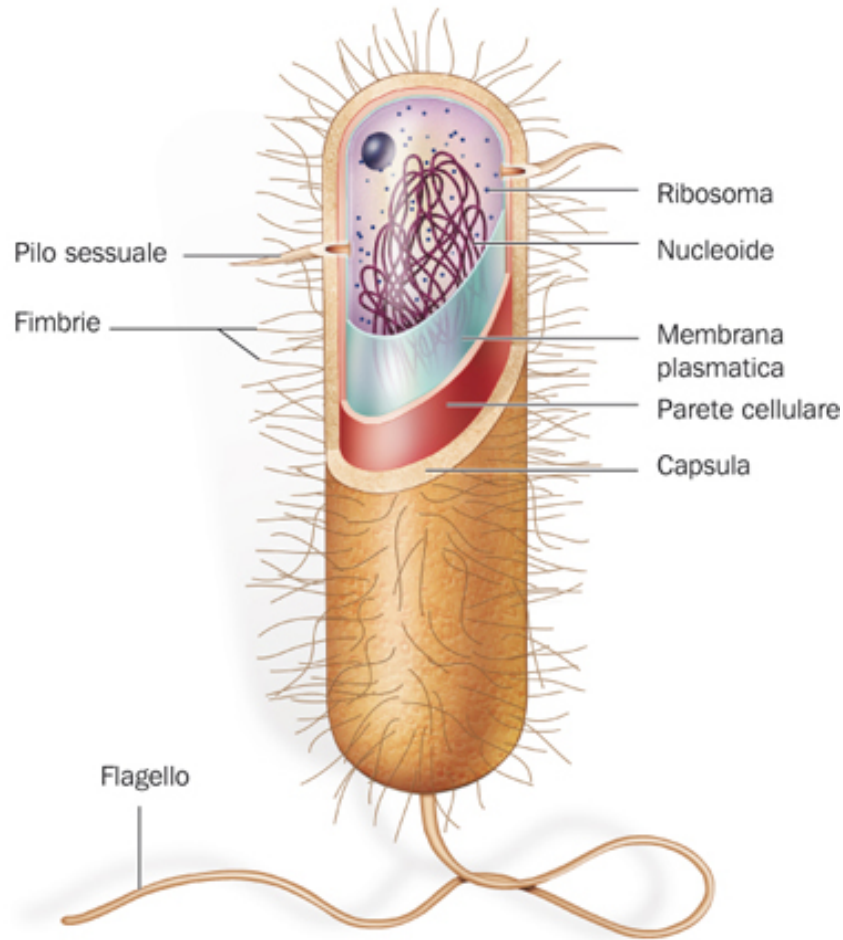
Le cellule procariotiche ed eucariotiche possiedono tre strutture comuni:

- il materiale genetico
- la membrana plasmatica;
- il citoplasma



Le cellule procariotiche sono molto *più piccole* di quelle eucariotiche e hanno una struttura di base *più semplice*.

PROCARIOTI - EUCARIOTI



Carl Woese, in base ad analisi della sequenza della subunita' minore dell'RNA ribosomale (rRNA 16S), ha indicato l'esistenza di tre domini (1977): Eucarioti/Archae/Bacterie

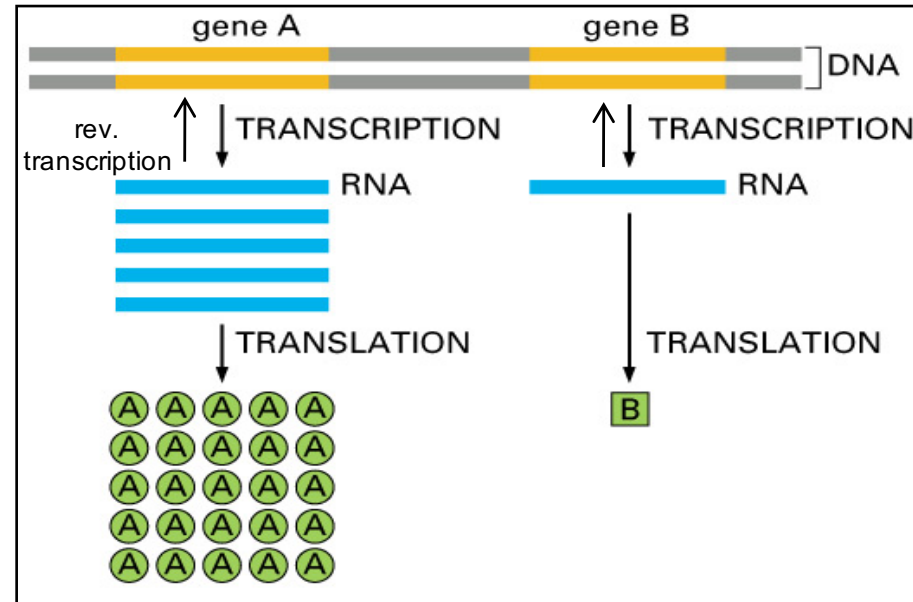
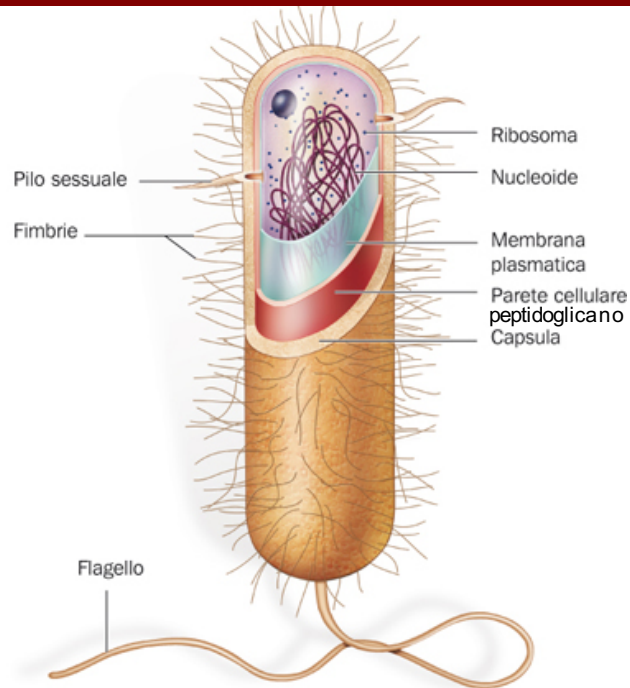
Le cellule procariotiche sono comparse per prime

Le cellule procariotiche (da *pro*, prima e *karyon*, nucleo) sono **prive di un nucleo** racchiuso da una membrana.

Gli organismi unicellulari costituiti da cellule procariotiche, i **procarioti**, sono classificati in due domini:

- **Archaea**
 - Senza peptidoglicano
 - Metanogeni
 - Lipidi con legami etere
 - Insensibili alla rifamicina che inattiva, selettivamente, la subunita' σ dell'RNA polimerasi)
 - Vivono in condizioni simili a quelle "della terra primitiva"
 - Alofili, termofili ed acidofili estremi
- **Bacteria**
 - Con parete di peptidoglicano
 - Sensibili alla rifamicina che blocca la trascrizione
 - Lipidi con legami estere

PROCARIOTI - EUCARIOTI



- La **membrana plasmatica** racchiude il materiale cellulare, lo separa dall'ambiente e regola il passaggio di sostanze cellula/esterno
- All'interno della membrana si trovano:
 - Il **citoplasma**, l'insieme del contenuto cellulare, comprendente:
 - il **citosol** (soluzione acquosa di piccole e grandi molecole)
 - alcune particelle insolubili tra cui i **ribosomi**
 - **nucleoside (materiale genetico + proteine strutturale)**

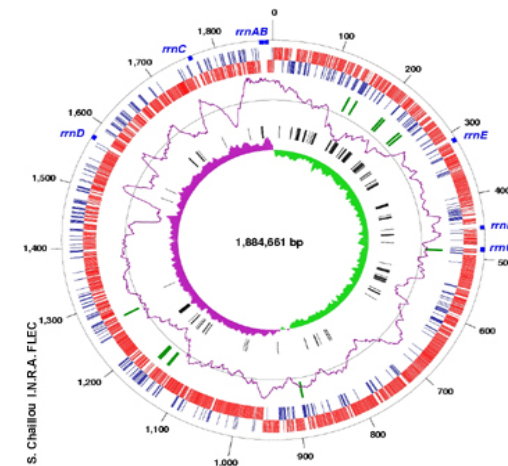
NO SEPERAZIONE SPAZIOTEMPORALE TRA TRASCRIZIONE, REPLICAZIONE E TRADUZIONE

PROCARIOTI - EUCARIOTI

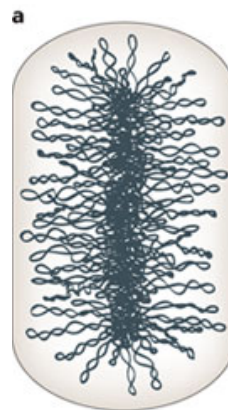
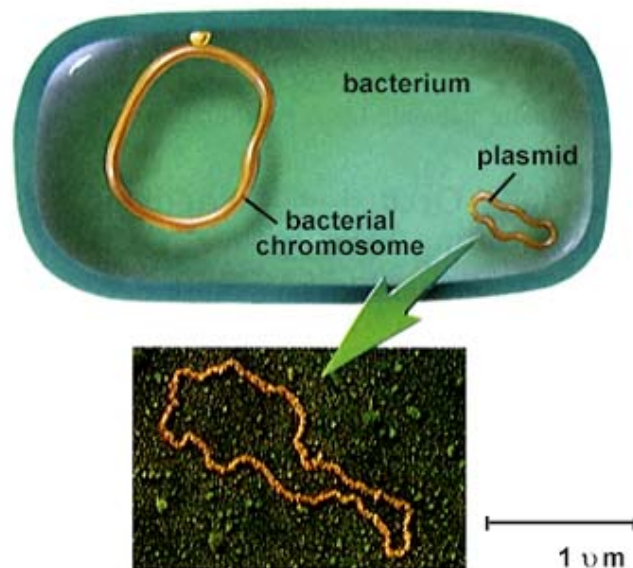
Il materiale genetico, il DNA, e' organizzato in un **singolo cromosoma circolare**, localizzato nell'area nucleare o **nucleoide**, una regione della cellula non delimitata da membrana.

1-2 μm (1.000.000 μm = 1m)

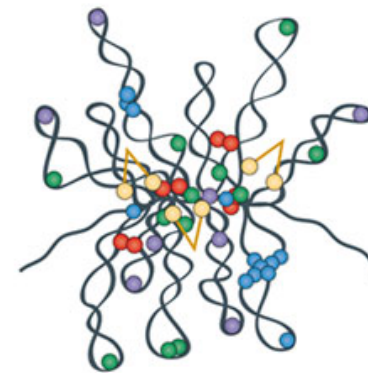
Geni:
E.coli: 3100
H. Sapiens: 20000



Batterie: 130.000 - 14.000.000 nucleotidi
Uomo: 3 234 830 000 nucleotidi



b Nucleoid-associated proteins and SMC complexes

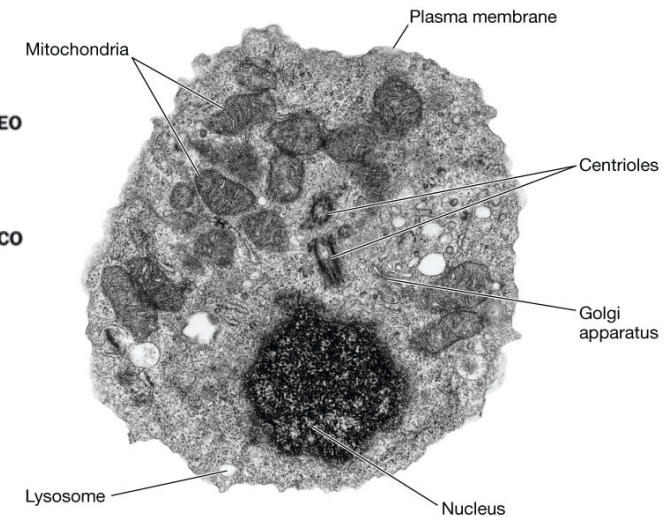
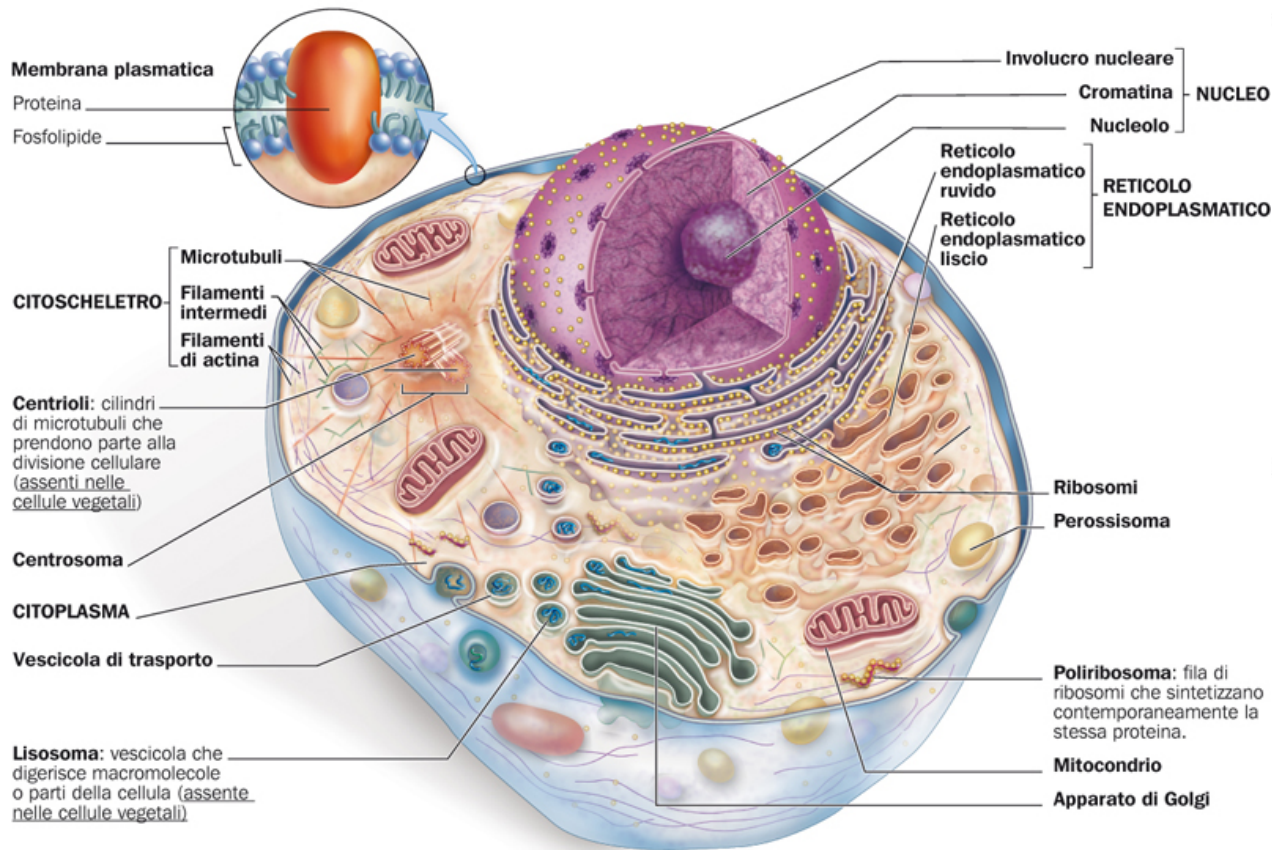


La cromatina mostra un livello di organizzazione molto basso (SMC like proteins)

- In aggiunta al DNA principale i batteri possono contenere piccole molecole di DNA circolare, dette **plasmidi**, che codificano per enzimi catabolici, per la resistenza ad antibiotici o legati a meccanismi per lo scambio di materiale genetico tra organismi.

PROCARIOTI - EUCARIOTI

CELLULA ANIMALE



10-100µm

Compartimenti specializzati

- Dimensioni: circa dieci volte più grandi delle cellule procariotiche (10-100 µm)
- La **membrana plasmatica** racchiude il materiale cellulare, lo separa dall'ambiente e regola il passaggio di sostanze cellula/esterno
- **Compartimentazione interna:** all'interno della membrana si trova il **citoplasma**, l'insieme del contenuto cellulare, comprendente il **citosol** (soluzione acquosa di piccole e grandi molecole) ed una serie di **organuli**, compartimenti **funzionalmente specializzati delimitati da membrana** o comunque strutturalmente separati (Apparato di Golgi; Mitocondrio; Reticolo endoplasmatico)

LEZIONE BIOLOGIA CELLULARE

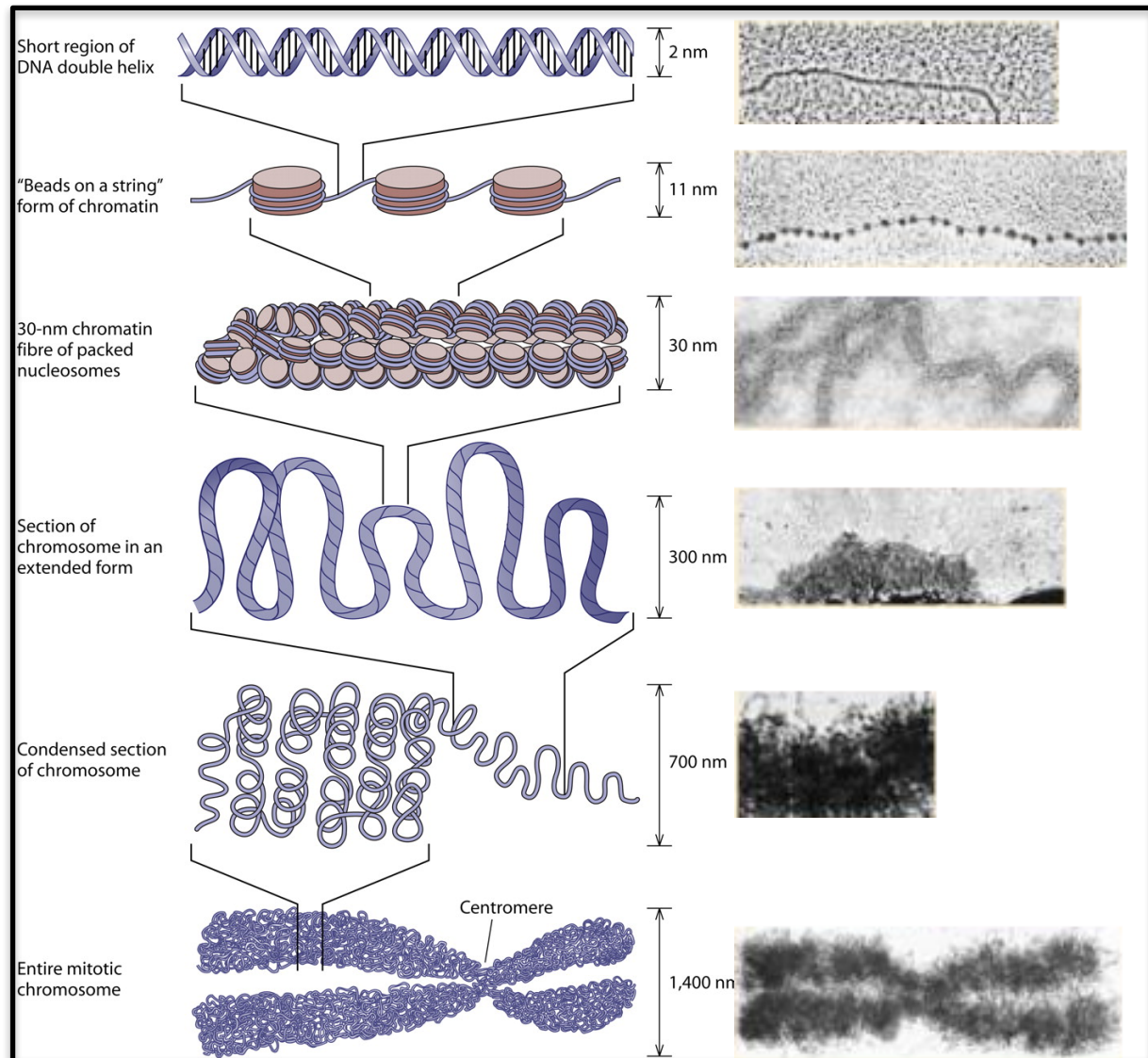
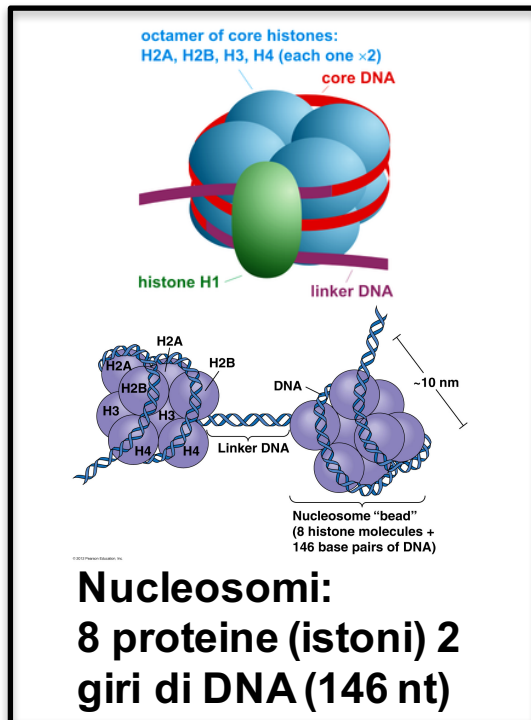
PROCARIOTI - EUCARIOTI

La cromatina eucariotica mostra un livello di organizzazione molto alto

La **cromatina** è la forma in cui gli acidi nucleici si trovano nella cellula.

Funzione:

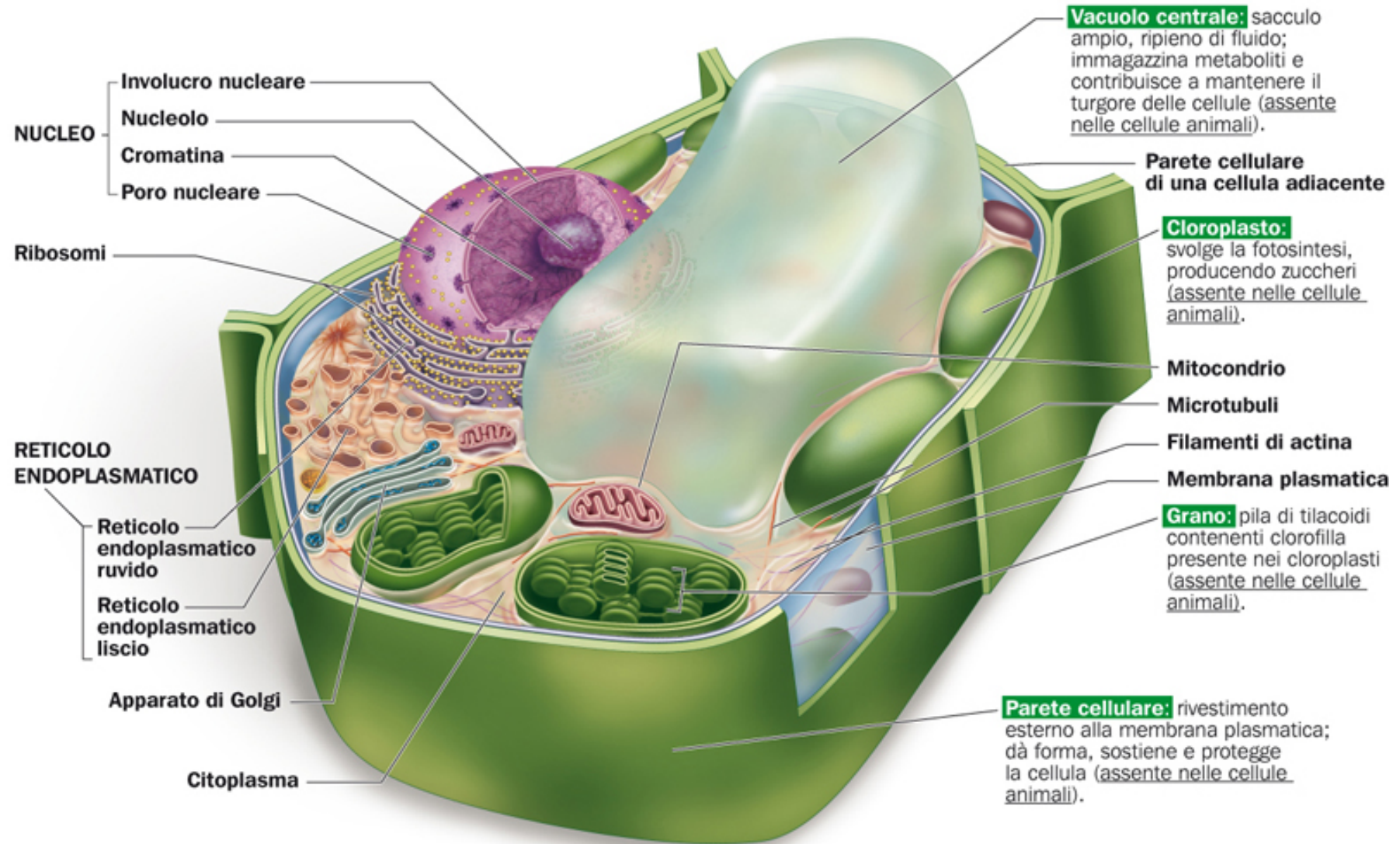
- impacchettamento del DNA
- rafforzare il DNA per permettere la mitosi
- prevenire danni al DNA
- controllare la replicazione del DNA e l'espressione (attività) del gene



UOMO: 3 000 000 000 nucleotidi = 1m di DNA per cellula
UOMO Adulto: 15 miliardi di cellule

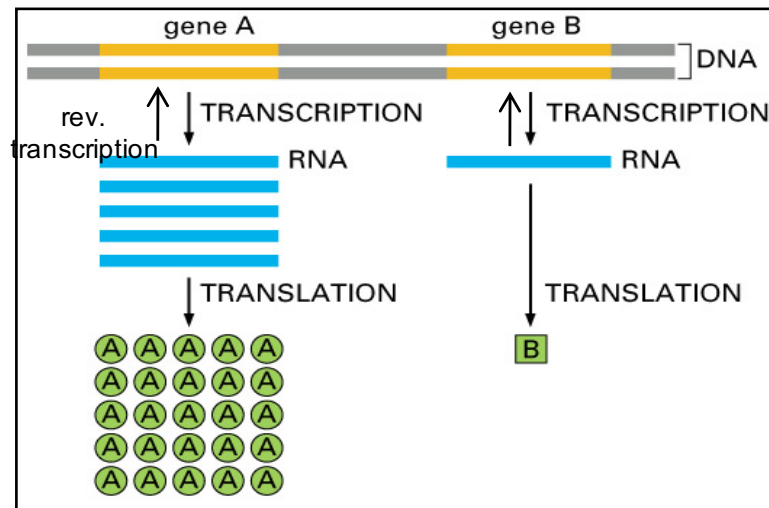
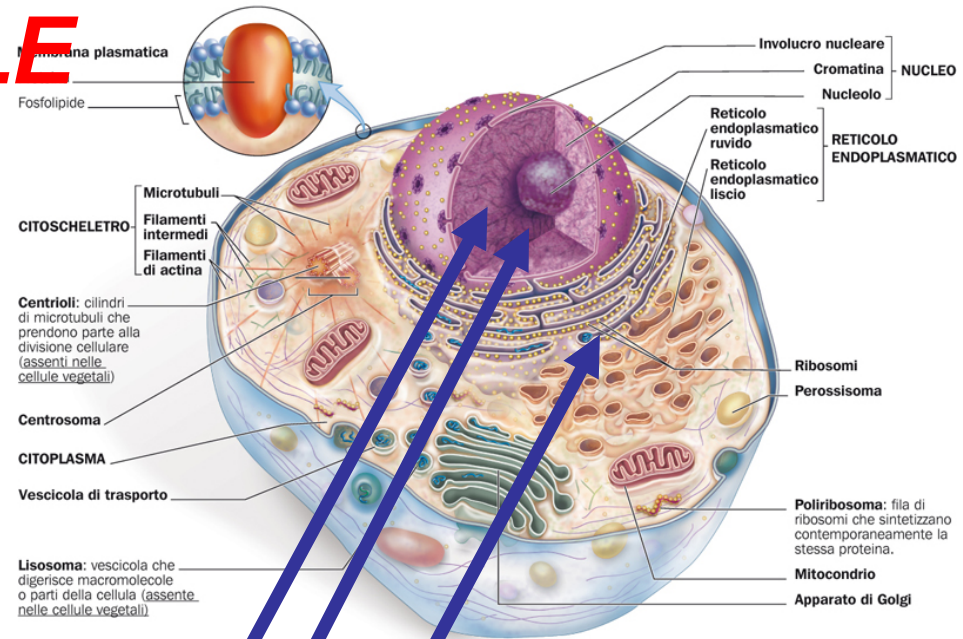
PROCARIOTI - EUCARIOTI

CELLULA VEGETALE



PROCARIOTI - EUKARIOTI

CELLULA ANIMALE

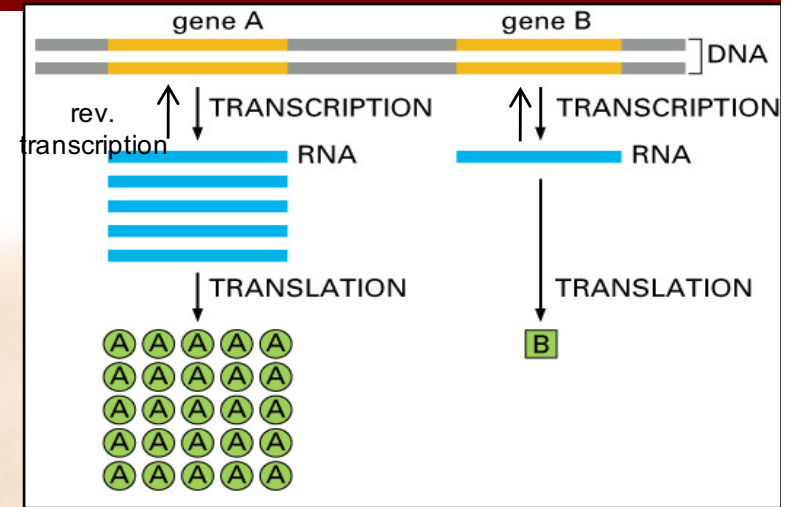
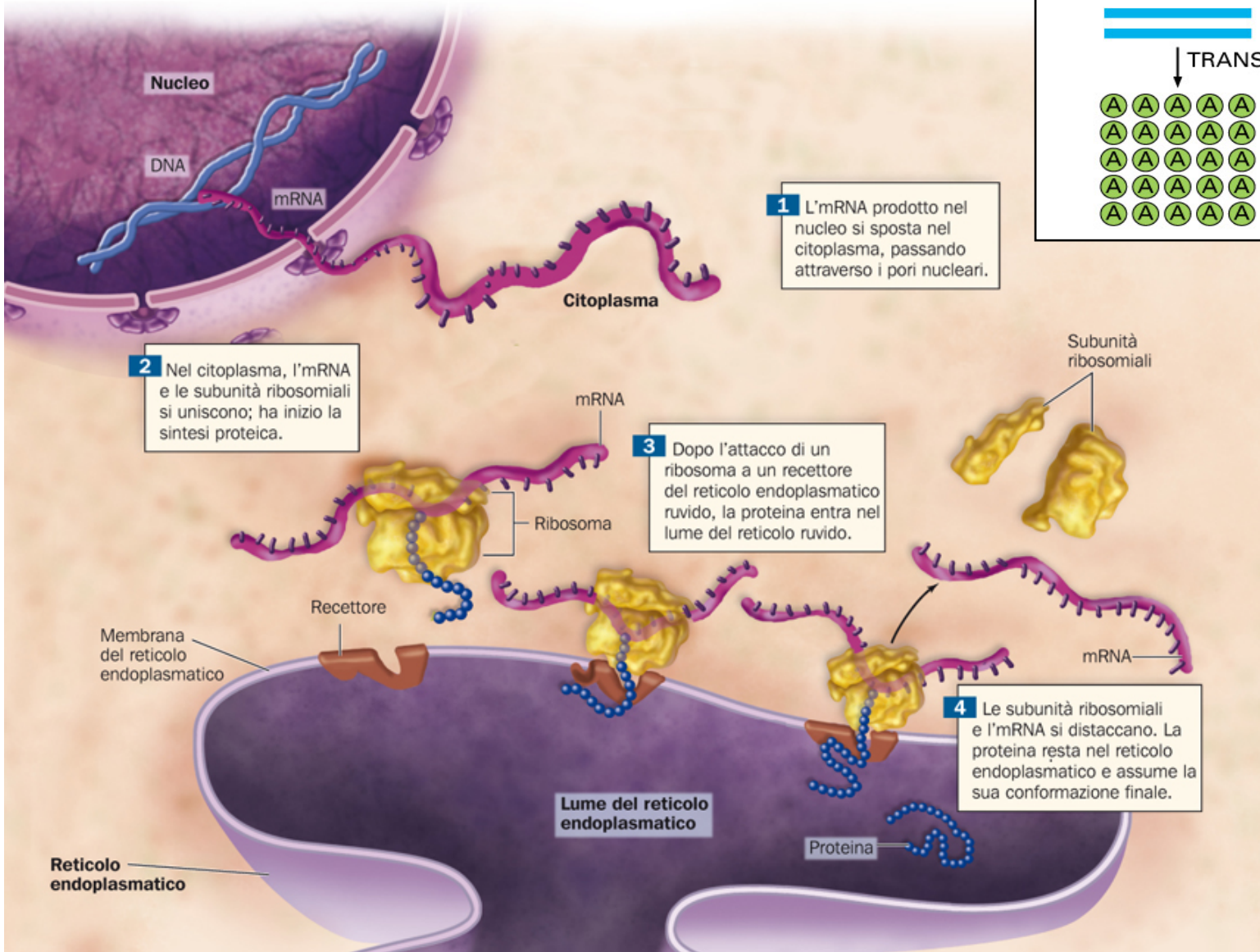


NUCLEUS

NUCLEUS

CITOPLASMA / ER

PROCARIOTI - EUKARIOTI

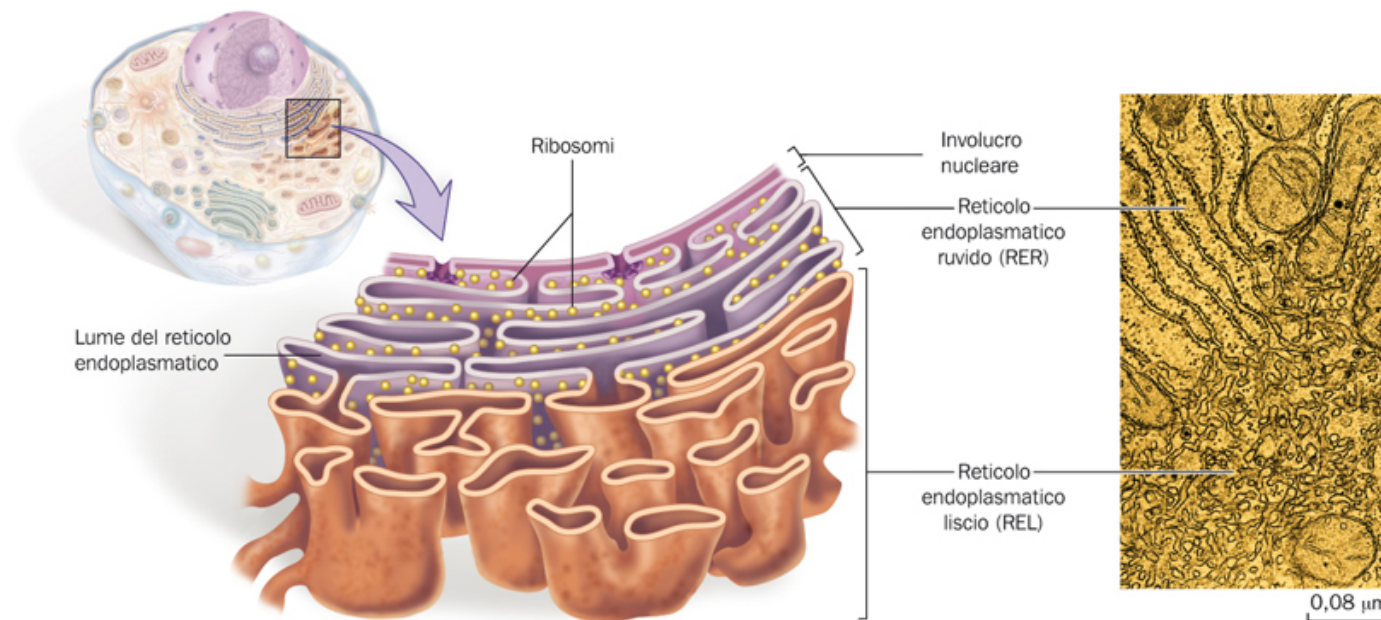


PROCARIOTI - EUCARIOTI

Il **reticolo endoplasmatico ruvido (RER)** è contraddistinto dalla presenza di *ribosomi* sulla membrana e sintetizza le *proteine*.

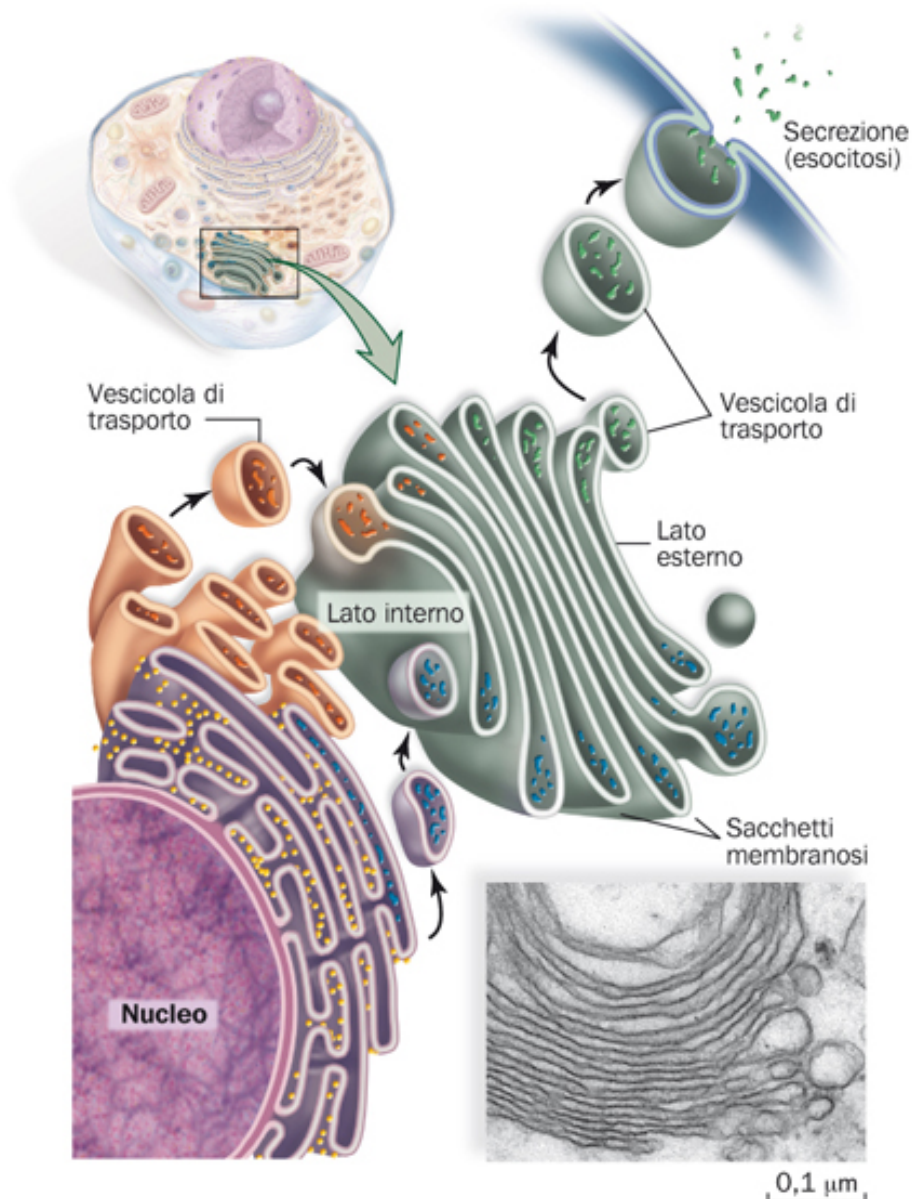
Il **reticolo endoplasmatico liscio (REL)** non presenta ribosomi alla superficie e sintetizza *lipidi* di vario tipo.

Proteine e lipidi vengono inglobati all'interno di **vescicole di trasporto** e diretti all'apparato di Golgi.



The outer **nuclear membrane** is continuous with the endoplasmic reticulum, so the space between the inner and outer **nuclear membranes** is directly **connected**

PROCARIOTI - EUCARIOTI



Transitando nell'apparato di Golgi, proteine e lipidi subiscono degli *interventi e trasformazioni* sostanziali.

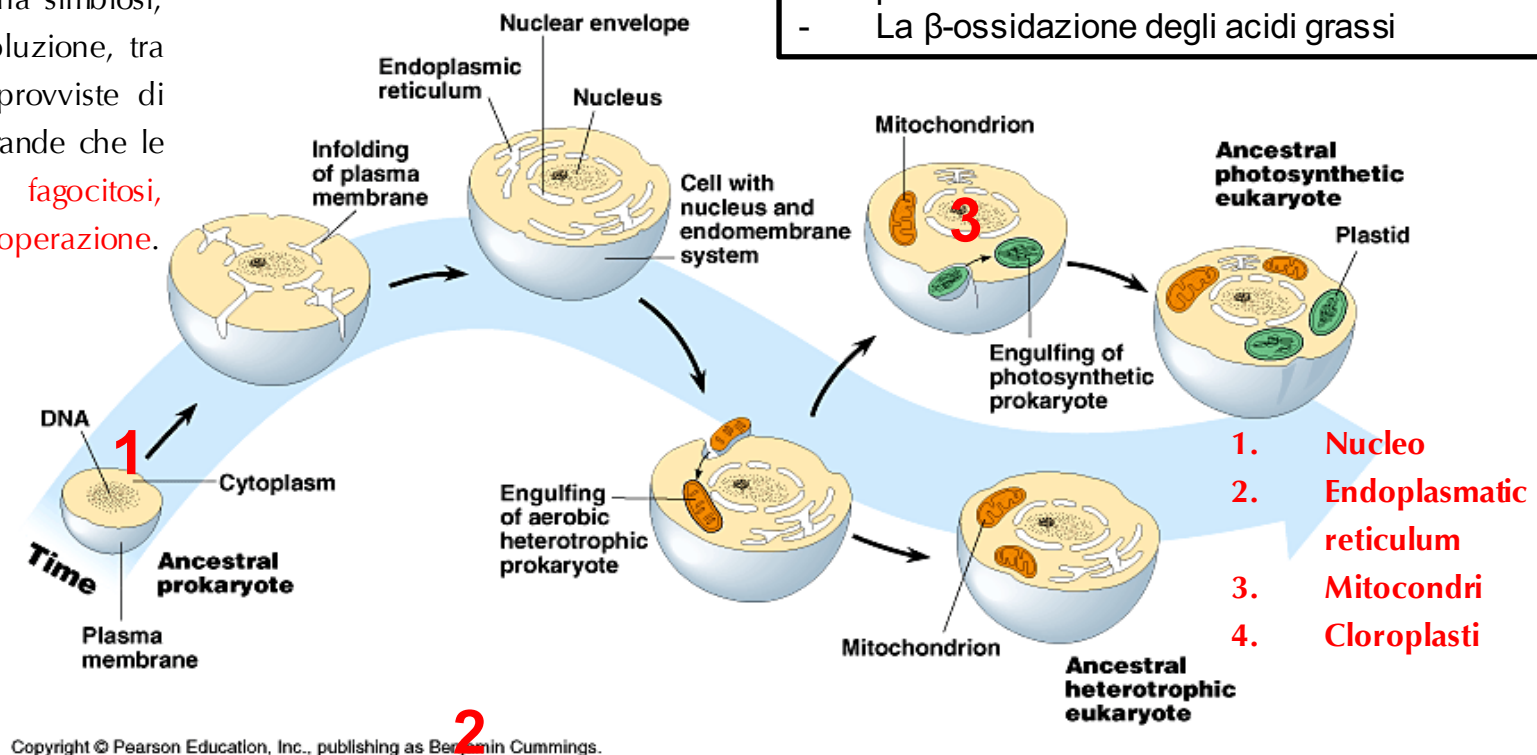
Le sostanze vengono quindi impacchettate in **vescicole di trasporto** e dirette verso la membrana plasmatica, dove avrà luogo la **secrezione** (o *esocitosi*).

PROCARIOTI - EUCARIOTI

La complessità della cellula eucariotica si è evoluta a partire da strutture preesistenti in cellule di procarioti ancestrali grazie ripetizioni seriali dei seguenti processi:

- **invaginazioni della membrana plasmatica**
- **endosimbiosi**

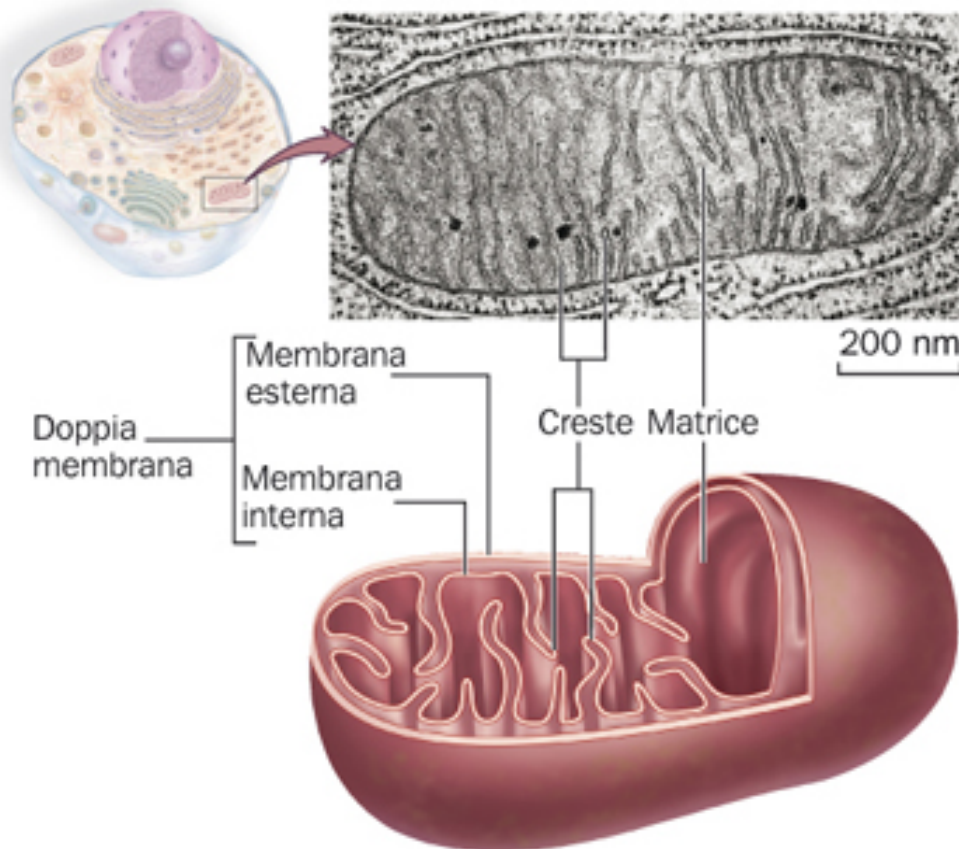
Teoria secondo la quale la cellula eucariota deriverebbe da una simbiosi, avvenuta nel corso dell'evoluzione, tra piccole cellule procariote provviste di plastidi e una cellula più grande che le avrebbe inglobate per **fagocitosi**, stabilendo un rapporto di cooperazione.



Mitocondrio

- Produzione energia (ATP)
- l'apoptosi e la morte neuronale da tossicità da acido glutammico
- regolazione del ciclo cellulare
- regolazione dello stato redox della cellula
- sintesi dell'eme
- sintesi del colesterolo
- produzione di calore
- La β -ossidazione degli acidi grassi

PROCARIOTI - EUCARIOTI



Mitocondrio

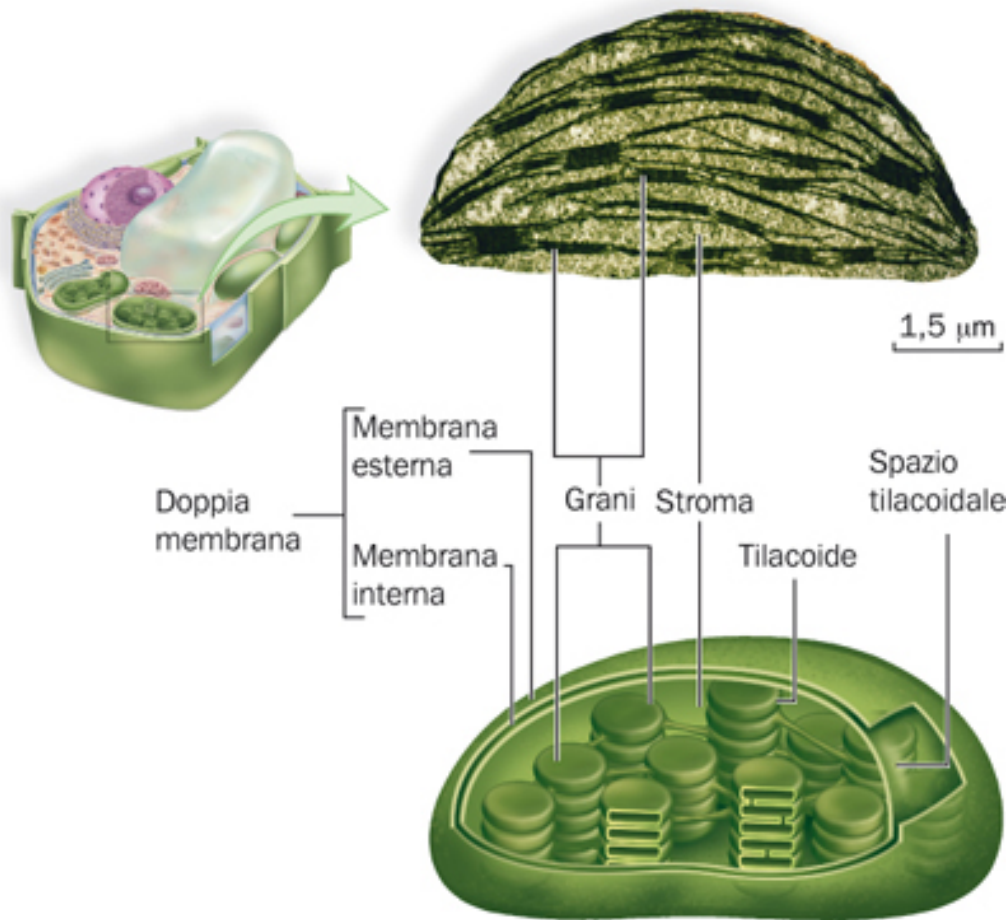
- Produzione energia (ATP)
- l'apoptosi e la morte neuronale da tossicità da acido glutammico
- regolazione del ciclo cellulare
- regolazione dello stato redox della cellula
- sintesi dell'eme
- sintesi del colesterolo
- produzione di calore
- La β -ossidazione degli acidi grassi

La *respirazione cellulare* ha sede nei mitocondri.

Essi sono suddivisi in comparti: la **membrana esterna**, lo **spazio intramembrana**, la **membrana interna**, le **creste** e la **matrice**.

Il *glucosio* viene demolito nella matrice, mentre nelle creste si produce l'*ATP*.

CELLULA VEGETALE



I cloroplasti svolgono *funzione fotosintetica*.

La doppia membrana dei cloroplasti racchiude un ampio spazio detto **stroma**, dove avviene la *sintesi dei carboidrati*.

La *clorofilla* che cattura la luce solare è invece localizzata nella **membrana dei tilacoidi**.

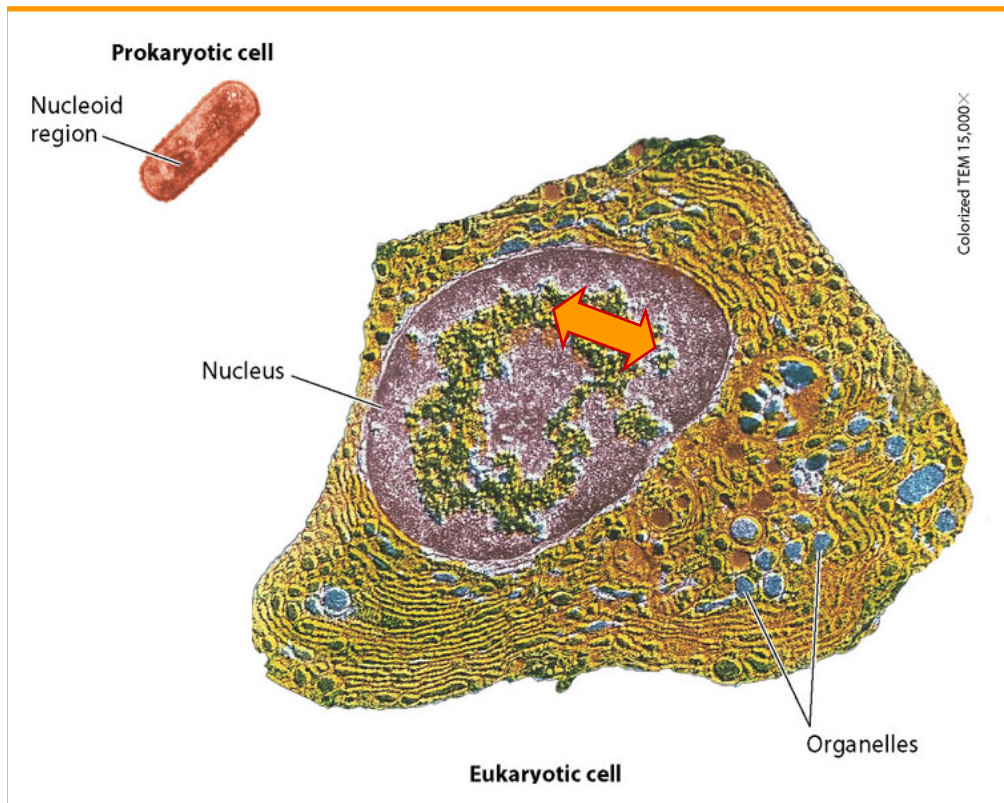
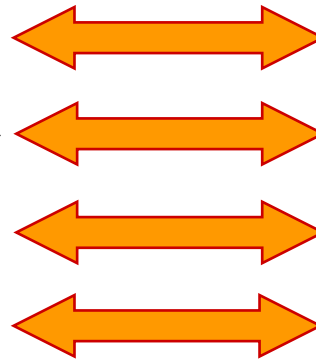
PROCARIOTI *CONTRO* EUCARIOTI

Procarioti

- No nucleo
- No organelli delimitati da membrana
- Parete cellulare con peptidoglicano
- Dimensioni: max alcuni micrometri (1-2 μm)

Eucarioti

- Nucleo
- Organelli delimitati da membrana
- Mai peptidoglicano anche in cellule con parete
- Dimensioni: possono essere 10-100 volte piu' grandi dei procarioti (10-100 μm)

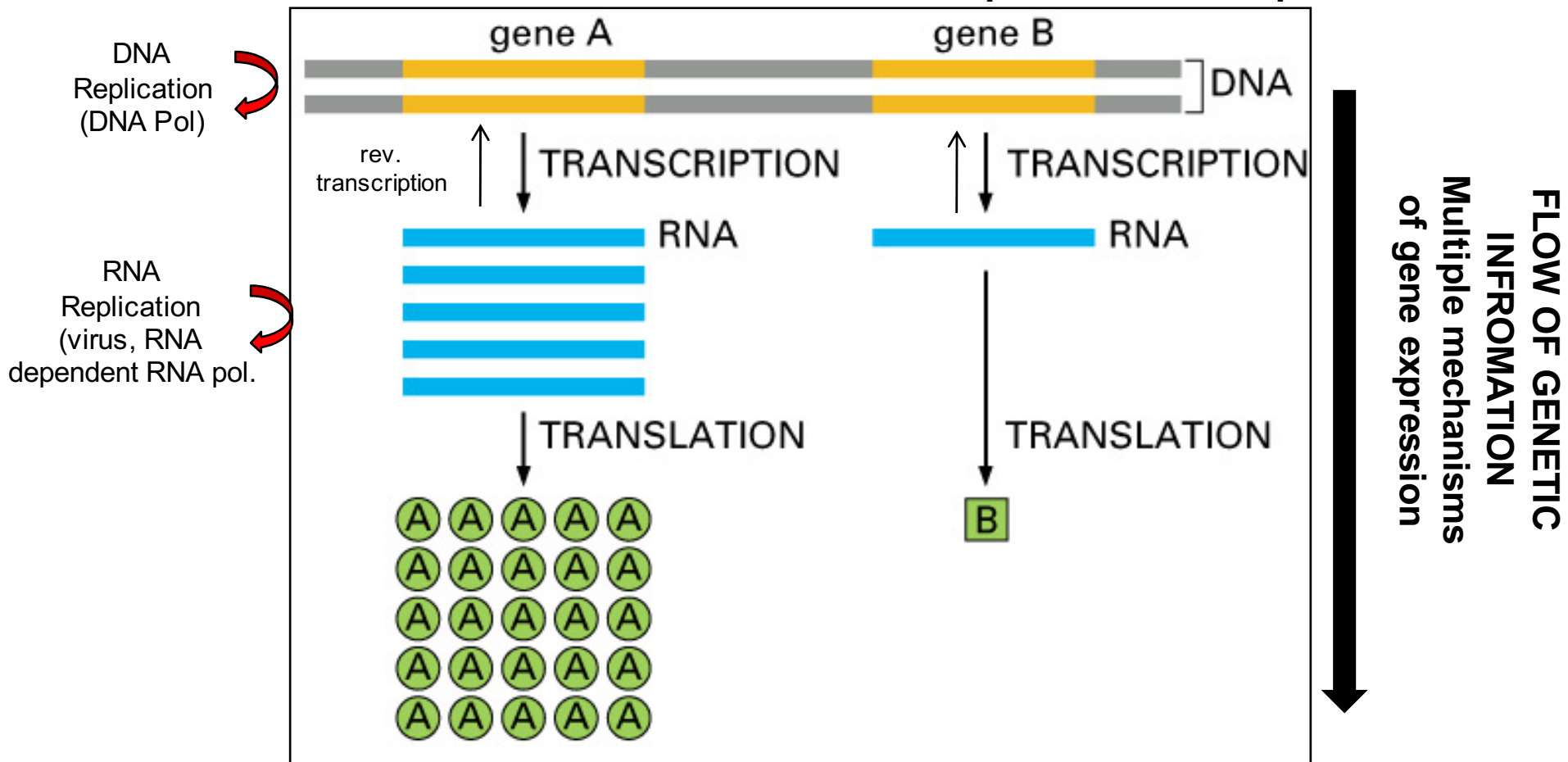


“IL DOGMA CENTRALE”

DNA → RNA → PROTEIN

Crick, F (1970). "Central dogma of molecular biology." Nature 227 (5258):

The central dogma of de molecular biology deals with the detailed residue-by-residue transfer of sequential information. It states that such information cannot be transferred back from protein to either protein or

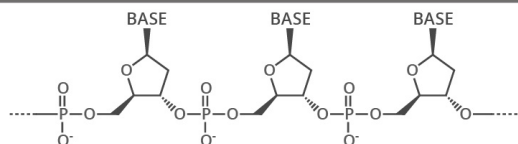


1. La struttura del DNA

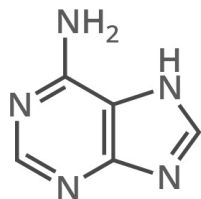
THE CHEMICAL STRUCTURE OF DNA

DNA (deoxyribonucleic acid) carries genetic information in all multicellular forms of life. It carries instructions for the creation of proteins, which carry out a wide range of roles in the body.

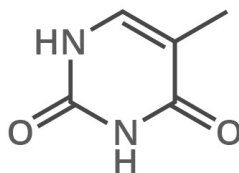
THE SUGAR PHOSPHATE 'BACKBONE'



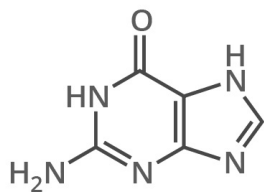
A ADENINE



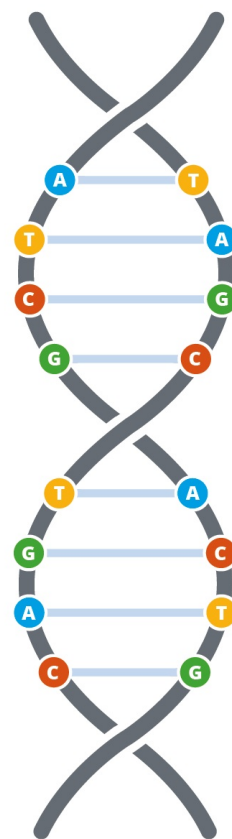
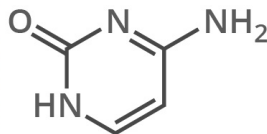
T THYMINE



G GUANINE

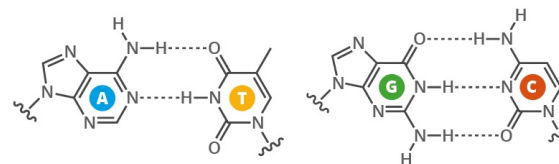


C CYTOSINE



WHAT HOLDS DNA STRANDS TOGETHER?

DNA strands are held together by hydrogen bonds between bases on adjacent strands. Adenine (A) always pairs with thymine (T), whilst guanine (G) always pairs with cytosine (C).



FROM DNA TO PROTEINS



The bases along a single strand of DNA act as a code. The letters form three letter 'words', or codons, which code for different amino acids - the building blocks of proteins.

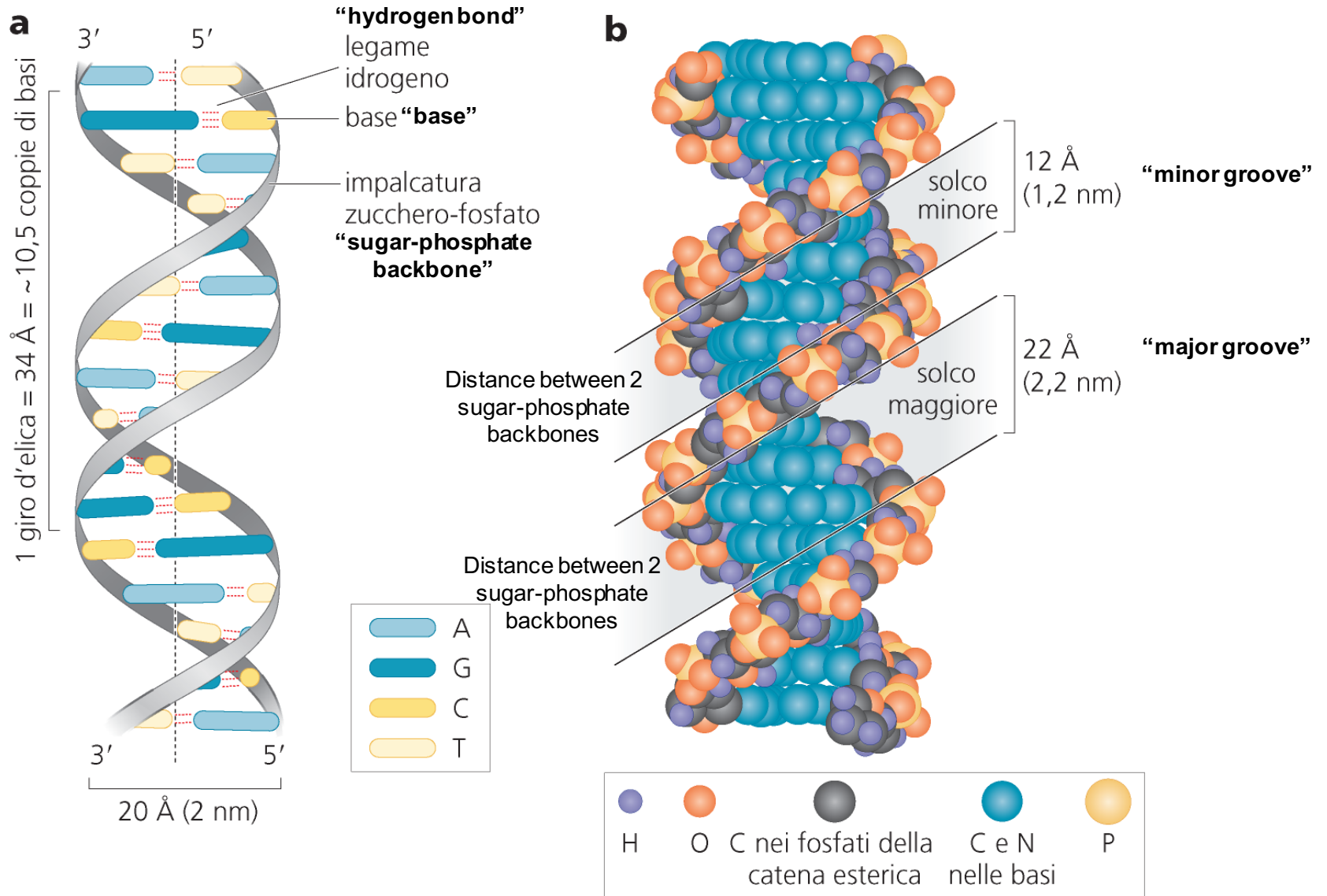
An enzyme, RNA polymerase, transcribes DNA into mRNA (messenger ribonucleic acid). It does this by splitting apart the two strands that form the double helix, then reading a strand and copying the sequence of nucleotides. The only difference between the RNA and the original DNA is that in the place of thymine (T), another base with a similar structure is used: uracil (U).

DNA SEQUENCE	T	T	C	C	T	G	A	A	C	C	C	G	T	T	A
mRNA SEQUENCE	U	U	C	C	U	G	A	A	C	C	C	G	U	U	A
AMINO ACID	Phenylalanine			Leucine		Asparagine	Proline			Leucine					

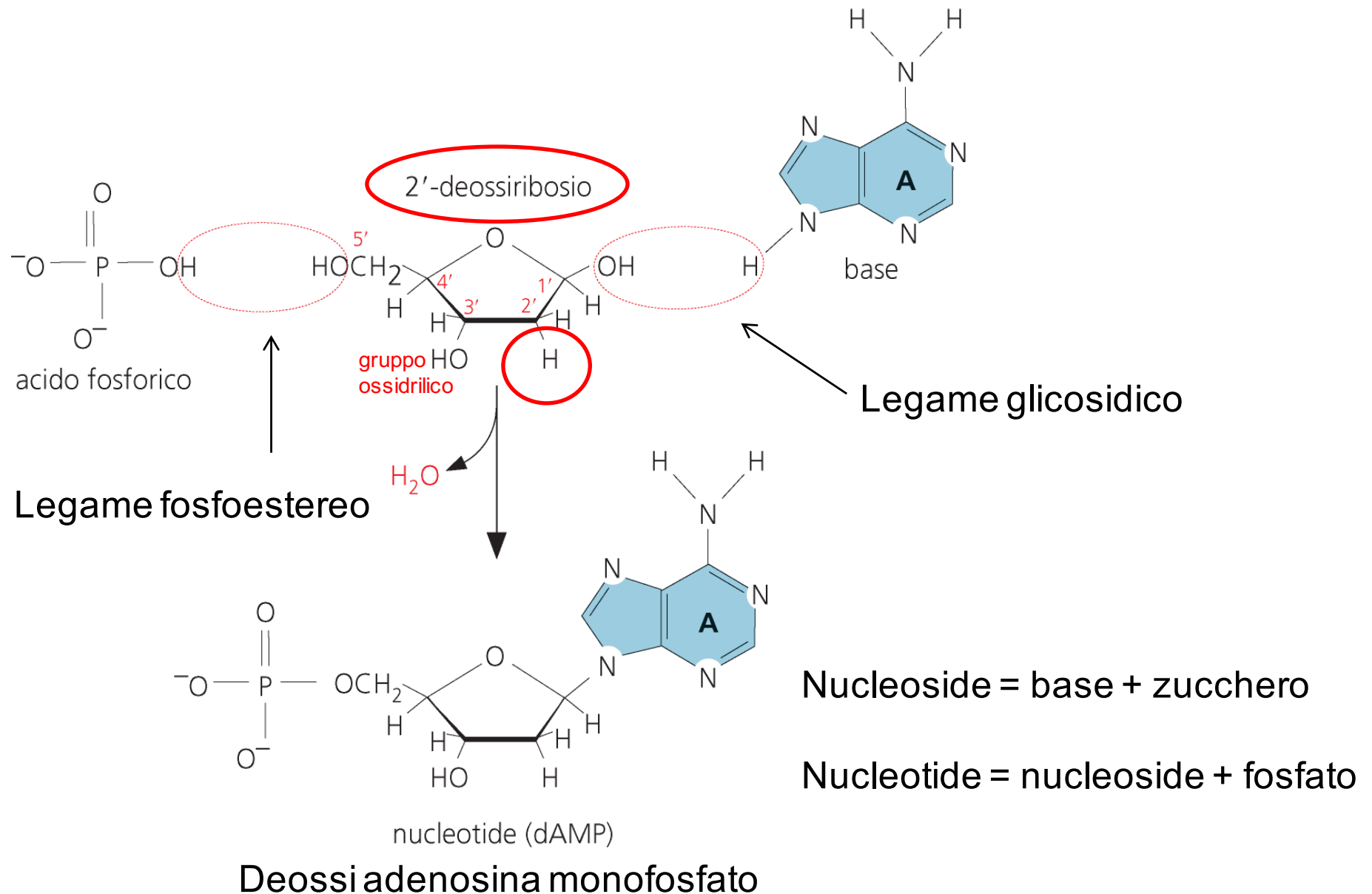
In multicellular organisms, the mRNA carries genetic code out of the nucleus, to the cell's cytoplasm. Here, protein synthesis takes place. 'Translation' is the process of converting turning the mRNA's 'code' into proteins. Molecules called ribosomes carry out this process, building up proteins from the amino acids coded for.



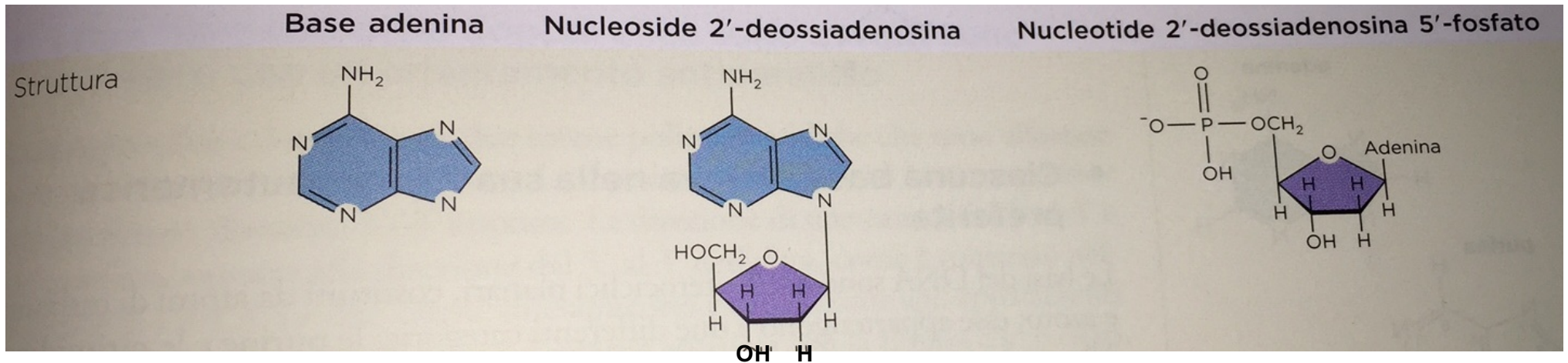
Il DNA è formato da catene polinucleotidiche



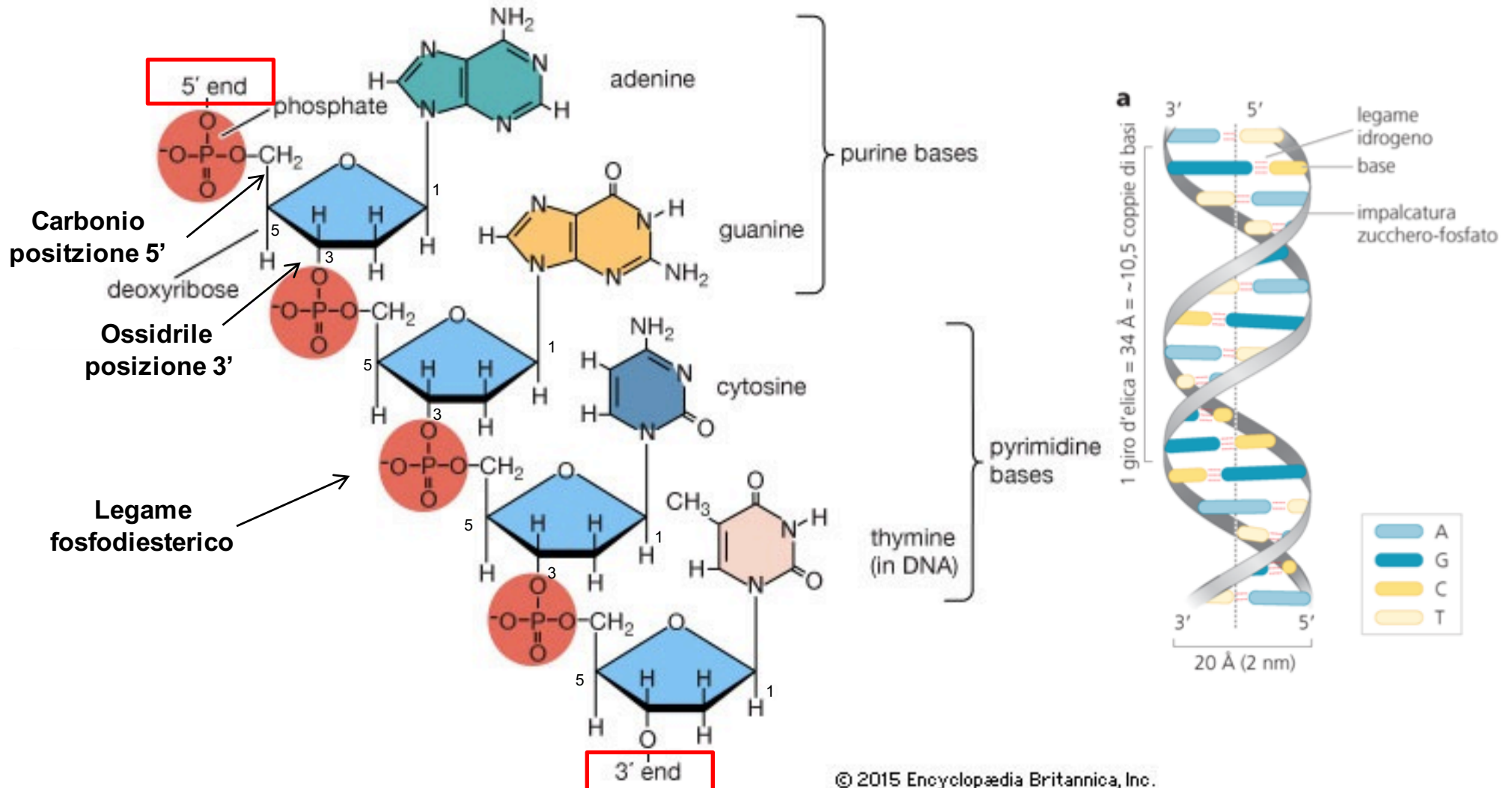
Un nucleotide consiste di un fosfato legato ad uno zucchero (2'-desossiribosio) a cui è attaccata una base



Un nucleotide consiste di un fosfato legato ad uno zucchero (2'-desossiribosio) a cui è attaccata una base



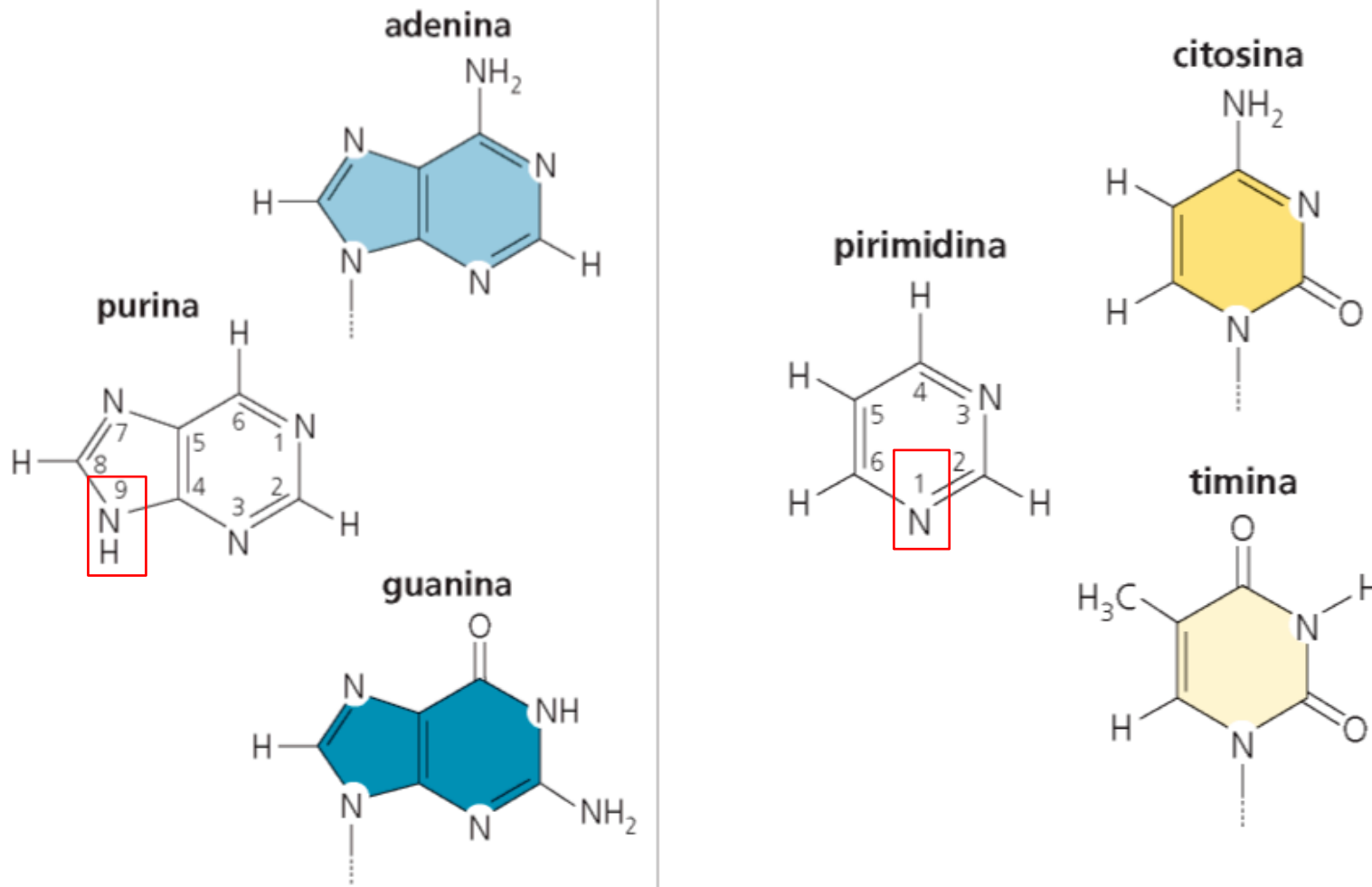
La polarità della catena polinucleotidiche (the polarity of polynucleotide chains)



Polarità: 5' → 3' (inizio sequenza DNA: "5' " ; terminus: "3' "

Purine e Pirimidine

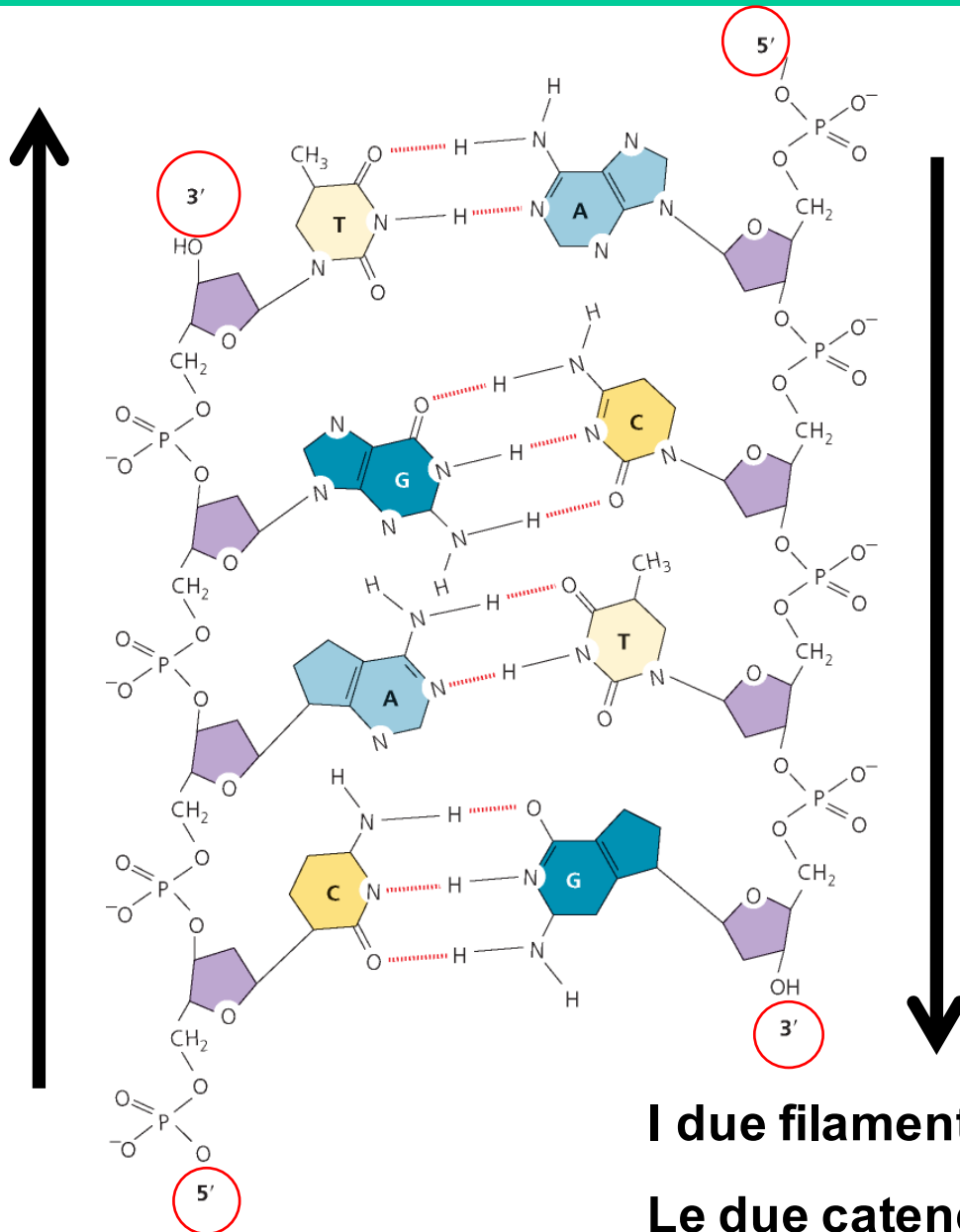
esame



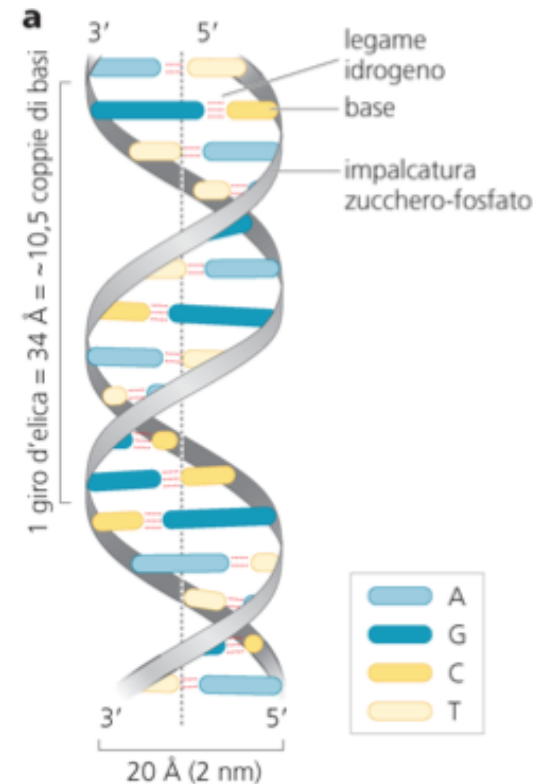
Basi purine : doppio anello con diversi gruppi legati
Basi pirimidine : singolo anello con diversi gruppi legati

Legate al gruppo glicosidico mediante N9 (purine) o N1 (pirimidine)

La struttura del DNA a doppio filamento



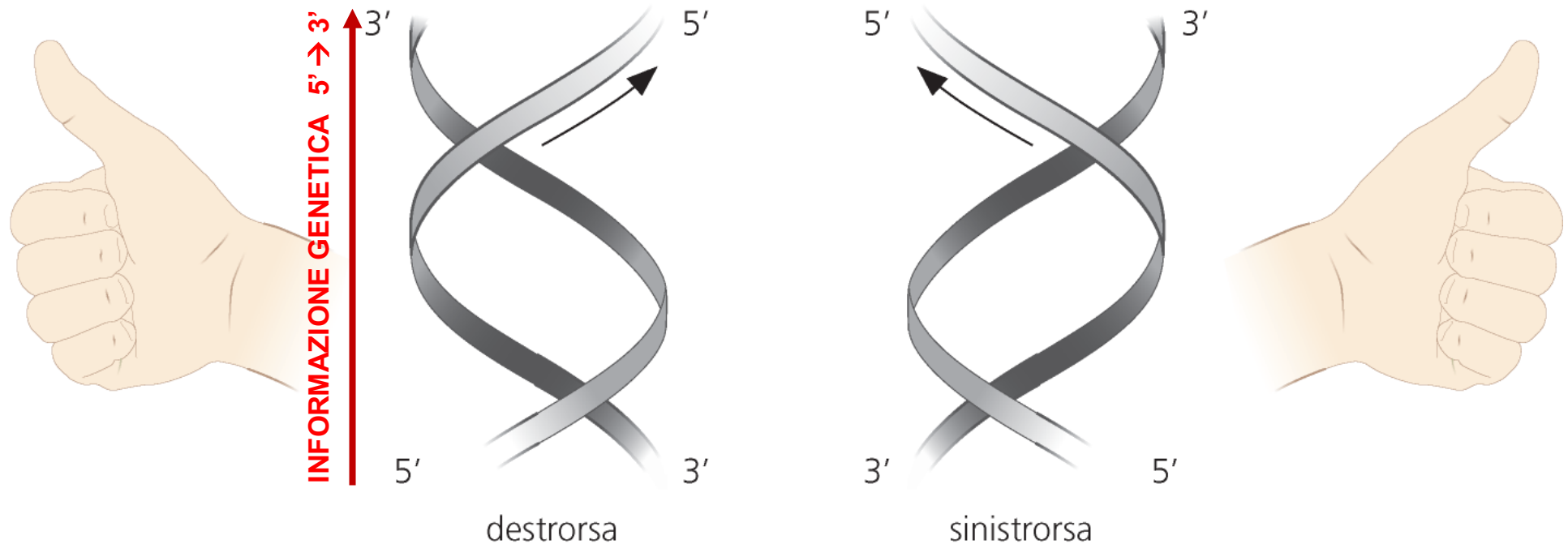
Polarità delle catene
5' -> 3'



I due filamenti della doppio elica sono antiparalleli

Le due catene della doppia elica hanno sequenze complementari

Il DNA è normalmente una doppia elica destrorsa

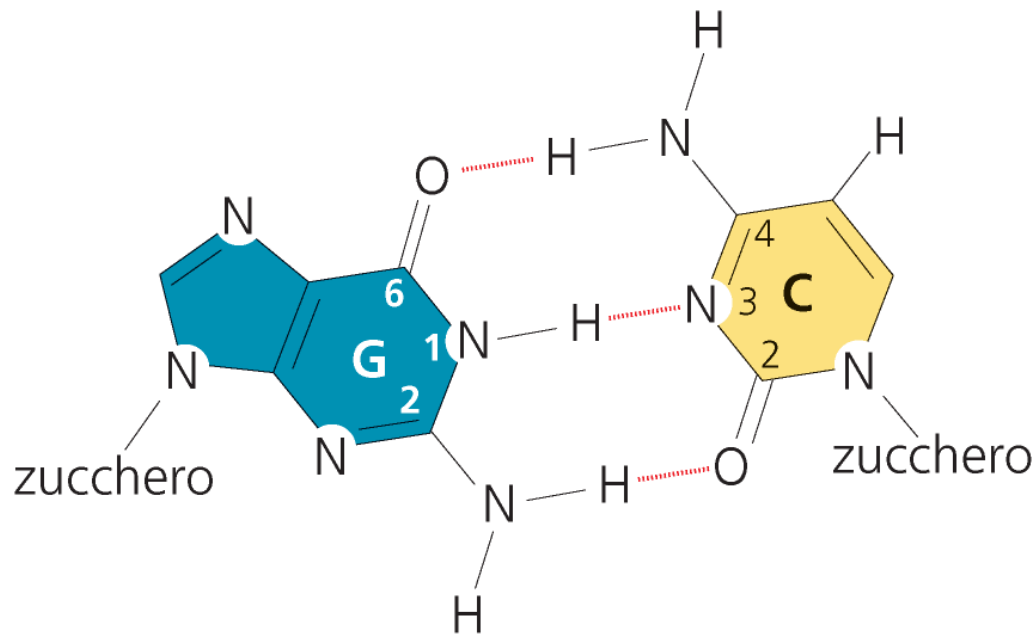


Periodicità della struttura:

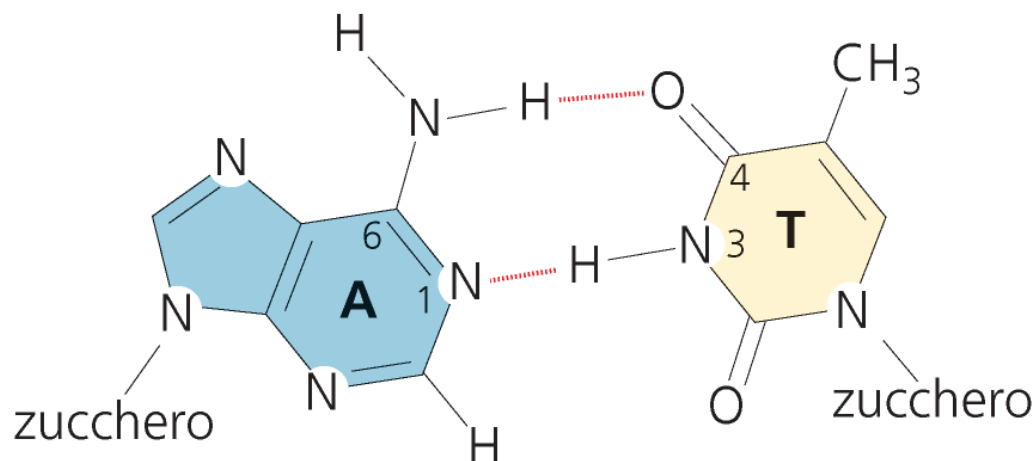
Laboratorio DNA “nuda” 10 pb ogni giro d’elica (360°)

Cellule DNA con proteine: 10.5 pb ogni giro d’elica

LA REGOLA DI WATSON CRICK: A-T; C-G



L'appaiamento secondo la **regola di Watson-Crick** richiede la corretta forma tautomerica

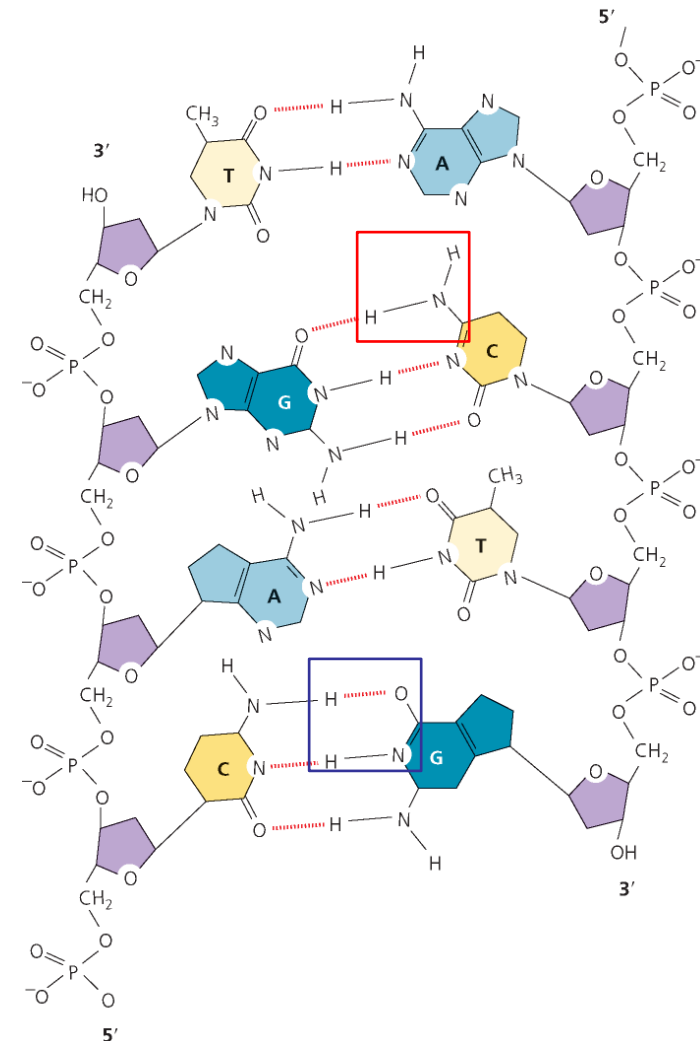
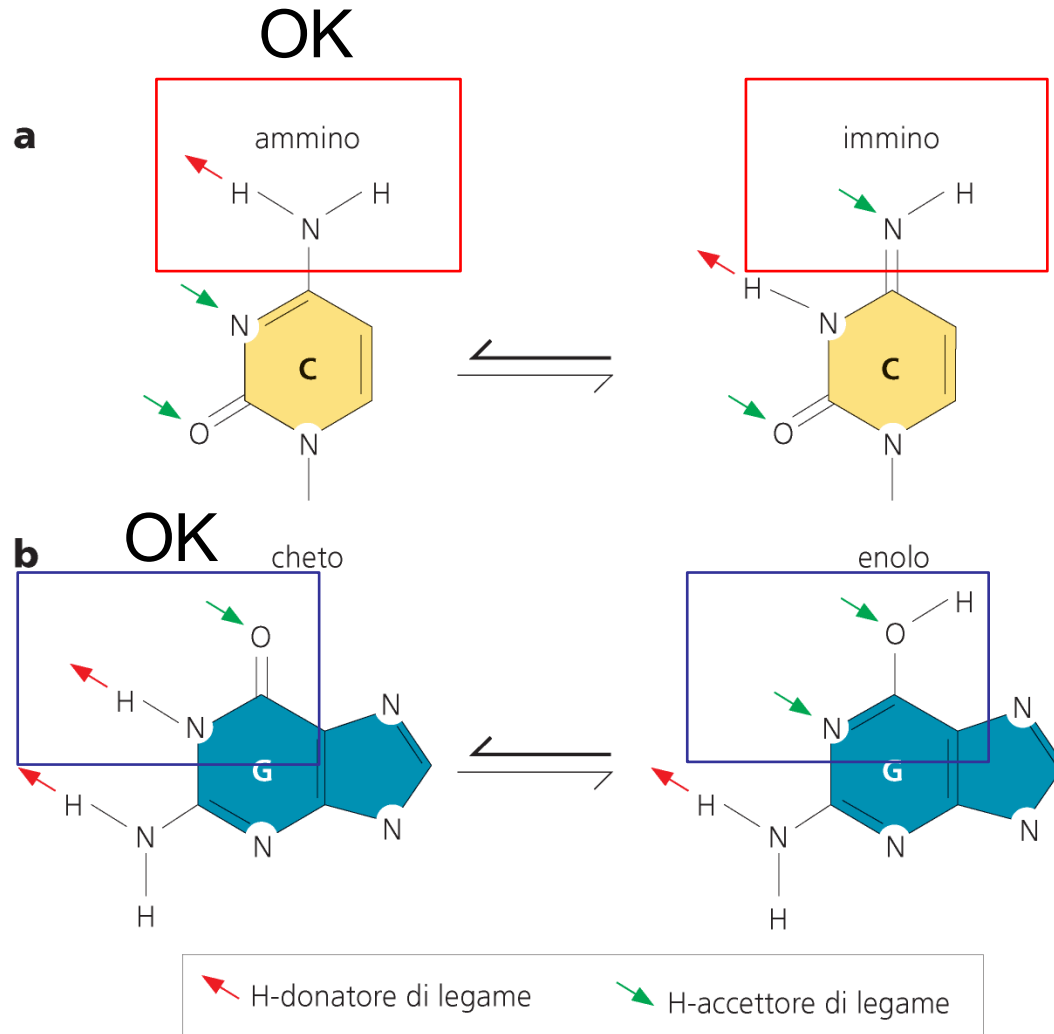


La precisione nell'applicazione della regola di Watson Crick nell'appaiamento delle basi e imposta sia:

- Della **forma sterica** delle basi
- della possibilità di formare **legami idrogeno** fra A-T (2 H-bonds) e G-C (3 H-bonds)

Conformazioni tautomeriche delle basi

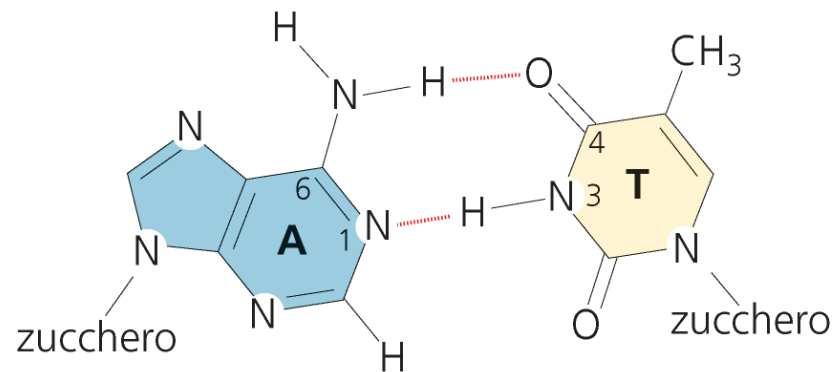
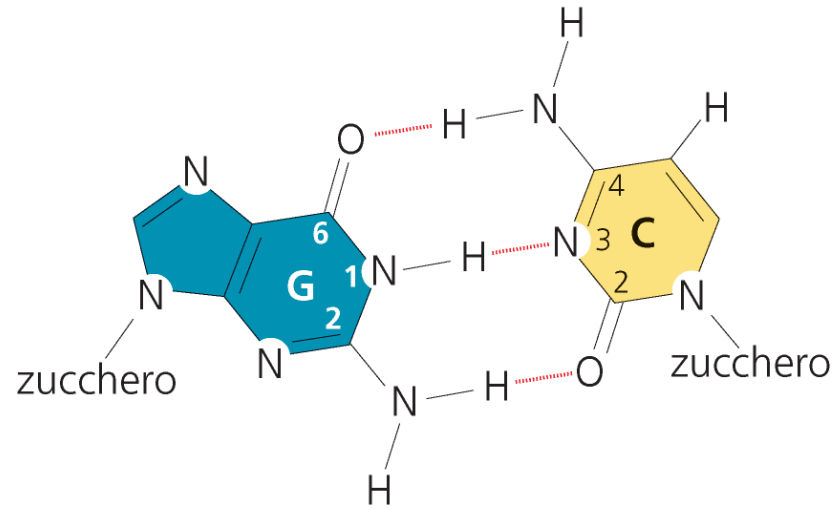
In chimica per **tautomeria** si intende una particolare **forma di isomeria** tra composti organici. Le molecole tra le quali esiste tautomeria sono dette tautomeri e la reazione chimica che serve per interconvertire i diversi tautomeri è detta tautomerizzazione.[2] Nella maggior parte dei casi la tautomerizzazione comporta un trasferimento di un protone o di un atomo di idrogeno, accompagnata dallo scambio di un legame covalente singolo con uno doppio adiacente



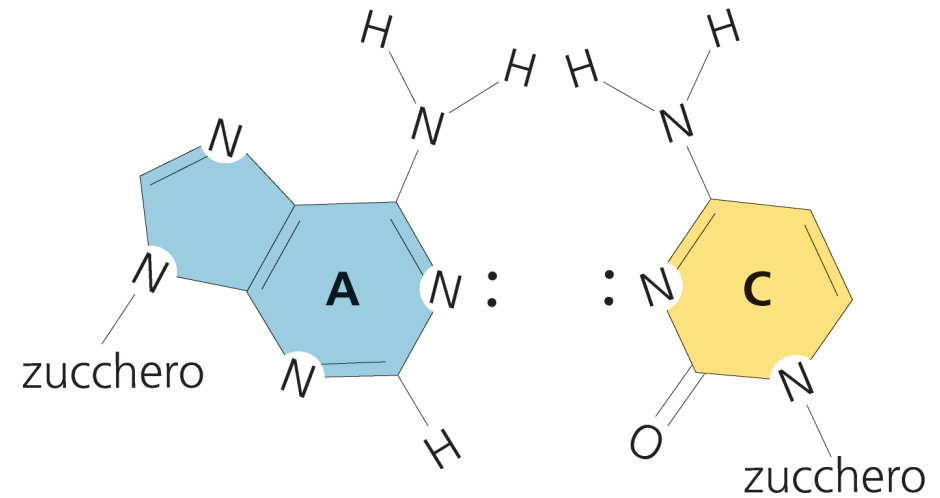
Le basi puriniche e pirimidiniche libere possono esistere in due o più forme tautomeriche a seconda del pH della soluzione.

Incompatibilità dell'accoppiamento A:C (e G:T)

Accettori e Donatori di **legami idrogeni**
sono ordinati



Accettori e Donatori di **legami idrogeni**
non sono ordinati



pH fisiologico (ca. pH7)

Interazioni che stabilizzano la doppia elica

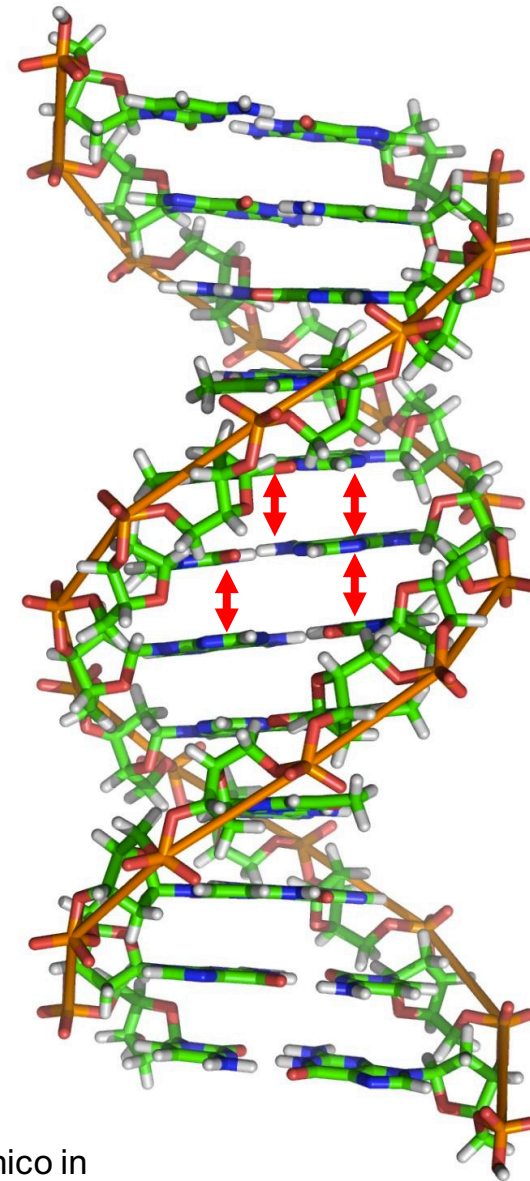
I **legame idrogeno** fra le basi complementari sono una caratteristica fondamentale della doppia elica che contribuisce alla stabilità termodinamica dell'elica ed alla specificità delle coppie di basi.

Un secondo importante contributo che stabilizza la doppia elica viene dalle

interazioni di impilamento fra le basi.

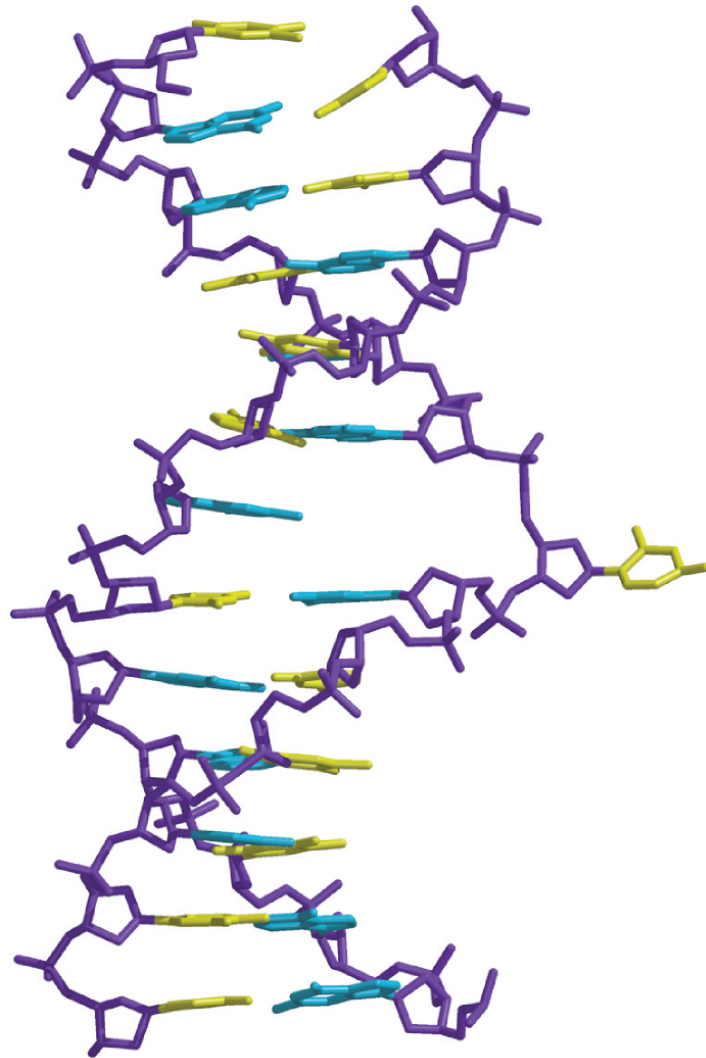
Le basi hanno struttura planare, sono **relativamente insolubili in acqua**, per cui tendono ad impilarsi una sull'altra perpendicolarmente lungo l'asse longitudinale.

Attrazione: **Forza van der Waals**



Le forze di van der Waals differiscono dal legame covalente e ionico in quanto **dipendono dalle fluttuazioni nella distribuzione delle cariche nelle molecole**; si tratta di forze attrattive a lungo raggio e repulsive a corto raggio.

Le basi possono ruotare all'esterno della doppia elica



Rotazione della base
base flipping

- Enzimi che metilano le basi o rimuovono basi danneggiate possono provocare questo fenomeno di rotazione

- Iniziazione della trascrizione → destabilizzazione del DNA per aprire la doppia elica (anche più nucleotidi)

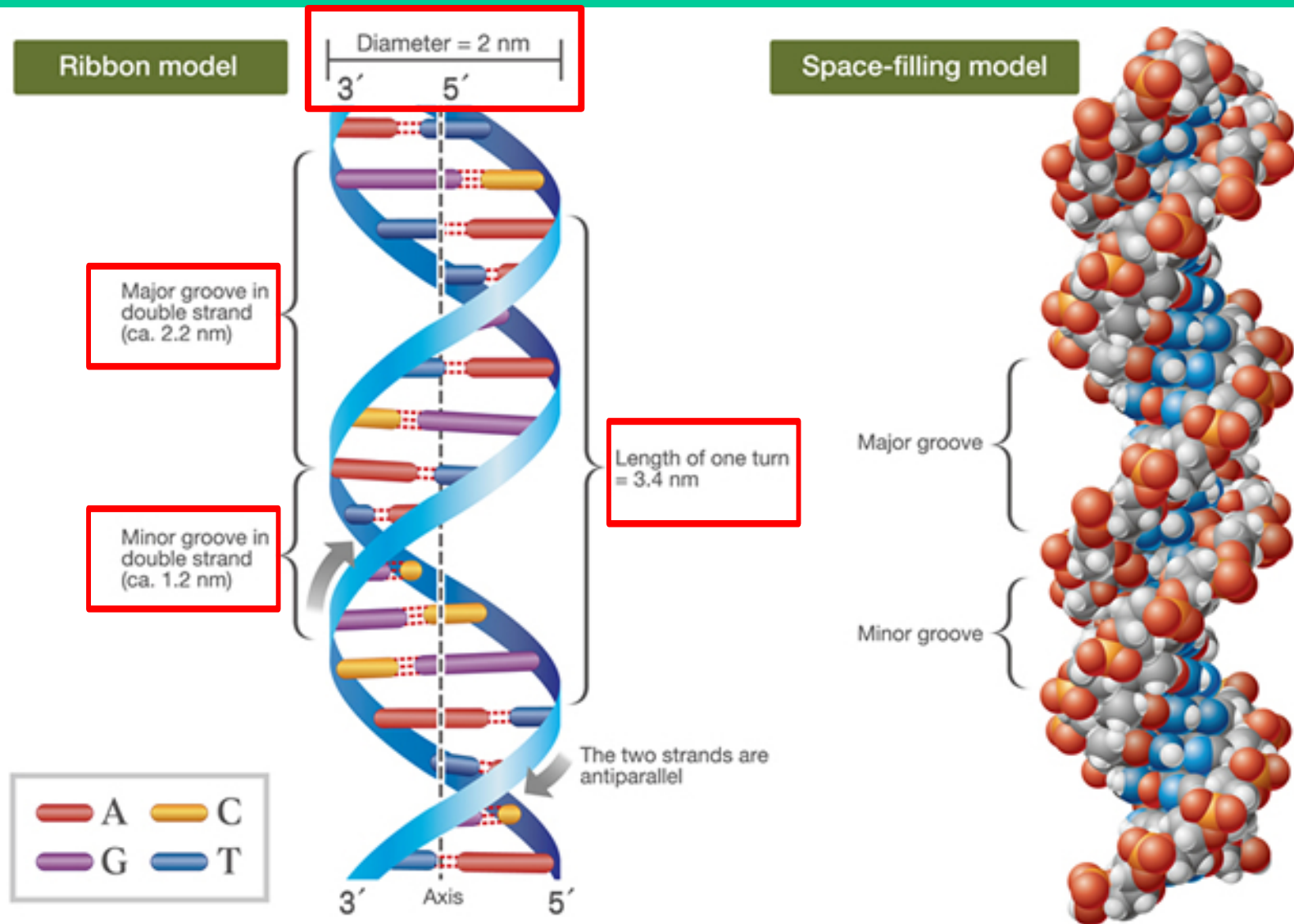
IMPORTANTE:

Enzimi coinvolti nella ricombinazione omologa e riparazione del DNA

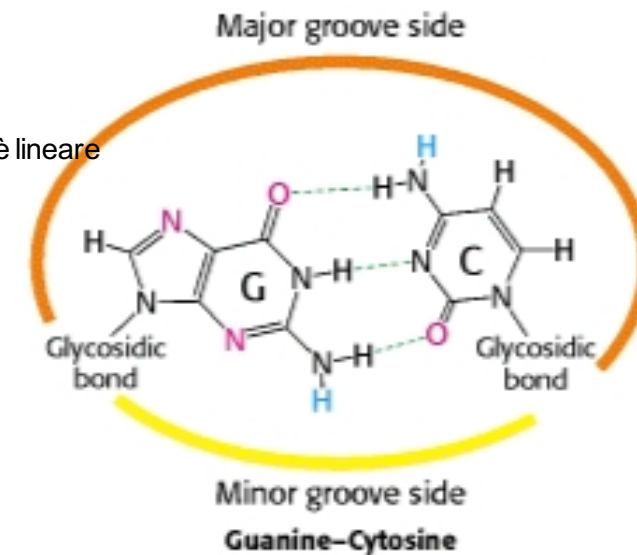
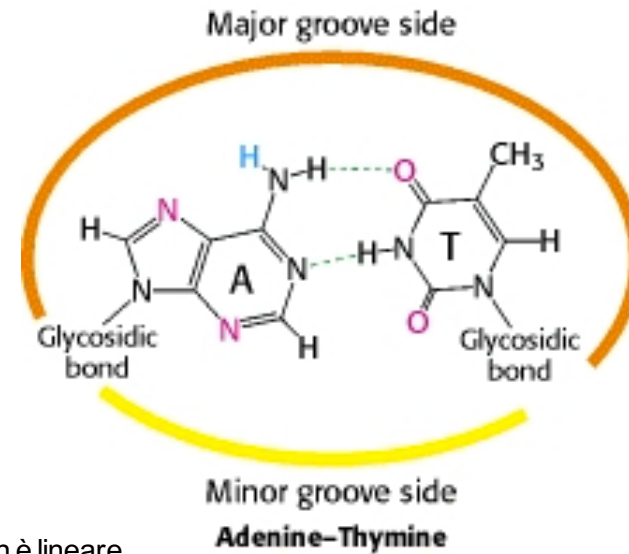
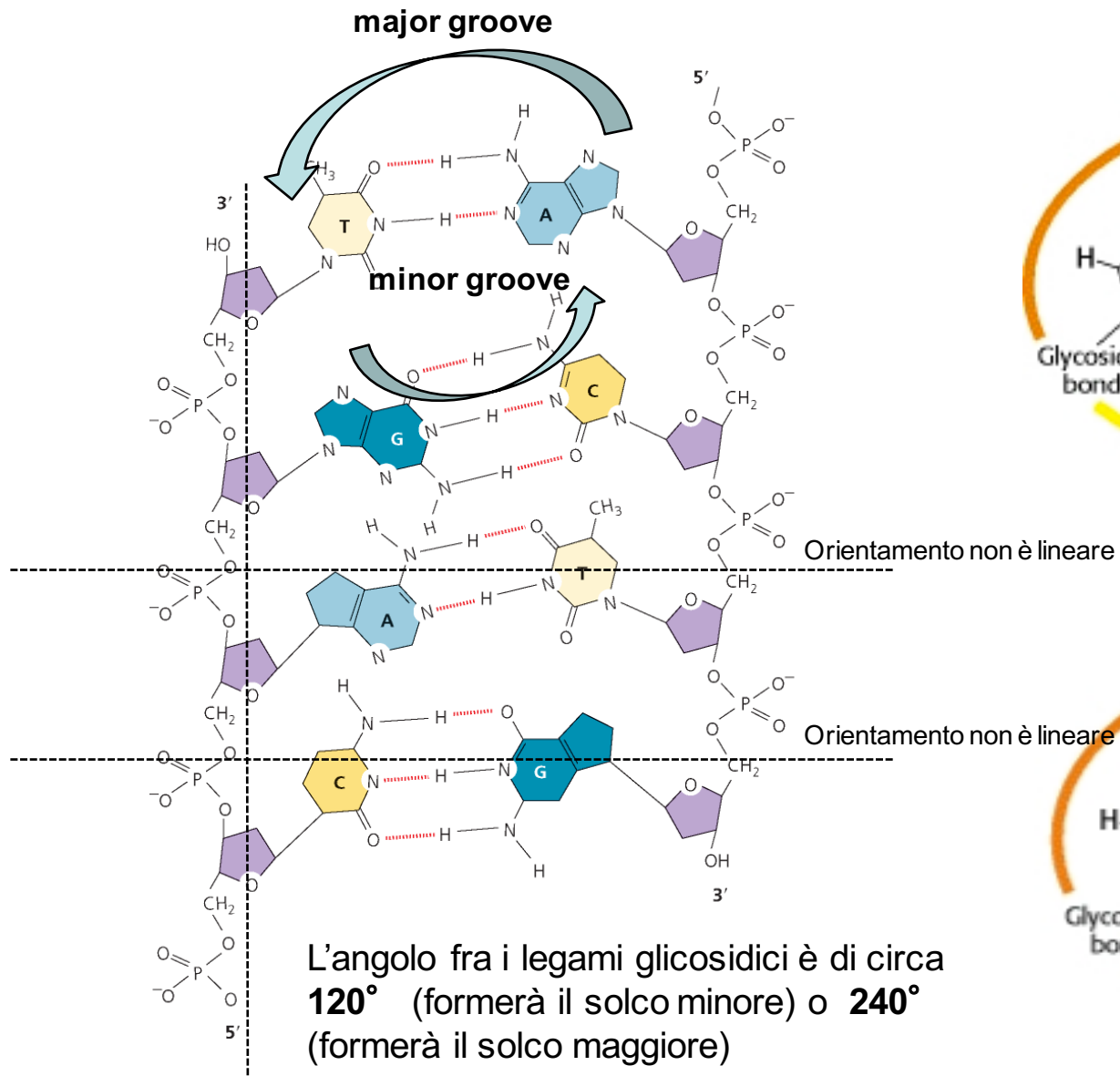
“scandagliano” il DNA per controllare l’omologia delle basi ruotando una base alla volta

FLESSIBILITA' STRUTTURALE DEL DNA

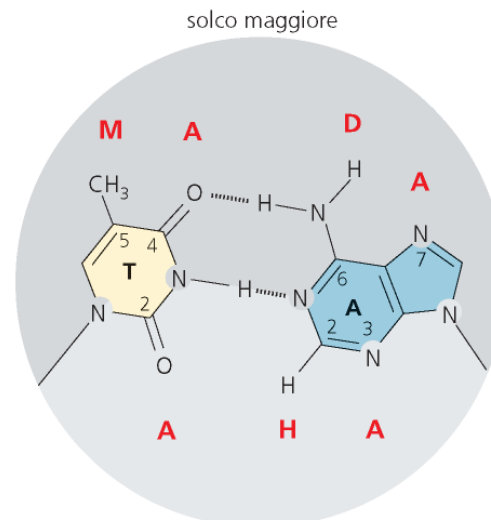
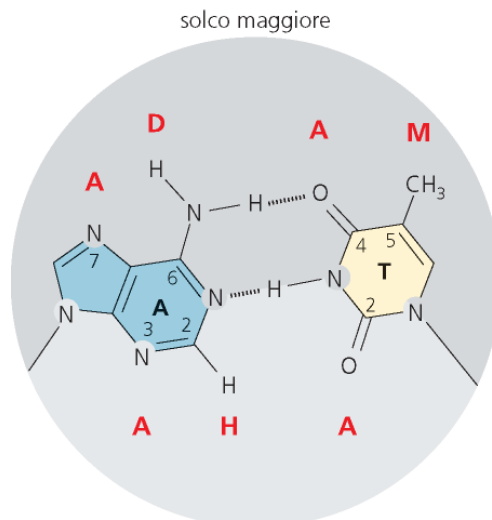
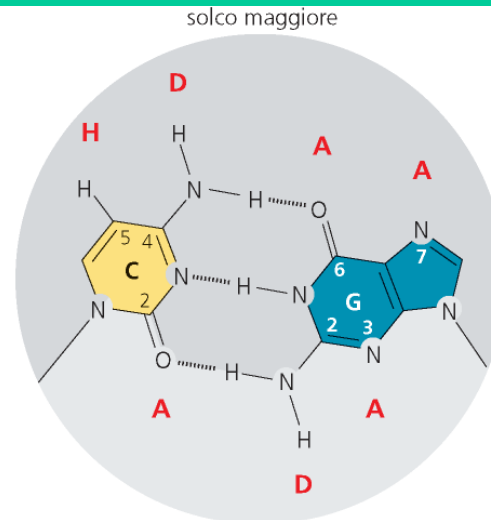
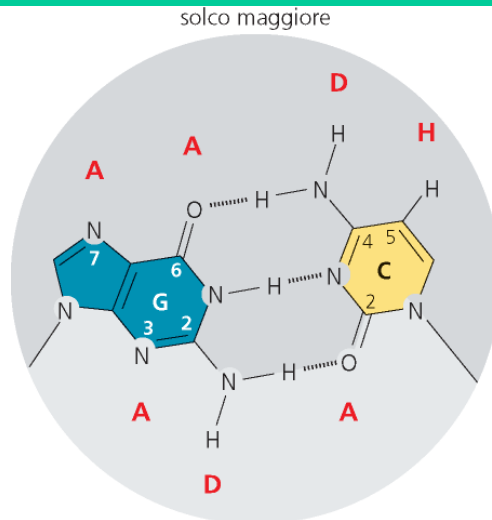
La doppia elica presenta un solco minore ed un solco maggiore (minor and major groove)



La doppia elica presenta un solco minore ed un solco maggiore (minor and major groove)



Il solco minore ed il solco maggiore forniscono molte informazioni di tipo chimico



A: accettore legame idrogeno
D: donatore legame idrogeno
M: gruppo metilico
H: idrogeno non polare

Queste codice formato da gruppi chimici posti al interno del solco maggiore/minore identificano in modo specifico le coppie di basi.

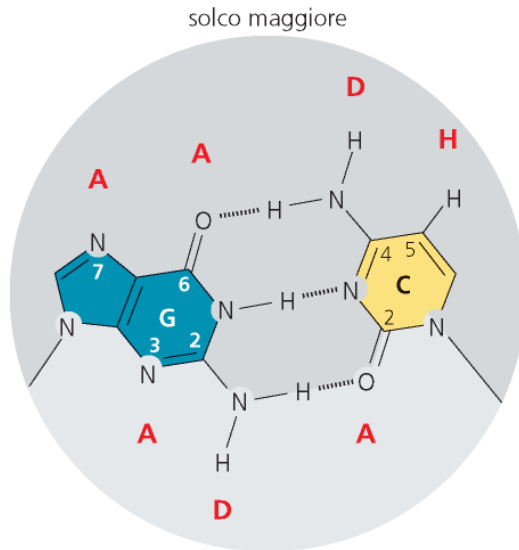
Le proteine possono riconoscere specifiche sequenze di DNA senza che sia necessario aprire o rompere la doppia helica !!!

Esempio:

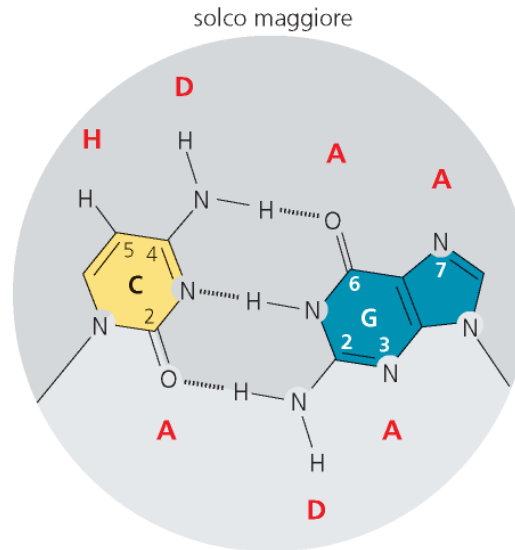
→ Fattori di trascrizione

→ Espression genica

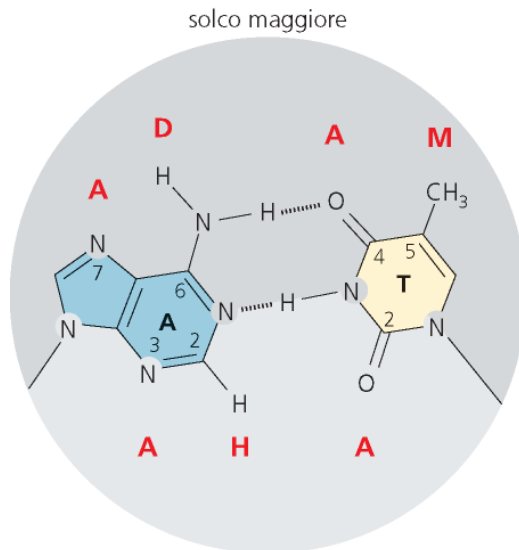
Il solco minore ed il solco maggiore forniscono molte informazioni di tipo chimico



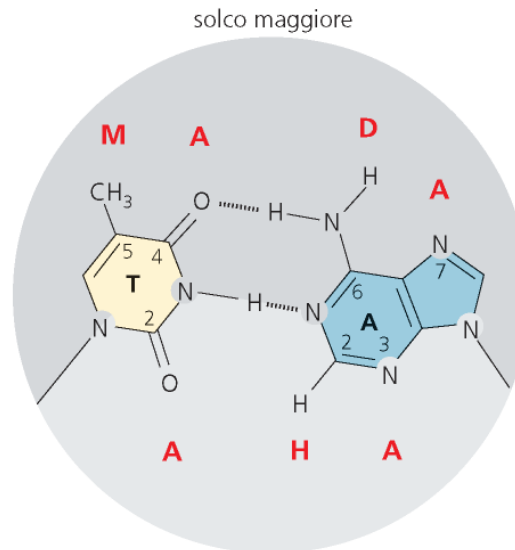
solco minore



solco minore



solco minore



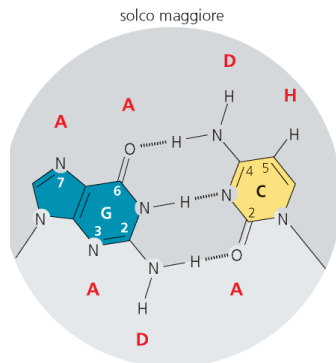
solco minore

Le regioni delle basi che si affacciano nel solco maggiore ed in quello minore creano un sistema di donatori ed accettori di idrogeno e superfici di van der Waals.

A: accettore legame H
D: donatore legame H
M: gruppo metilico
H: idrogeno non polare

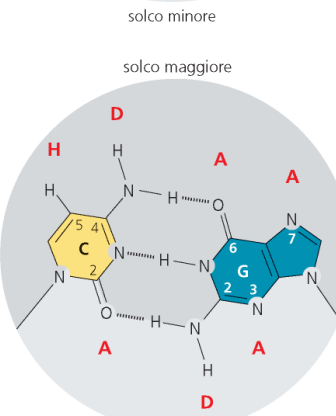
Sequenze di nucleotide (in forma di doppia elica) possono creare un **“CODICE” per il legame di proteine** (fattori di trascrizione, etc...)

I solci forniscono molte informazioni di tipo chimico



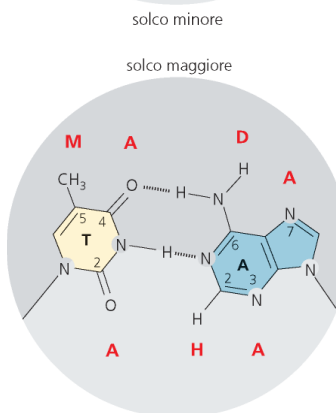
Solco maggiore: A-A-D-H

Solco minore: A-D-A



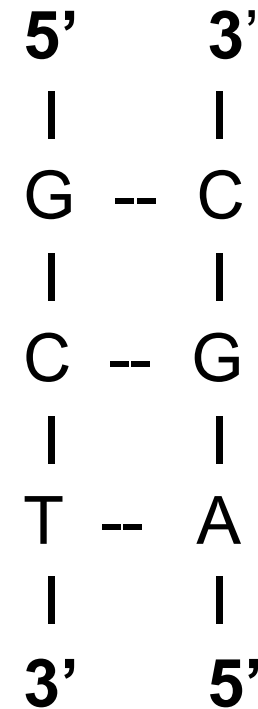
Solco maggiore H-D-A-A

Solco minore A-D-A

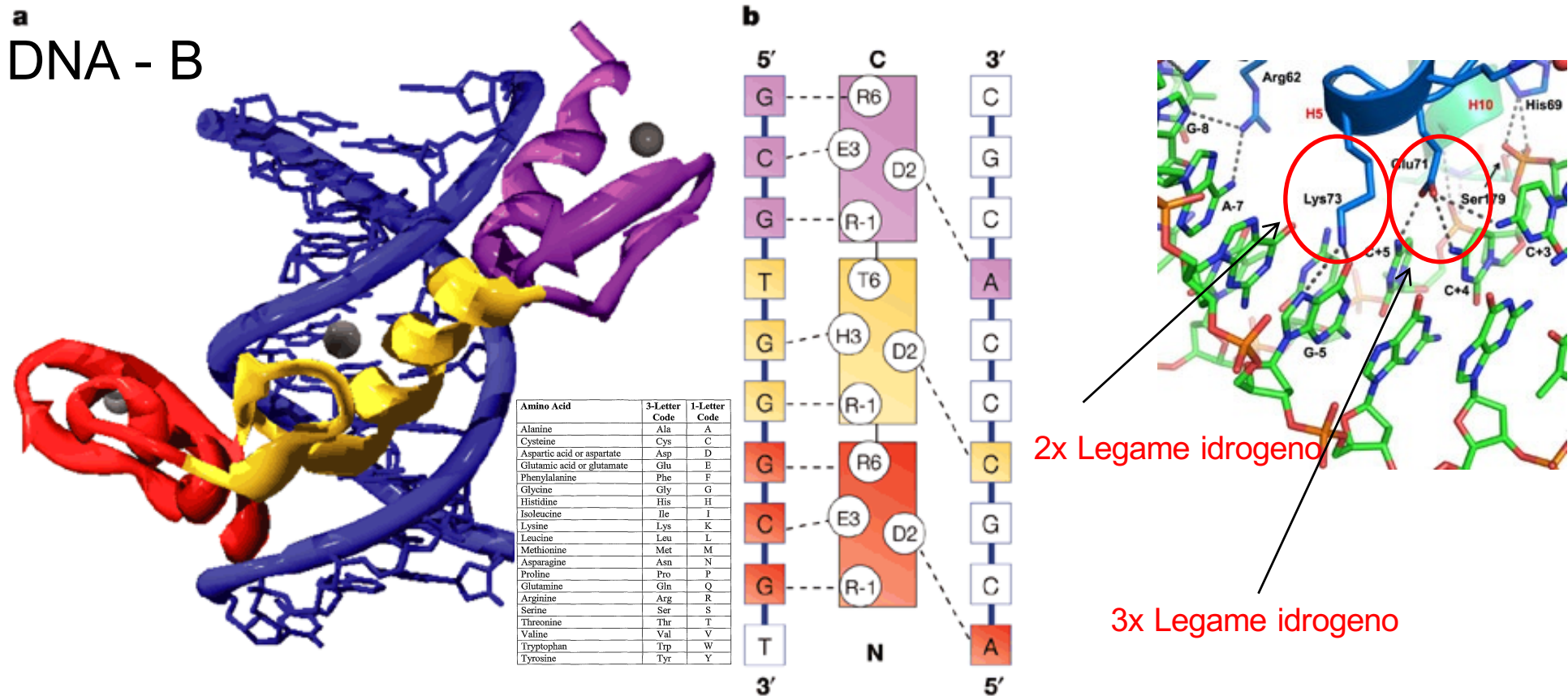


Solco maggiore M-A-D-A

Solco minore A-H-A

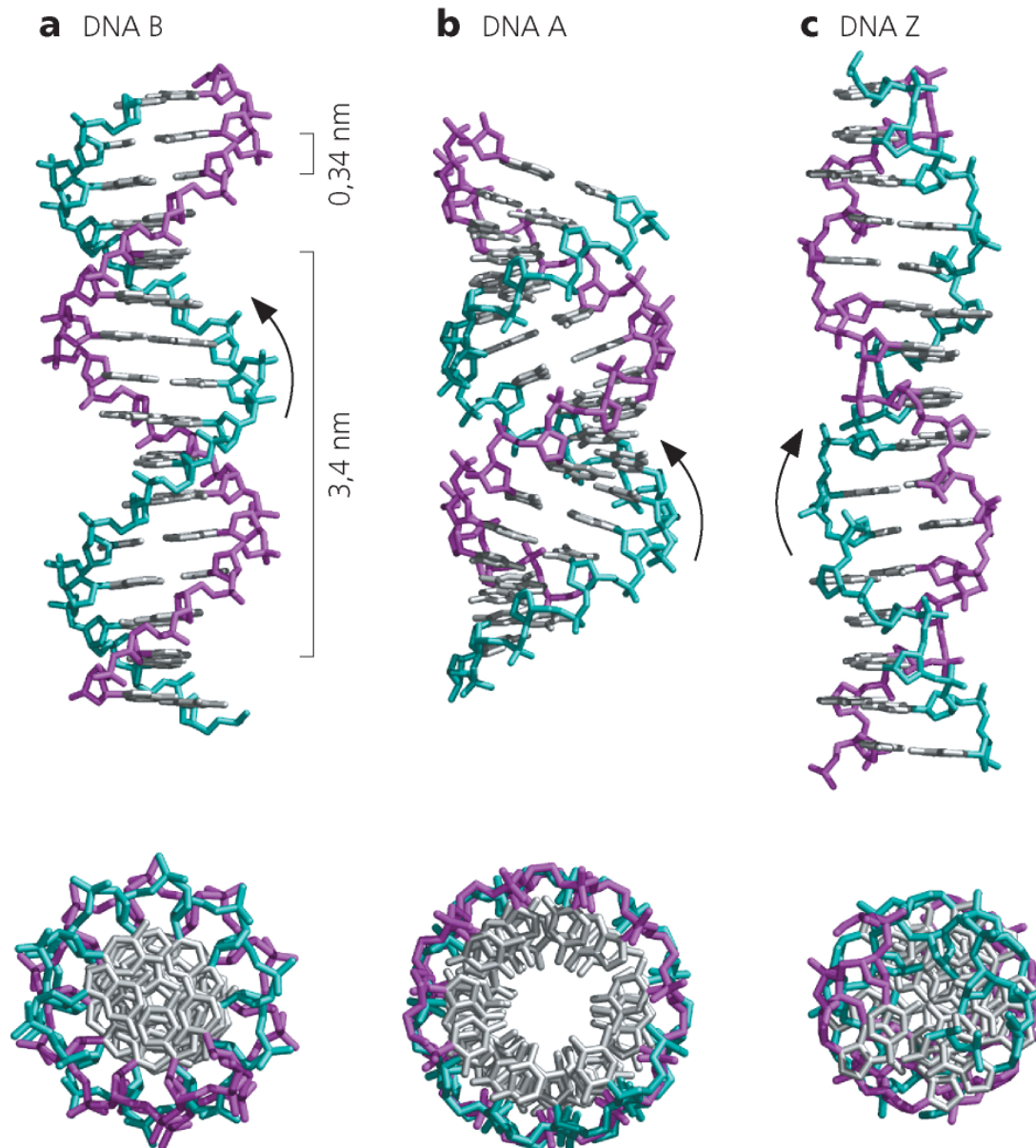


I solci forniscono molte informazioni di tipo chimico



a | The Zif268–DNA complex showing the three zinc fingers bound in the major groove of DNA5. The DNA is blue and fingers 1, 2, and 3 are red, yellow, and violet respectively. Zinc ions are shown as grey spheres. b | A diagram showing the sequence-specific protein–DNA interactions between Zif268 and its DNA-binding site. The recognition helices of the three fingers are represented in the centre of the panel and the bases on the two strands of the DNA site are shown on either side. The identity of key residues on the recognition helices (positions -1, 2, 3 and 6 with respect to the start of the helix) are also shown using the single-letter code. Contacts observed in the crystal structure are represented as dashed lines. The fingers and bases that they contact are colour-coded using the same scheme as in a. The fingers are spaced at three-base-pair intervals and tend to contact three adjacent bases on one strand of DNA and one base on the other strand

La doppia elica può trovarsi in diverse conformazioni



Cristallografia raggi X

Forma B (quando il DNA è meno concentrato): 10 pb giro d' elica, ampio solco maggiore, stretto solco minore.

Forma A (quando il DNA è più concentrato): 11 pb solco maggiore più stretto rispetto a B. → forma A: protein-DNA complexes

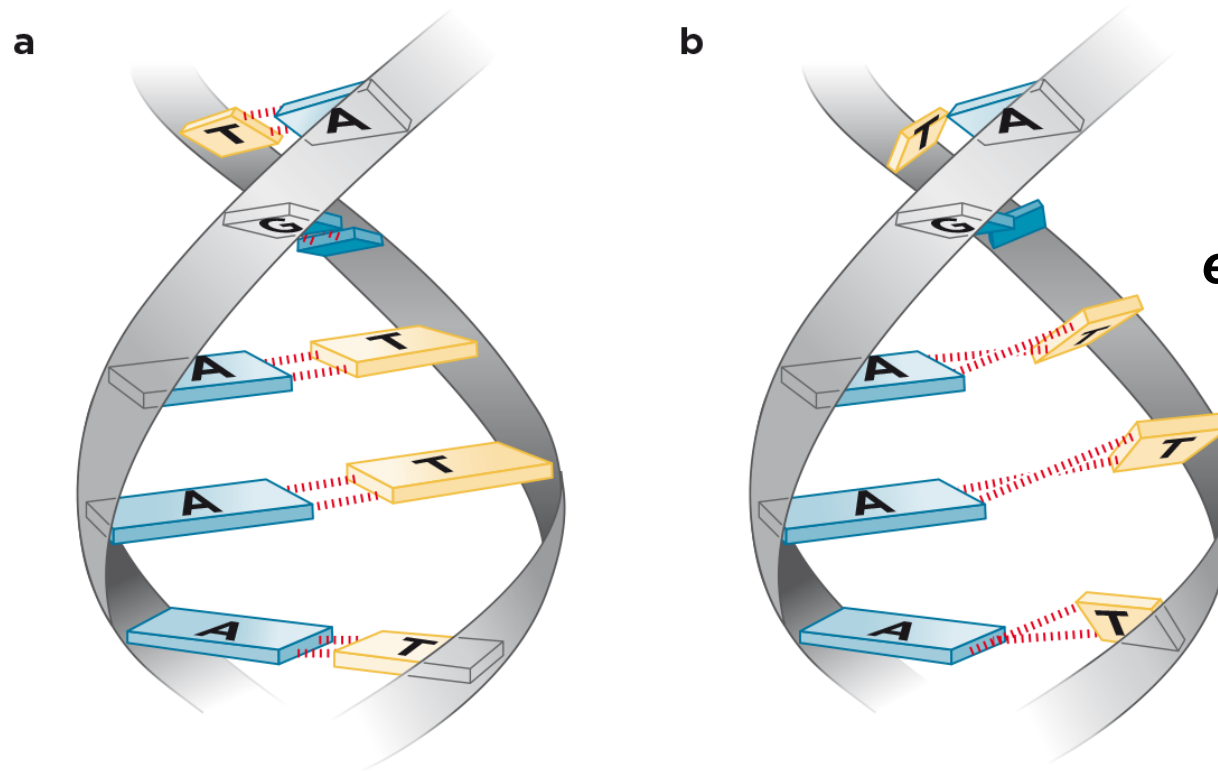
DNA nella cellula in forma B anche se 10,5 pb

La doppia elica può trovarsi in diverse conformazioni – DNA B

DNA tipo B: struttura ideale, pero differente a quella trovato in natura

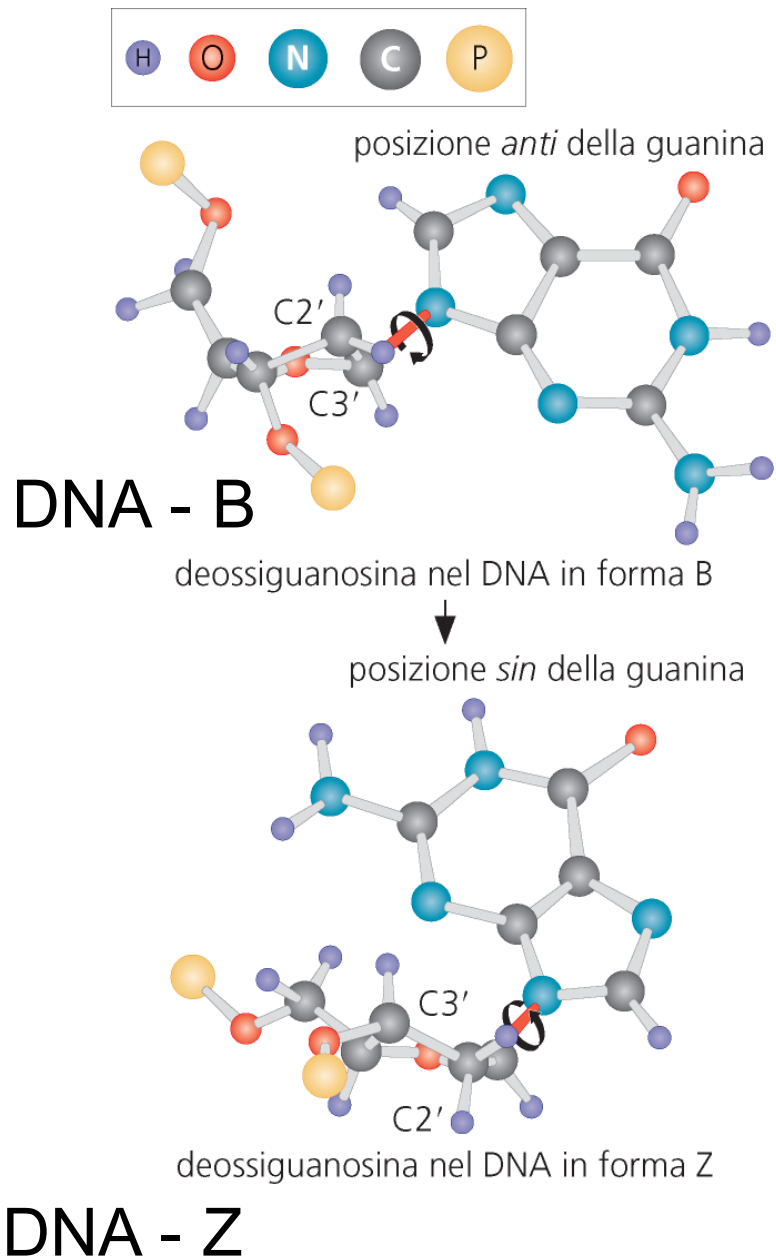
In cells:

1. Structure B, but 10.5 bp per turn
2. Basi possono mostrare un leggera rotazione: = "Propeller twist" → ensures flexibility → local changes in minor and major groove width



*La struttura del DNA
e stabile pero permette
flessibilita "locale"*

Il DNA può formare anche elica sinistrorsa: il DNA Z



Il DNA con purine e pirimidine alternate può **formare eliche sinistrorse**.

Il legame glicosidico (fra base e 2'-deossiribosio) può presentarsi in due conformazioni: *sin* e *anti*

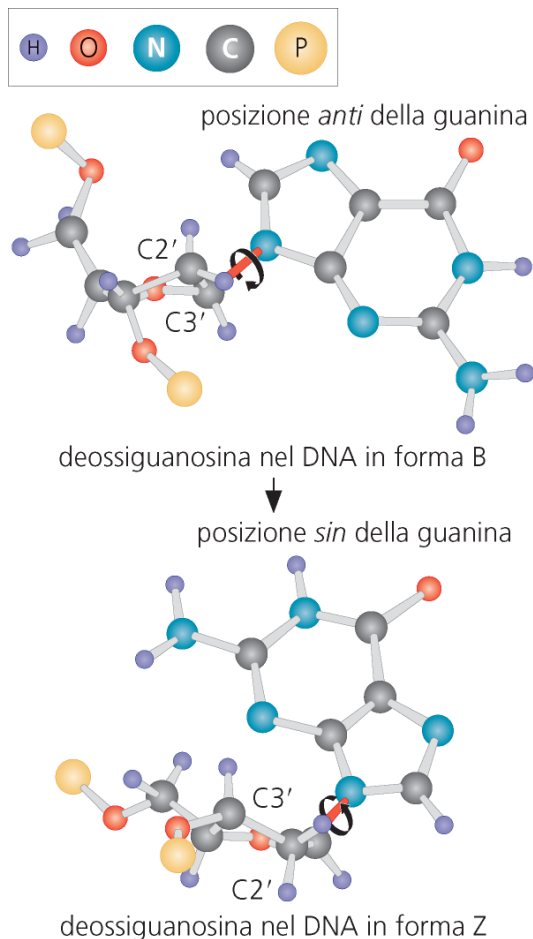
Nel DNA destrorso è sempre *anti*, mentre nella forma sinistrorso è ***anti* sui pirimidinici, *sin* sui purinici**.

GC repeat-rich sequences are prone to Z-DNA formation

Conformazione a zig-zag della impalcatura zucchero-fosfato (DNA Z)

Trovato **in vitro** in presenza elevati concentrazioni di ioni carichi positivamente (**Na⁺**). Significato fisiologico anche in vivo; Release of torsional stress; during activation of transcription

Il DNA può formare anche elica sinistrorsa: il DNA Z



Z-DNA is the most underwound form of the double-helix and, consequently, compensates torsional tension in negatively supercoiled DNA.

Situations of Z DNA in cells:

RNA polymerase, as it transcribes through a gene, would generate negative supercoils and promoted Z-DNA formation upstream of the transcribing gene to compensate supercoiling

Z-DNA cannot be bound by histones → Z-DNA is “naked” in cells at special positions that are involved in gene regulation

- promoter for human CSF-1 gene
- Z-forming sequences accumulate near the transcription start site of genes in humans and other eukaryotes and that ~80% of the genes in human chromosome 22 have at least one Z-DNA sequence in the vicinity of their transcription start sites

Film: Forma Z del DNA: <https://www.youtube.com/watch?v=F3ehSw-orVQ&sns=em>

Film: Forma B del DNA: <https://www.youtube.com/watch?v=m4PXx4VLChU>

DNA ha una assorbanza massima a 260nm (raggi UV)

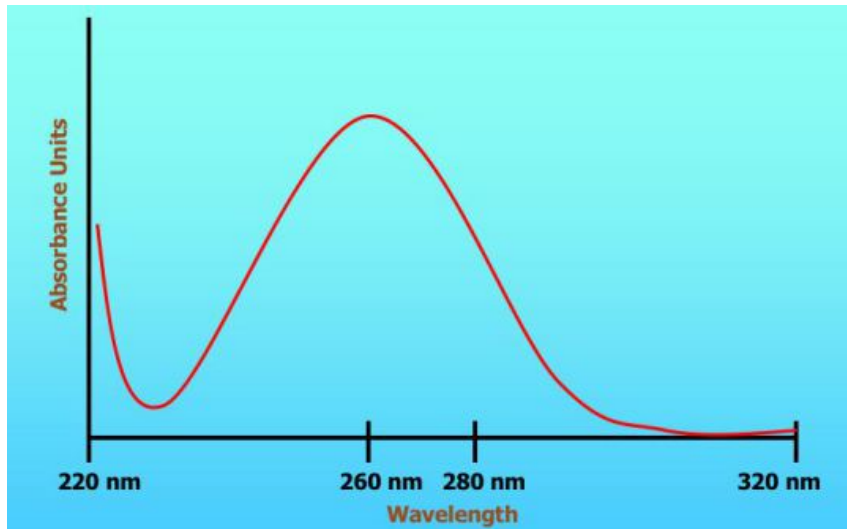
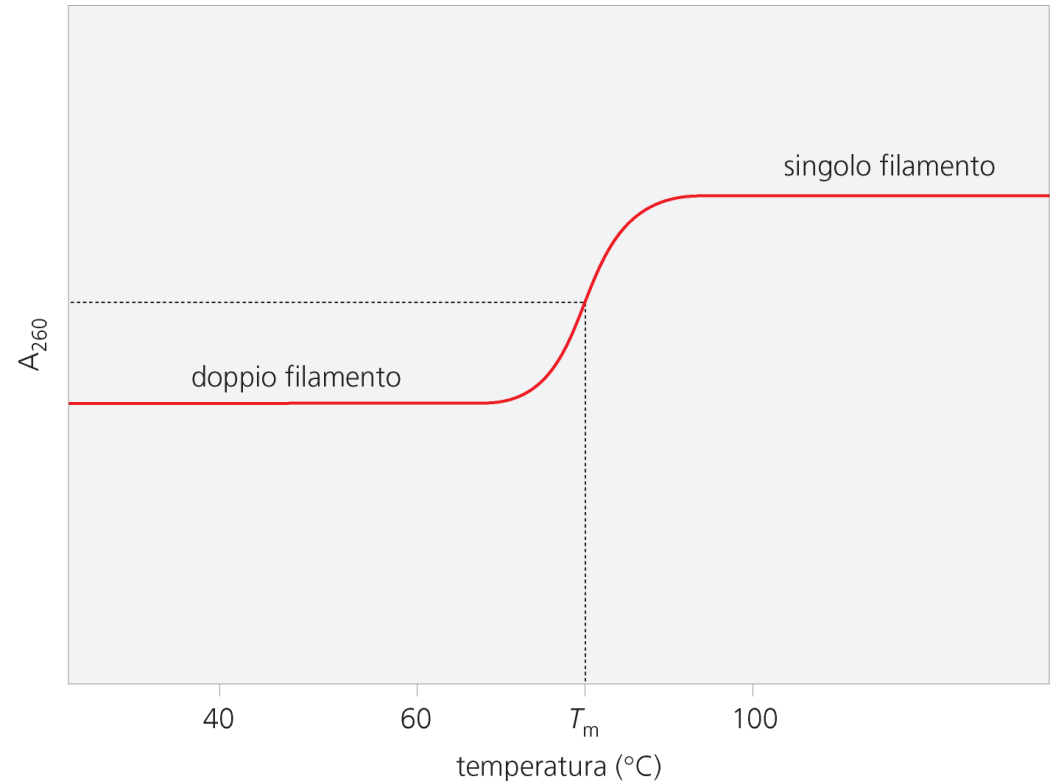


Figure 1: Spectrophotometric Scan Profile for Purified Plasmid DNA

Purified DNA typically produces a Gaussian or bell-shaped profile with the maximum peak absorbing at 260 nm. Absorbance at 220 nm increases with a significant drop between the 220 nm and 260 nm peak. This sample is relatively pure DNA.

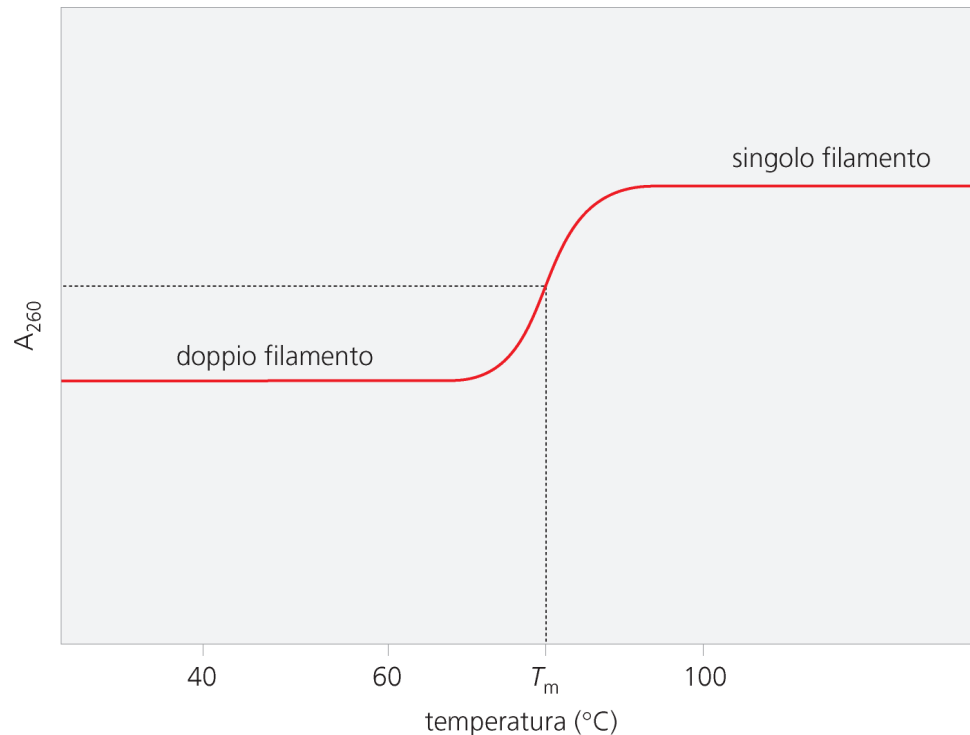


**DNA a singolo filamento (single stranded DNA, ssDNA)
ha una densità ottica aumentata**

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.

DNA a singolo filamento (single stranded DNA, ssDNA) ha una densità ottica aumentata



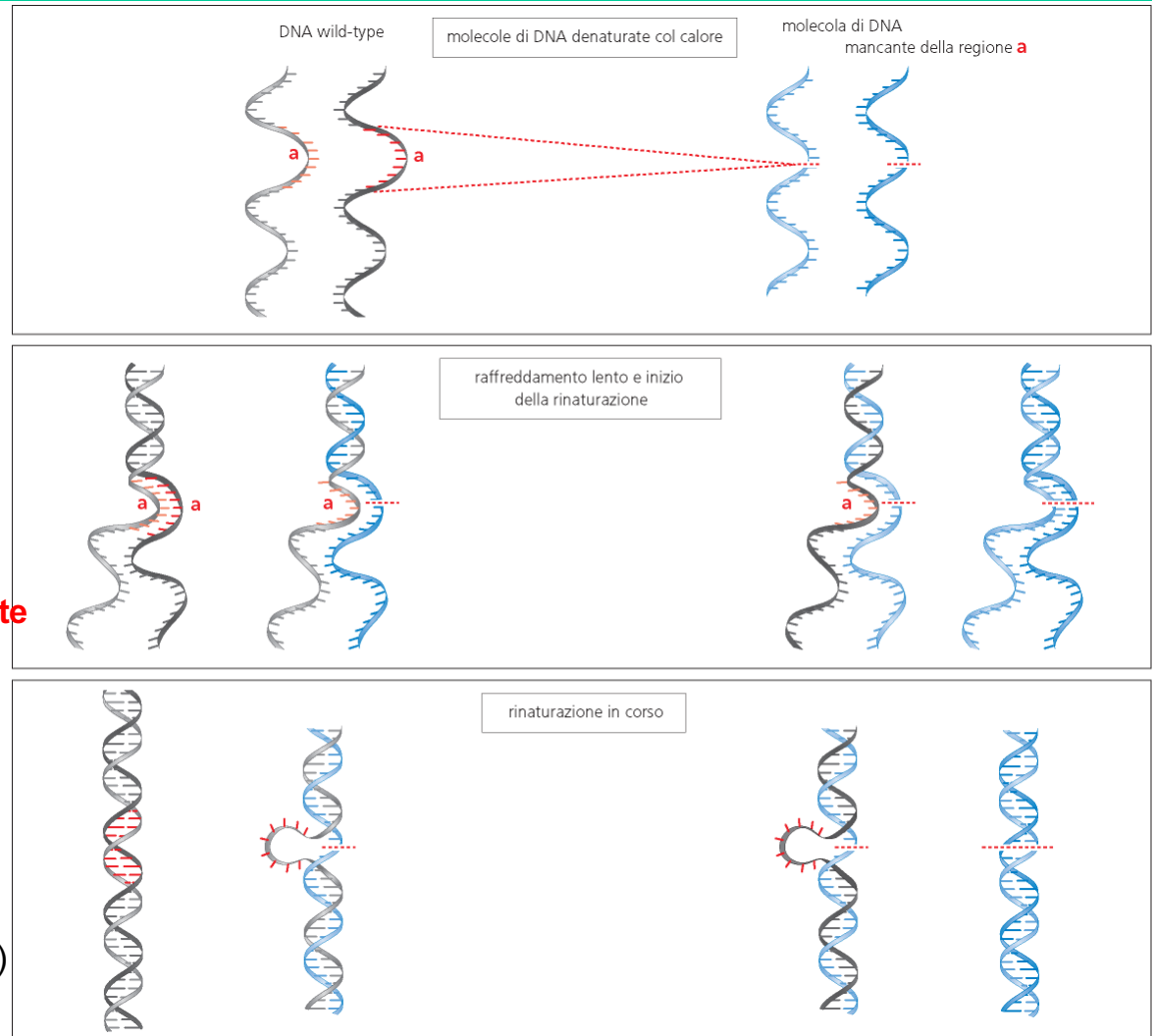
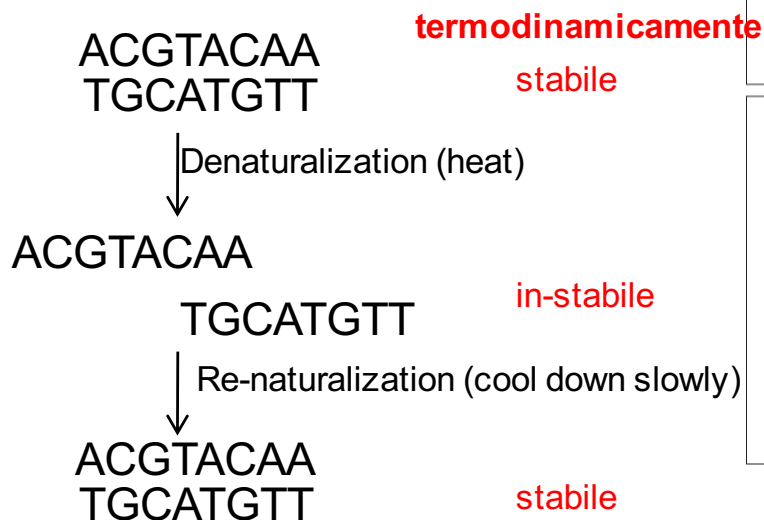
Hyperchromicity - hyperchromic effect

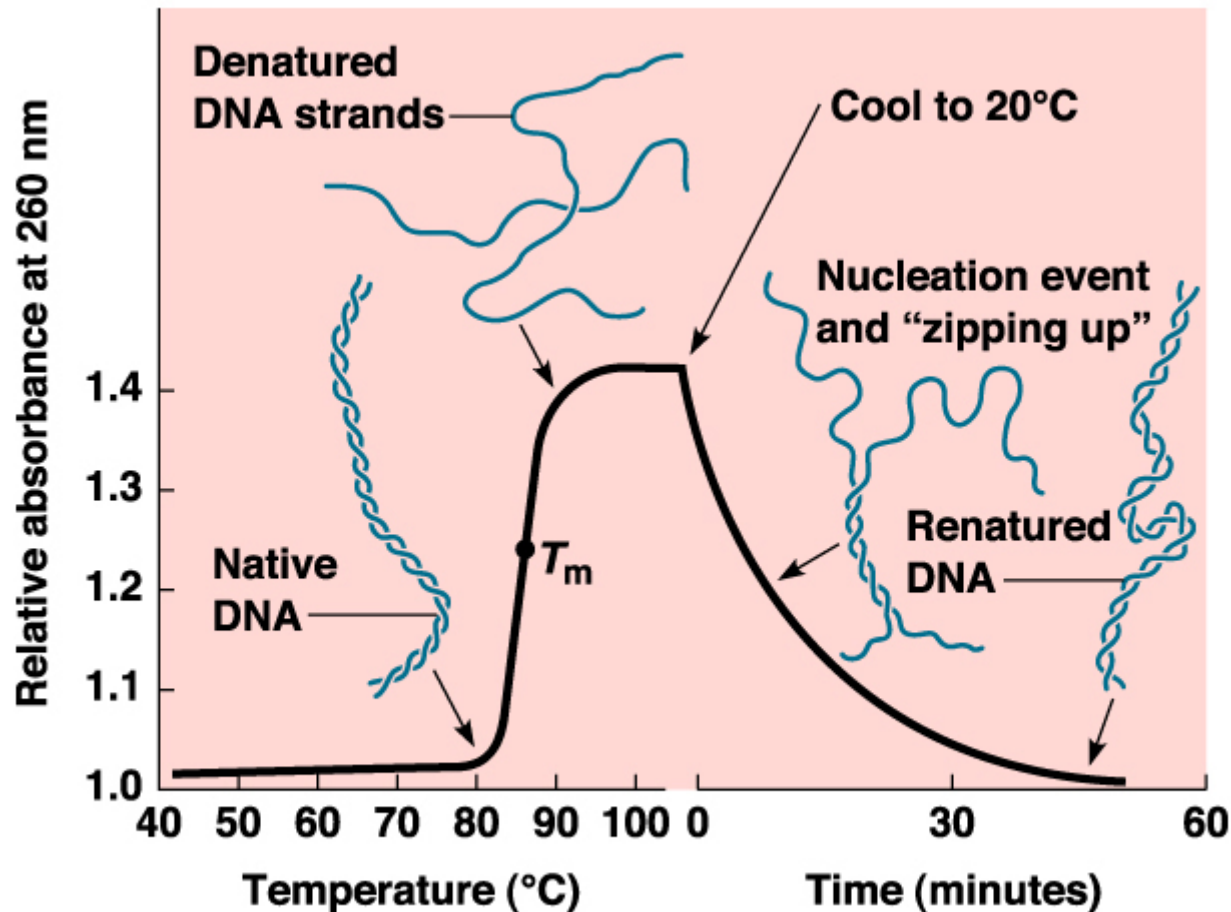
The hyperchromic effect is the striking increase in absorbance of DNA upon denaturation. The two strands of DNA are bound together mainly by the stacking interactions, hydrogen bonds and hydrophobic effect between the complementary bases. The **hydrogen bond limits the resonance of the aromatic ring so the absorbance of the sample is limited as well**. When the DNA double helix is treated with denaturing agents, the interaction force holding the double helical structure is disrupted. The double helix then separates into two single strands which are in the random coiled conformation. At this time, the base-base interaction will be reduced, increasing the UV absorbance of DNA solution because many bases are in free form and do not form hydrogen bonds with complementary bases. As a result, the absorbance for single-stranded DNA will be 37% higher than that for double stranded DNA at the same concentration.

I due filamenti di DNA possono separarsi e riassociarsi - DENATURAZIONE - RINATURAZIONE

Se il DNA viene riscaldato (fino 100°) o posto a pH elevato si può denaturare (legami H si aprono).

Se si ritorna lentamente alle condizioni di partenza il DNA può rinaturarsi e formare molecole ibride (ibridazione del DNA)





©Addison Wesley Longman, Inc.

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

Stabilità termodinamica del duplex di DNA e sua denaturazione

Fattori intrinseci: composizione in basi, peso molecolare (lunghezza).

DNA: 18bp : melting temperature $T_m =$ ca. 55 C

DNA: 25 bp: melting temperature $T_m =$ ca. 65C

DNA: 150 bp: melting temperature $T_m =$ ca 85C

100C: all DNA melts

Remember: high G-C content (3 H bonds): higher T_m , energia impaltimento piu alto

Remember: high A-T content (2 H bonds): lower T_m , energia impaltimento piu basso

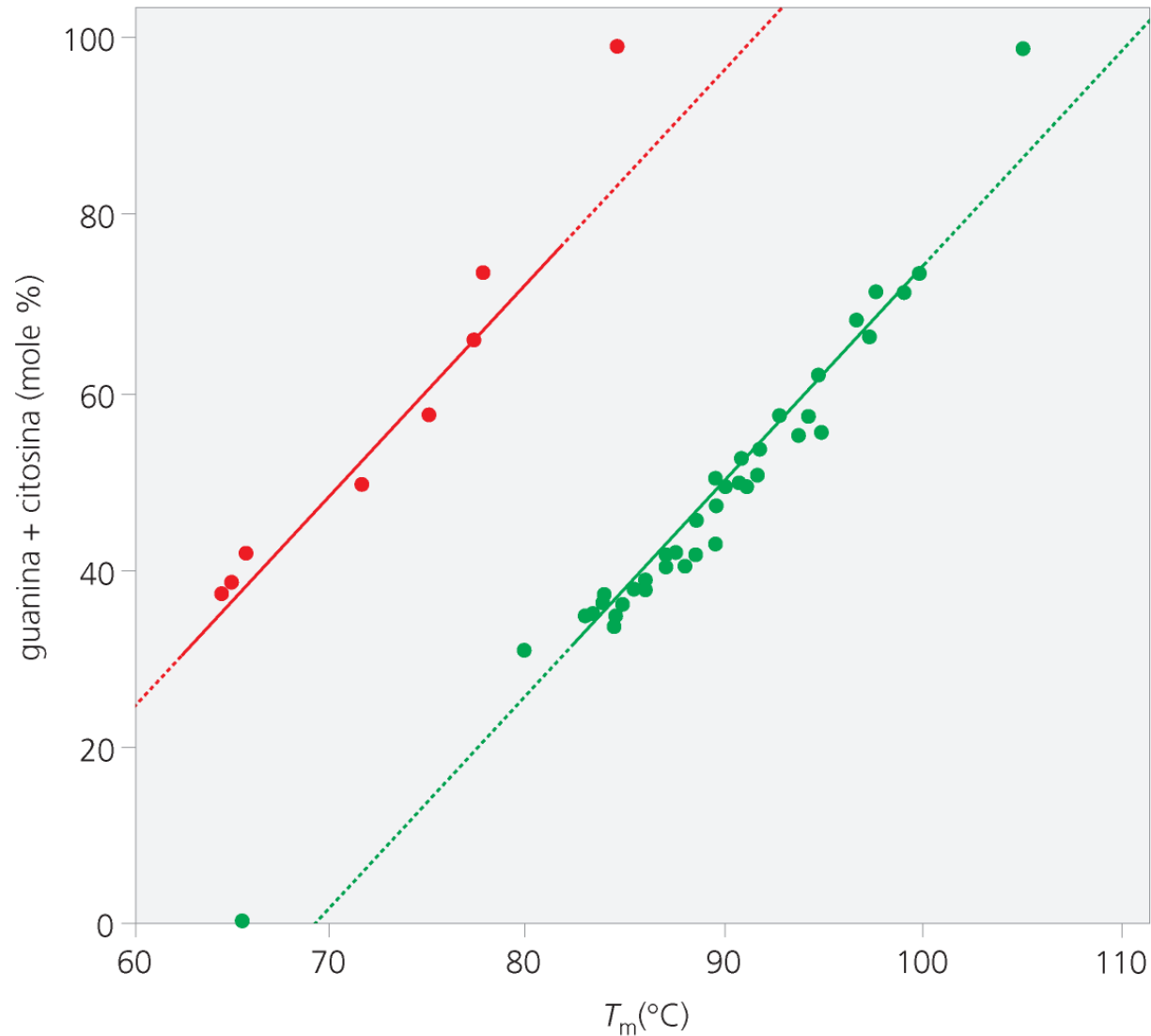
Fattori estrinseci:

Temperatura,

pH (alto: denaturazione)

forza ionica, (alta concentrazione di ioni (Na^+), protegge cariche negative \rightarrow DNA doppia elica stabile)

Dipendenza della denaturazione del DNA dal suo contenuto di G + C e dalla concentrazione salina



Bassa
concentrazione
salina

Alta
concentrazione
salina

Methods in molecular biology that depend on DNA melting (denaturalizzazione/renaturalizzazione)

PCR

Southern blotting

Northern blotting

Microarray analysis

DNA-FISH

RNA-FISH, etc

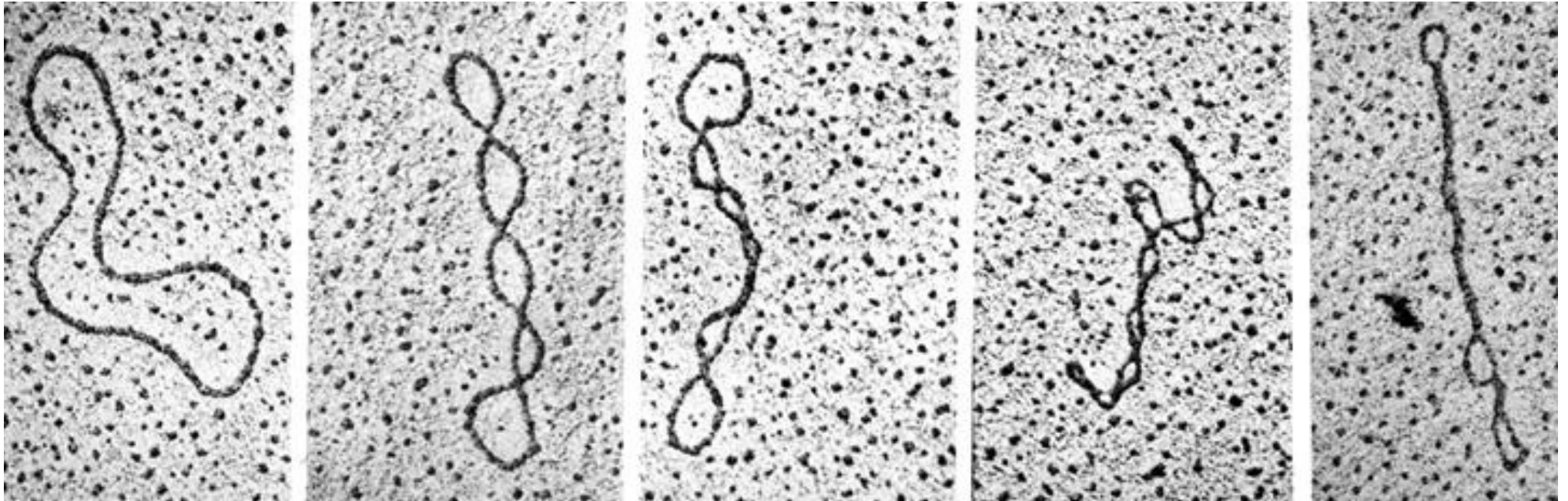
**Synthetic DNA (“probe” or “sonda”)
is “hybridized” to the DNA of a sample**

Probe can be labelled by:

-radioactive isotope (^{32}P) or

-fluorescently labelled nucleotides

2. La topologia del DNA



Il DNA è una molecola flessibile

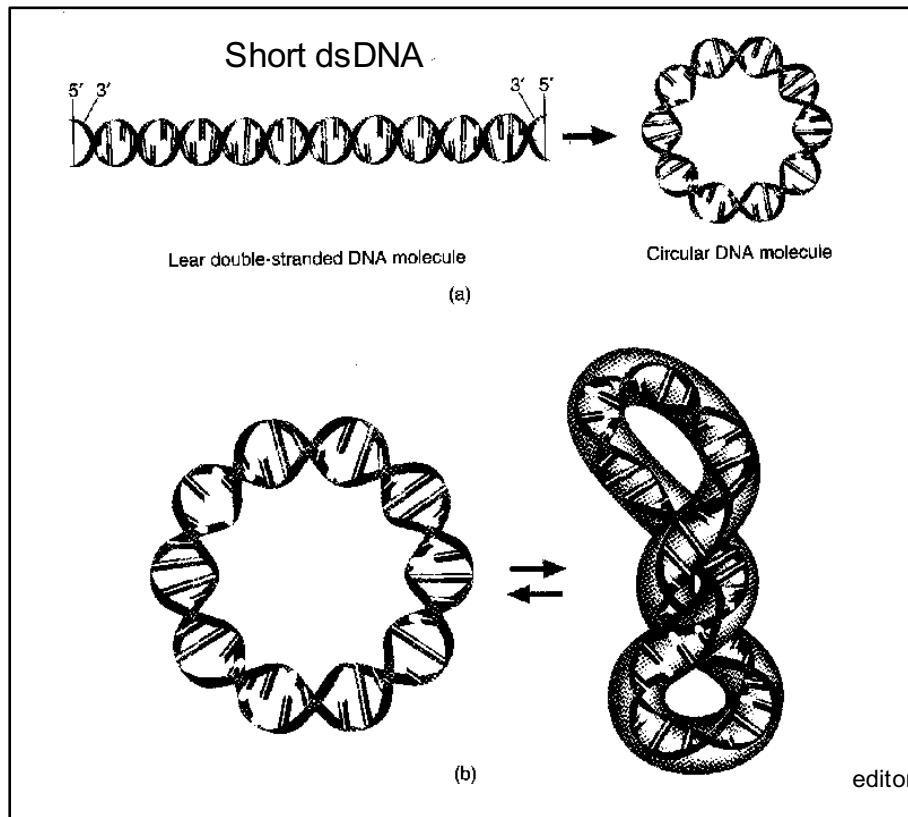
2. La topologia del DNA

Nelle molecole lineari di DNA, poiché le terminazioni sono libere, il numero di avvolgimenti di un filamento sull'altro può essere variato mediante rotazione reciproca.

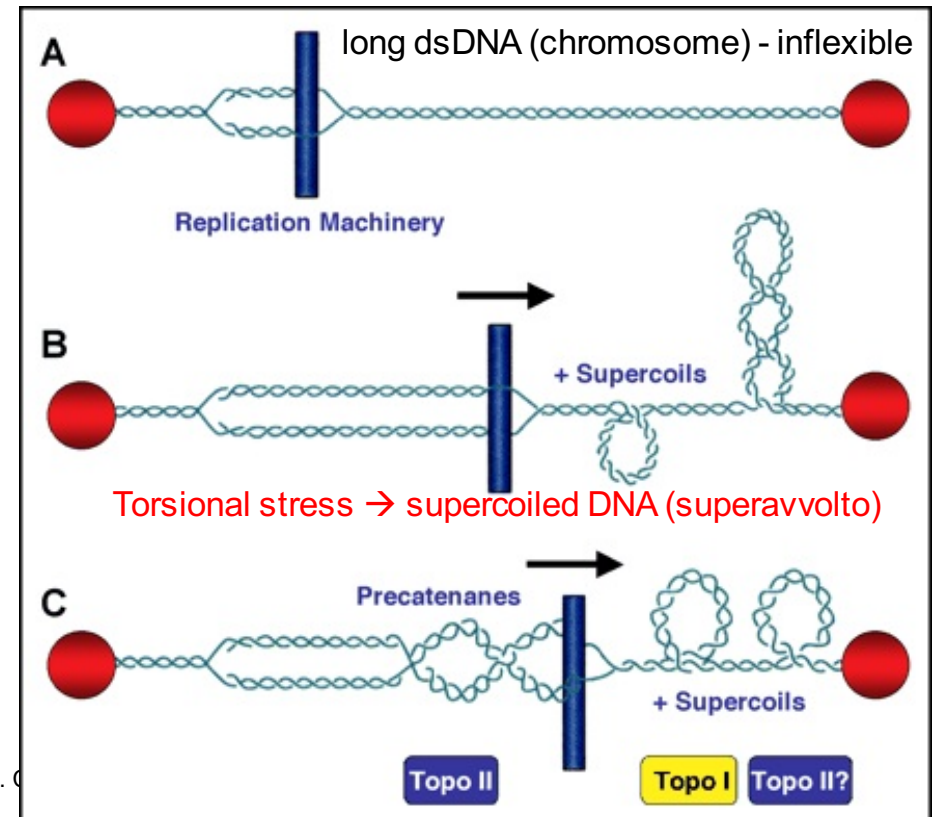
Nel DNA **circolare covalentemente chiuso (cccDNA)** questo non può cambiare (Virus, DNA genomico Batteria, Plasmide, Phago) = topologicamente vincolata

Neanche nel DNA lineare presente nei cromosomi eucariotici (estrema lunghezza ed interazione con componenti cellulari) = anche topologicamente vincolata

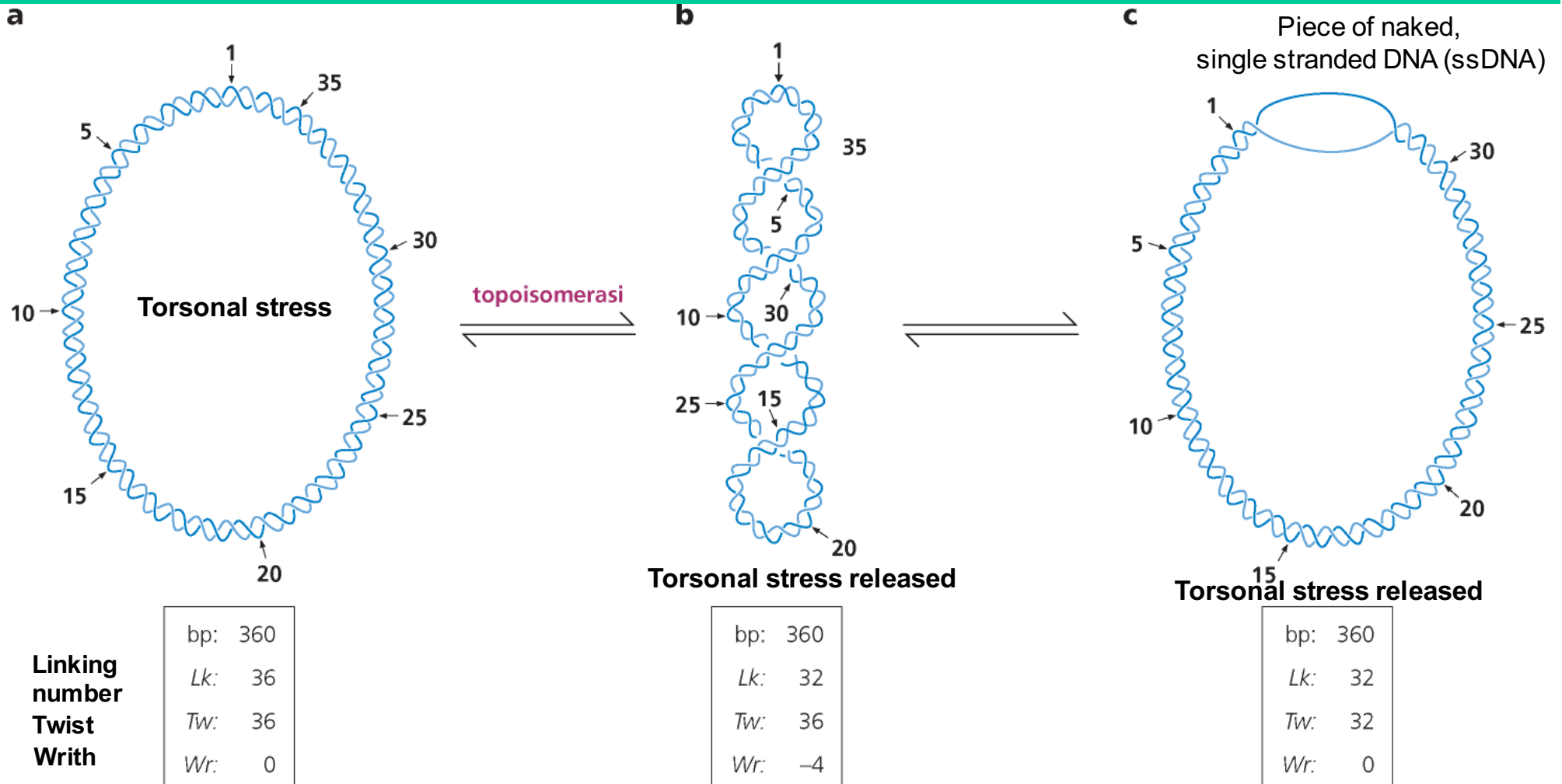
Nonostante ciò il DNA viene duplicato, trascritto, ecc.
Com'e' possibile??



editore S.p.A. C



cccDNA presenta tensioni torsionale → Doppio filamento si incroca su se stesso



forma rilassata

**forma superavvolta negativamente
NEGATIVELY SUPERCOILED
or NEGATIVE SUPERTWIST
(most common in pro- and eukaryotes)**

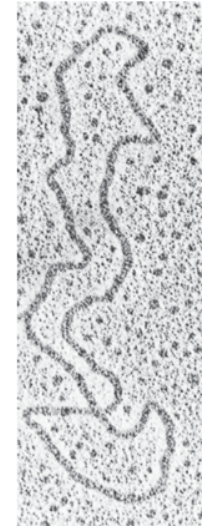
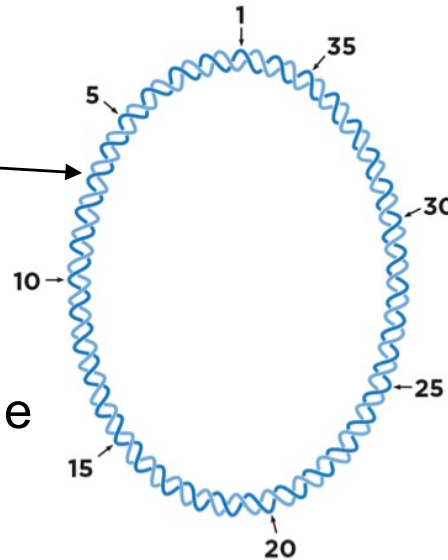
$Lk = Tw + Wr$

Linking number = Twist + Writh

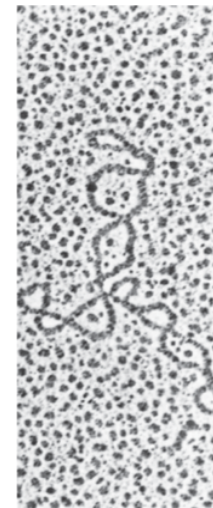
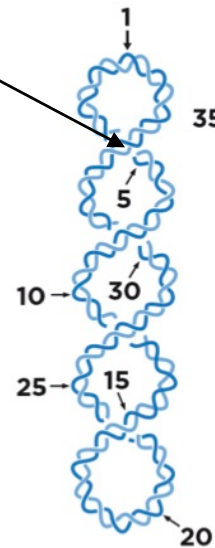
Twist: il numero (**massimo**) di volte che un filamento gira intorno all'altro. Determinato dalla lunghezza del DNA

Writhe: il numero delle volte che la doppia elica si incrocia su se stessa. Dovuta a stress torsionale (filo del telefono).

Linking number (Lk): numero di legame topologico, il numero di volte che un filamento deve essere passato attraverso l'altro affinché le due catene possano separarsi. (il Writhe riduce Twist risulta Lk)

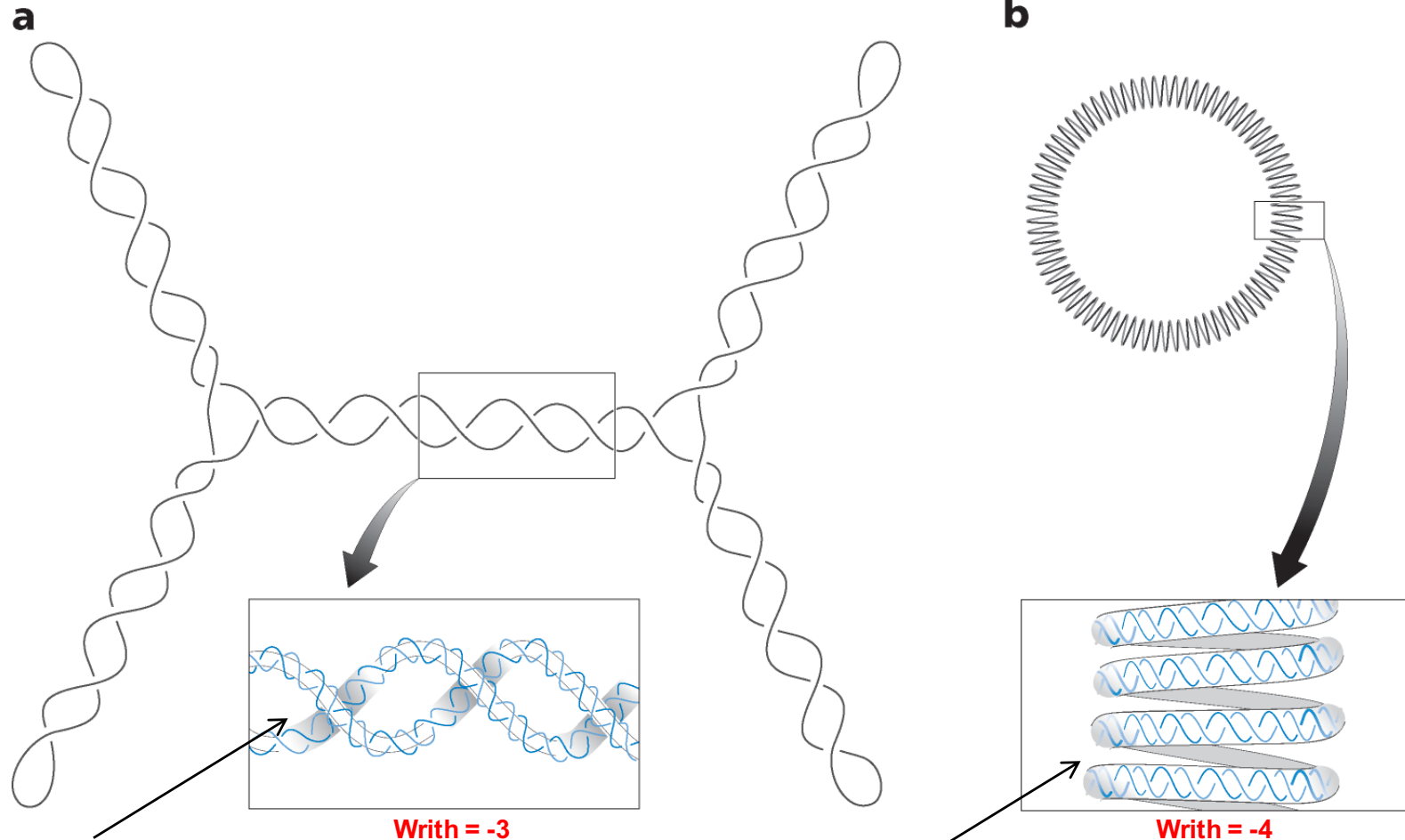


**PM2 phage
DNA
rilassato**



**PM2 phage
DNA
superavvolto**

Il writh può presentarsi sotto due forme diverse



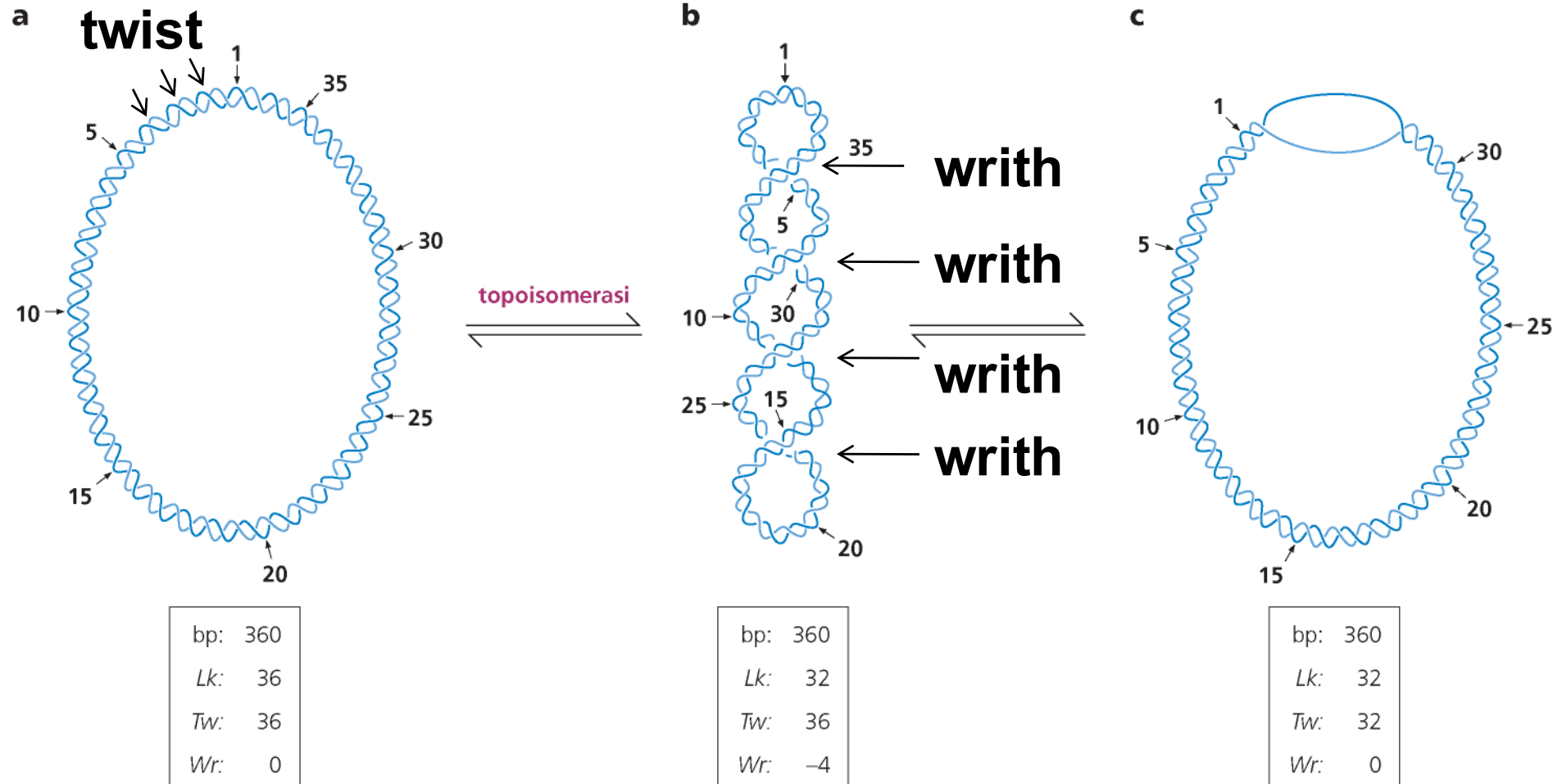
Writh
(numeri di incroci
dell' asse longitudinale
su se stesso)

Writh plectonemico

Writh
(numeri spirali cccDNA)

Writh toroide o spirale

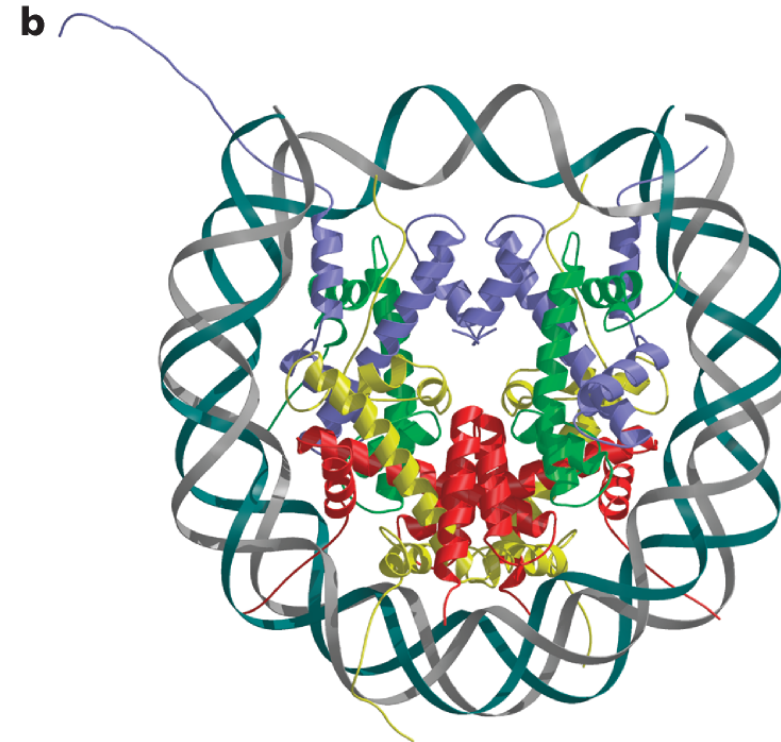
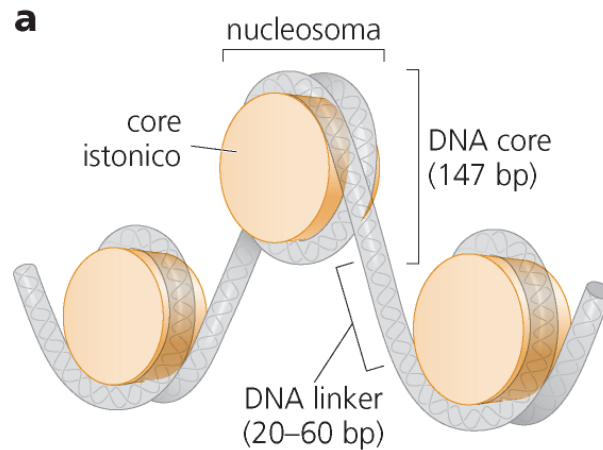
Il twist = numeri di volte un filamento gira intorno un altro filamento



$$Lk = Tw + Wr$$

Other number: Lk_0 : twist in forma B, rilassato: 10500bp; 10.5 pb/turn: $Lk_0=1000$

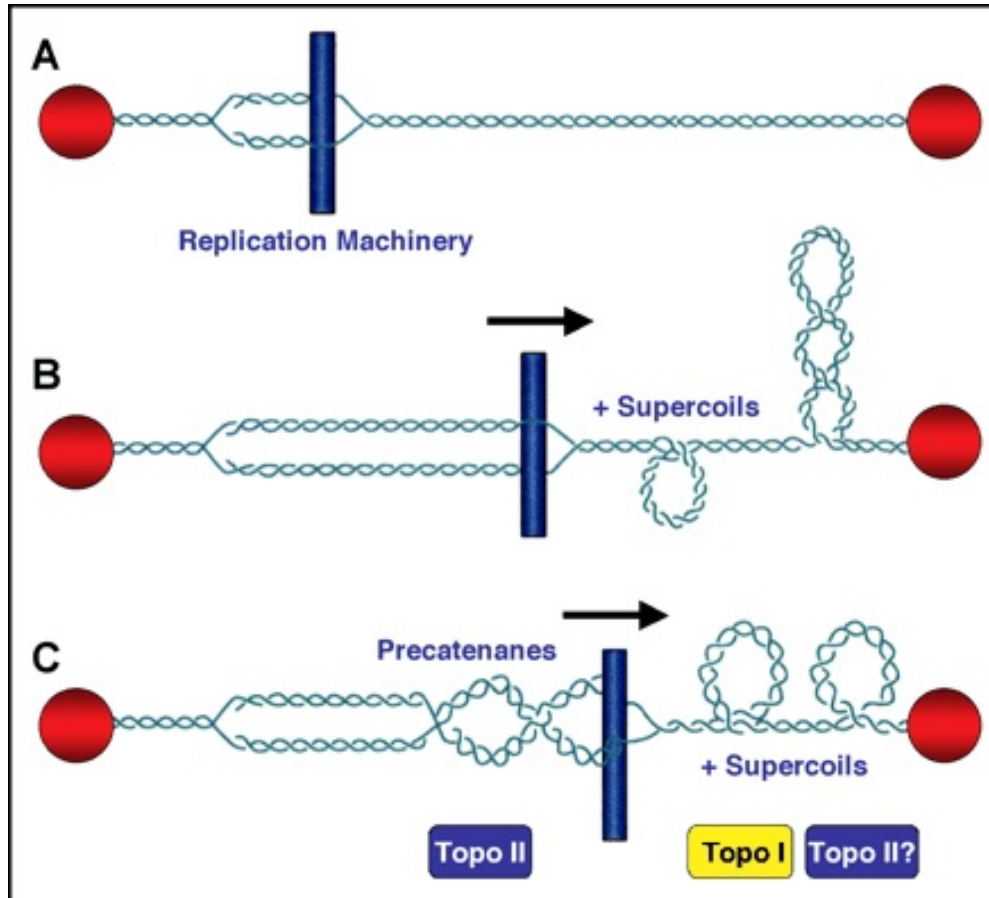
I nucleosomi introducono **superavvolgimenti negativi** nel DNA degli eucarioti



Il DNA nel nucleo delle cellule eucariotiche è compattato e la struttura di base è il nucleosoma (avvolgimento di due giri circa attorno all'ottamero istonico). E' un toroide o spirale sinistrorsa -> superavvolgimento negativo

-> ESSENZIALE PER RIDURRE IL STRESS TORSIONALE DEL DNA.

Come possono essere rimossi i superavvolgimenti di un DNA superavvolto?



Transcription,
Replication, Recombination

→ Torsional stress
→ Supercoil formation
in front of polymerases
→ Block of synthesis

Enzymes cut DNA →
torsional stress released
→ re-ligation of filament

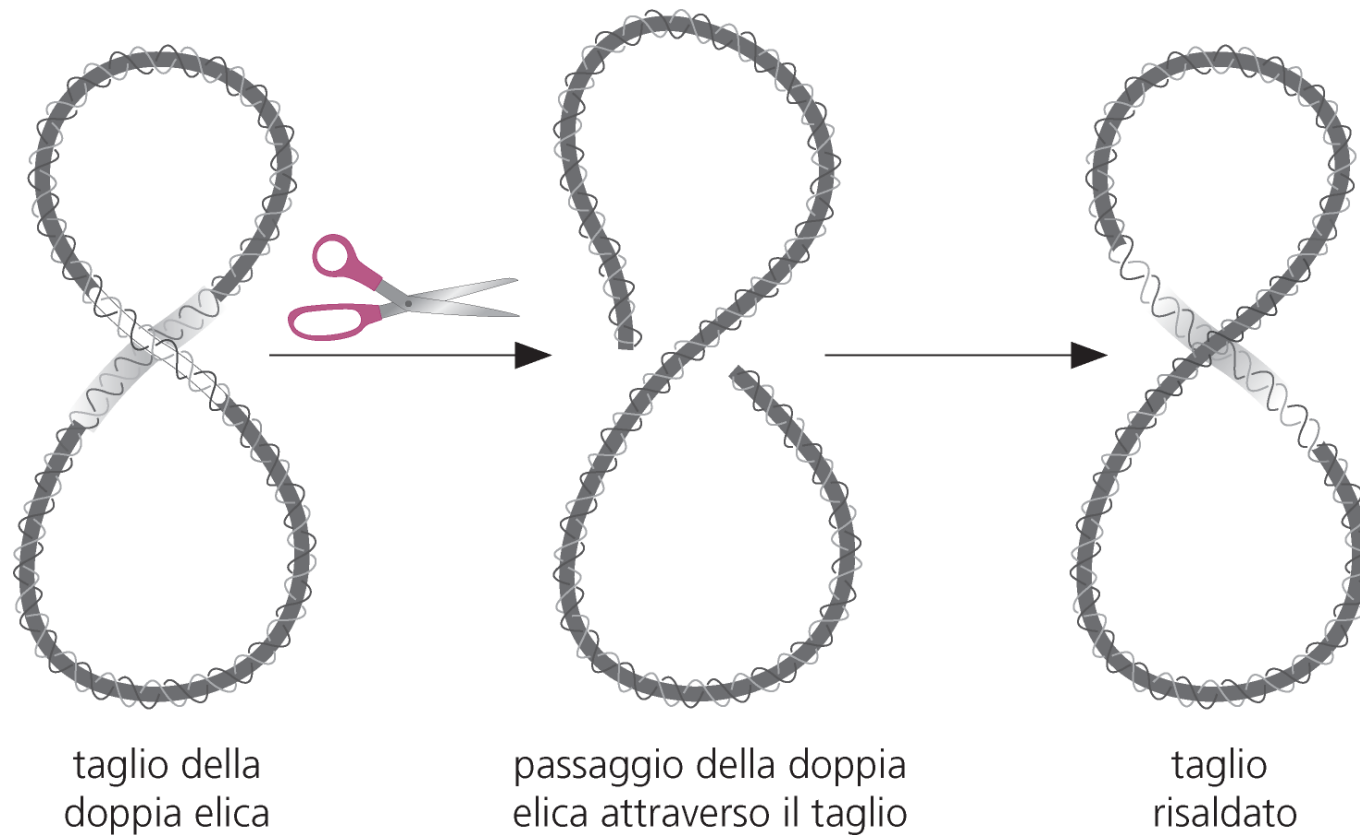
TOPOISOMERASI

TYPE I TOPOISOMERASES

TYPE II TOPOISOMERASES

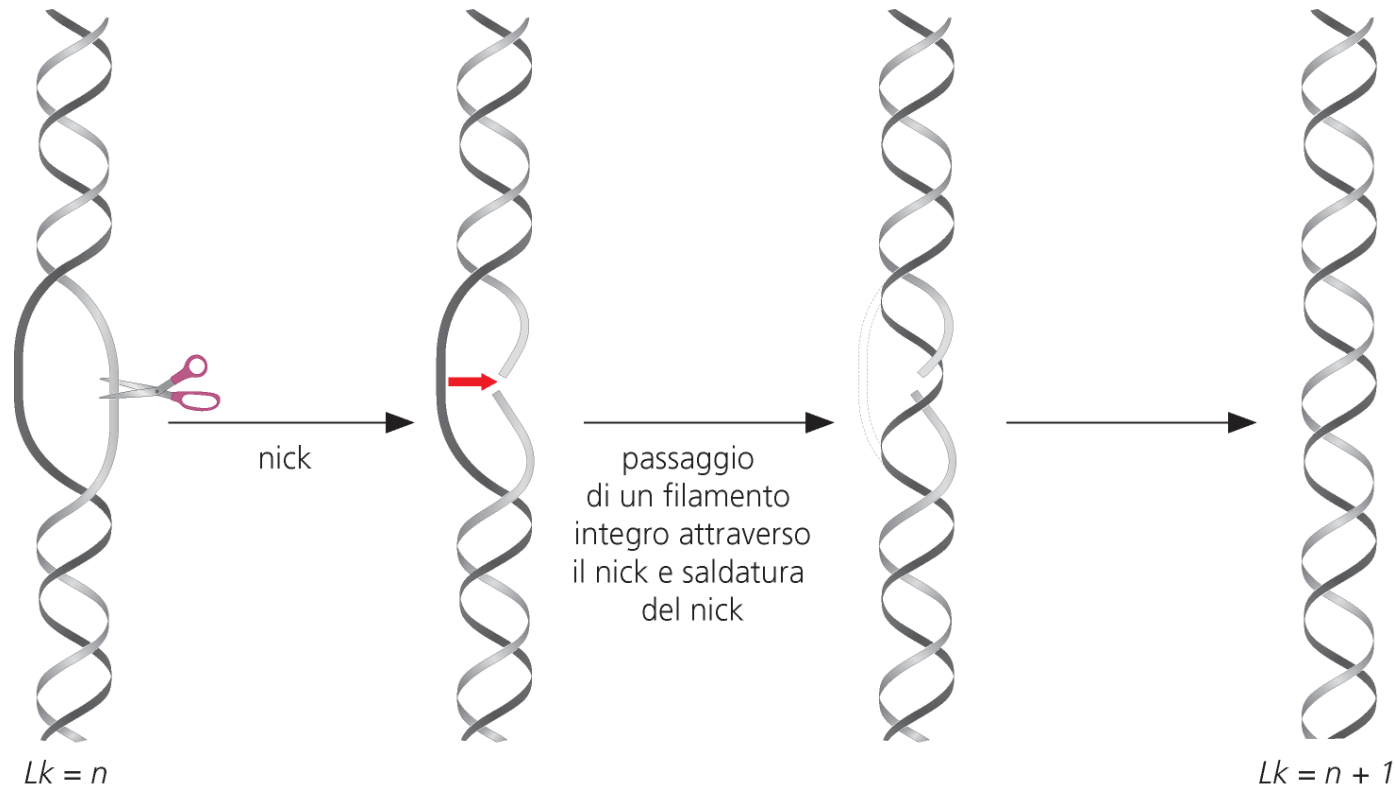
Type II Topoisomerasi → DOPPIO TAGLIO DNA

Topoisomerasi II: cambiano il numero di legami topologici di due unità per volta. Rottura temporanea dei due filamenti del DNA attraverso la quale passa un tratto di elica. **Richiedono energia di idrolisi dell'ATP.**



Type I Topoisomerasi → TAGLIO DNA A SINGOLO FILAMENTO

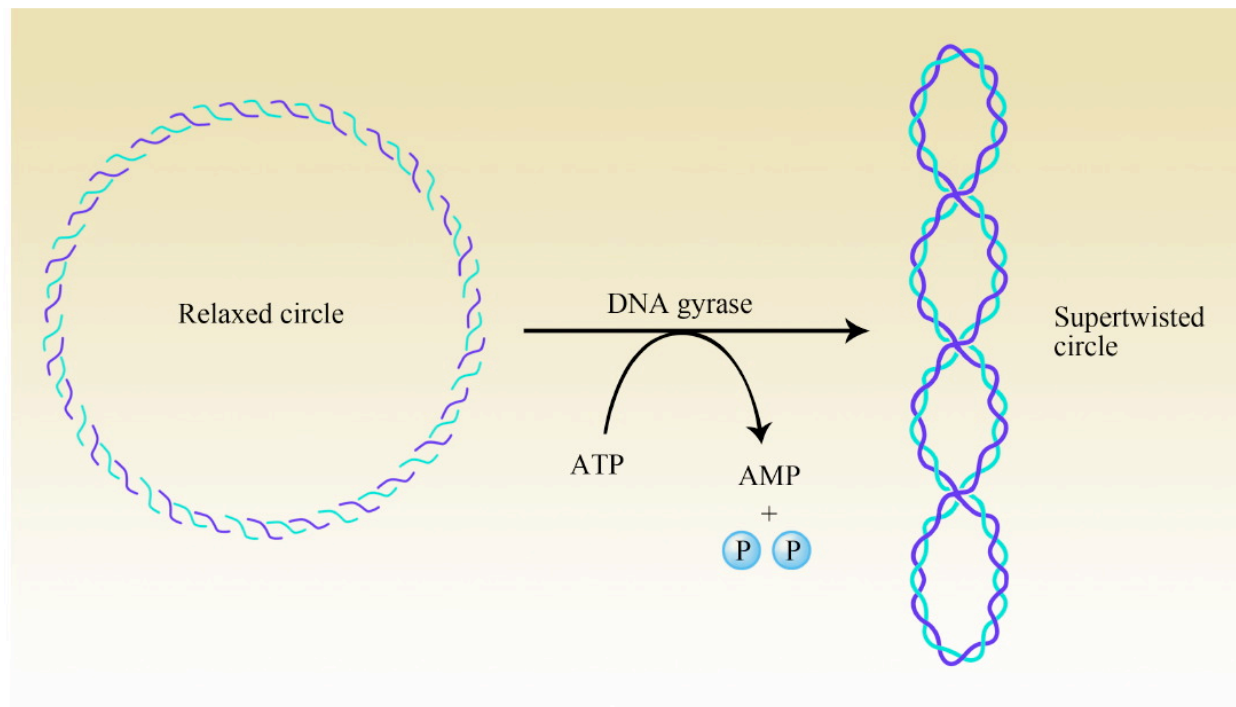
Topoisomerasi I: cambiano il numero di legame topologico uno alla volta. Rotture temporanee sul singolo filamento permettendo a quello integro di passare attraverso la rottura prima che il nick venga eliminato. **Non richiedono ATP.**



I procarioti hanno topoisomerasi che introducono superavvolgimenti nel DNA

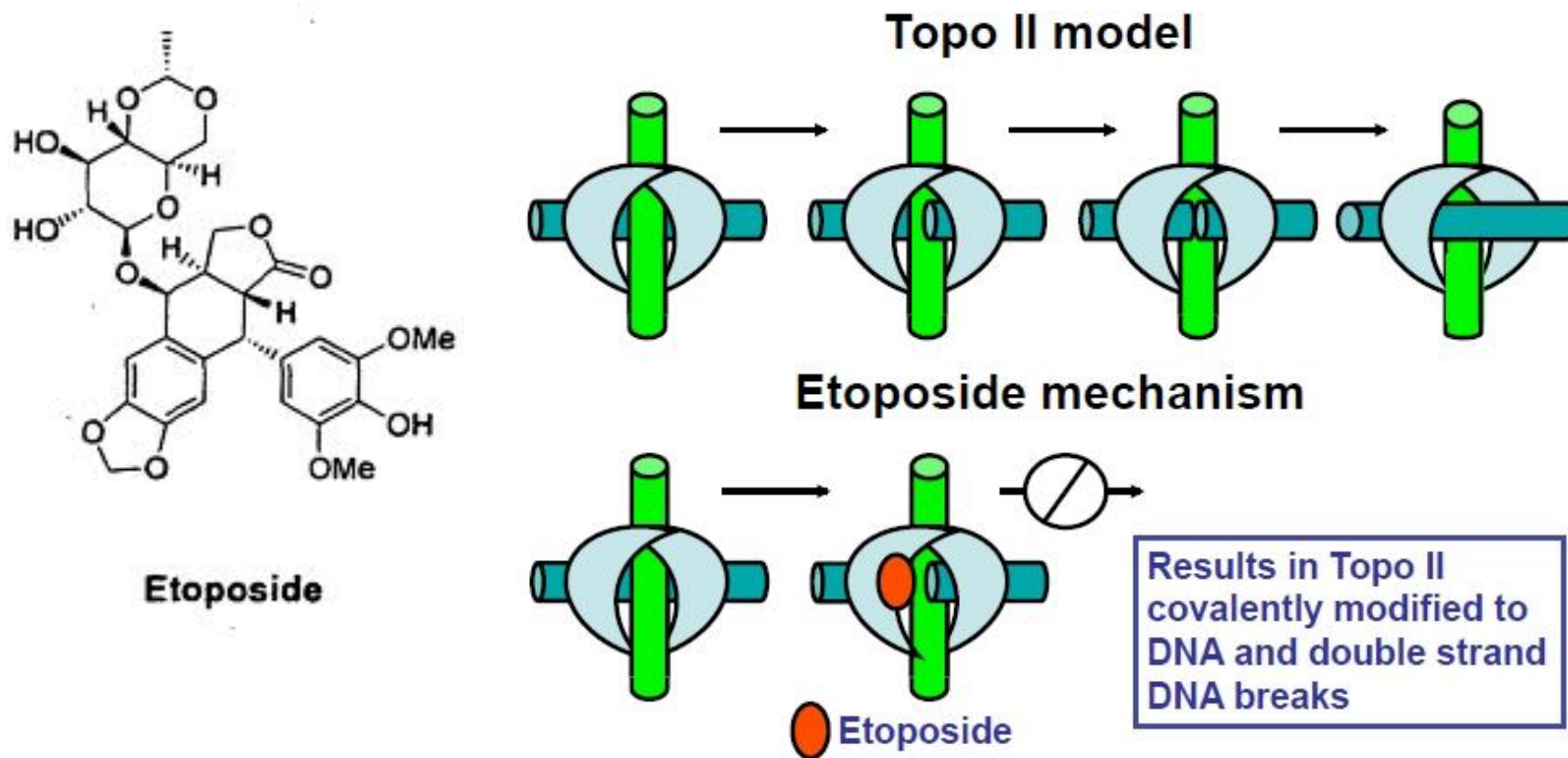
Sia procarioti che eucarioti hanno topoisomerasi I e II che rimuovono superavvolgimenti.

I procarioti hanno anche una topo II (DNA girasi) che introduce superavvolgimenti negativi. Serve a facilitare lo svolgimento (denaturazione) della doppia elica (trascrizione, replicazione, ...)
FOR SOME SPECIES SUPERCOILING IS ESSENTIAL FOR VIABILITY



**DNA girasi
(DNA gyrases)**

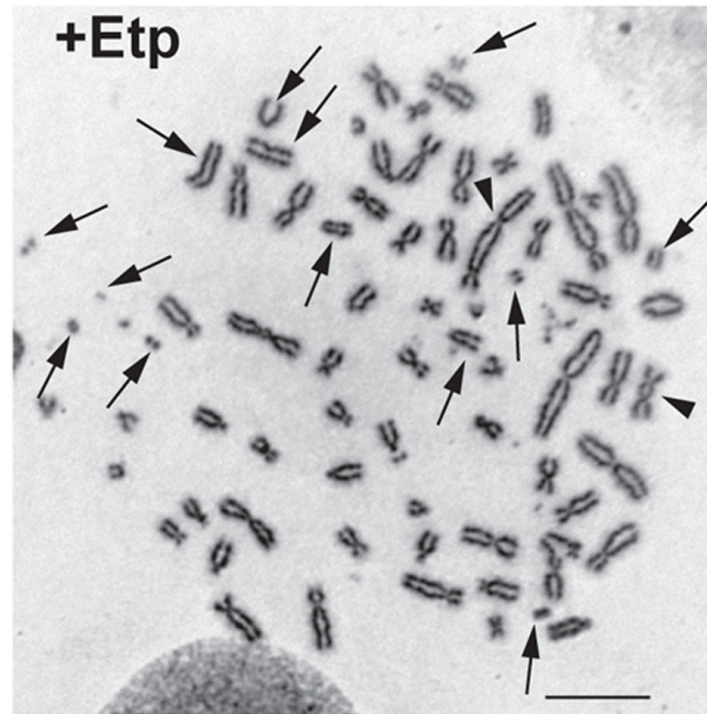
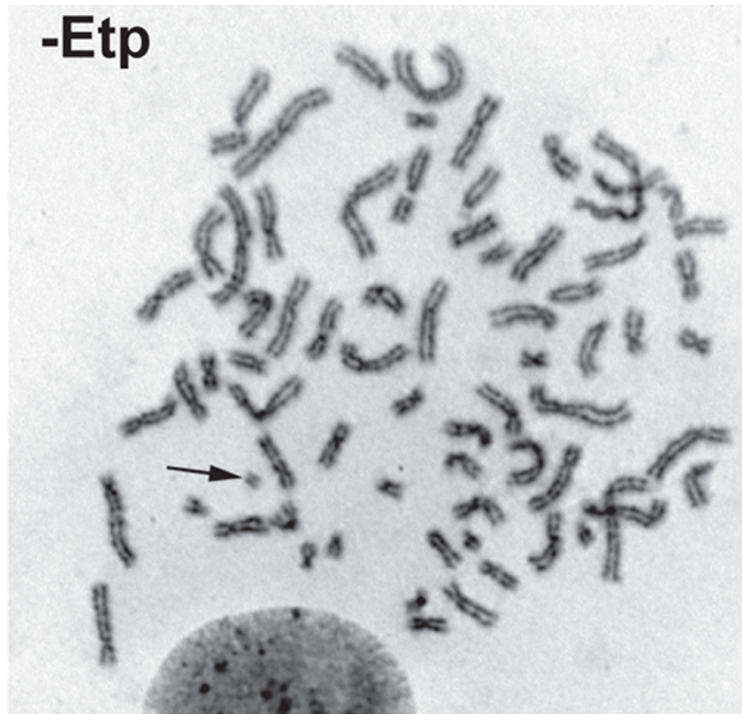
Topoisomerase inhibitors are used as chemotherapeutics



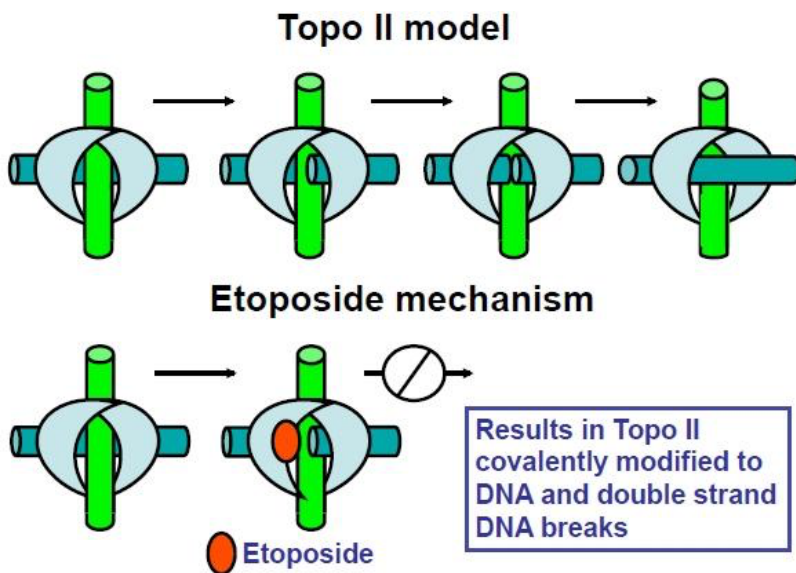
ETOPOSIDE: inibitore della topoisomerasi II usato come farmaco antineoplastico.

Etoposide is a chemotherapy drug mainly used to treat lung cancer and testicular cancer. Doctors can also use it to treat other types of cancer including stomach cancer and non Hodgkin lymphoma. Etoposide is made from the mandrake plant.

Topoisomerase inhibitors are used as chemotherapeutics



**DNA breaks
Genomic instability
CELL DEATH**



NDC 63323-104-05 100405

ETOPOSIDE
INJECTION, USP
20 mg/mL

(100 mg/5 mL)

Must be diluted before IV infusion.

5 mL
Multiple Dose Vial
Rx only

Sterile

Each mL contains:
20 mg etoposide, 2 mg citric acid, 30 mg benzyl alcohol, 80 mg polysorbate 80, 650 mg polyethylene glycol 300, and 30.5 percent (v/v) alcohol.

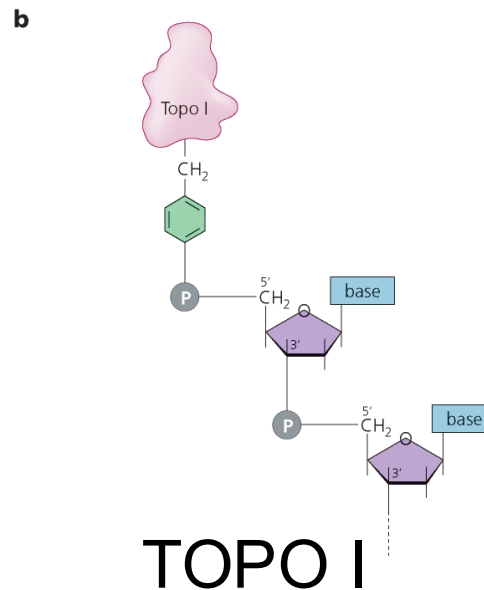
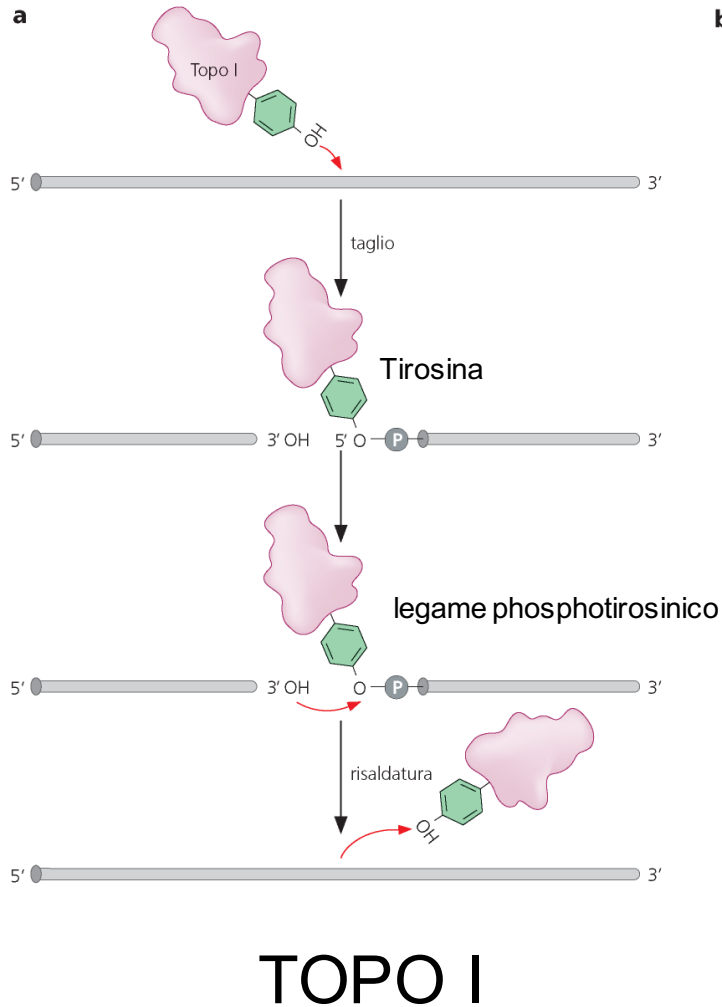
Usual Dosage: See insert.
Store at 20° to 25°C (68° to 77°F) [see USP Controlled Room Temperature].
Vial stoppers do not contain natural rubber latex.

APP Pharmaceuticals, LLC
Schaumburg, IL 60173

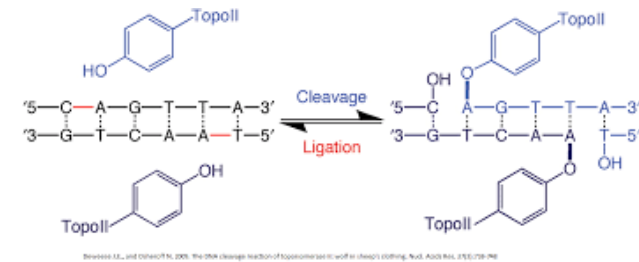
401602E
LOT/EXP



Le topoisomerasi usano un legame covalente proteina-DNA per tagliare e risaldare i filamenti del DNA



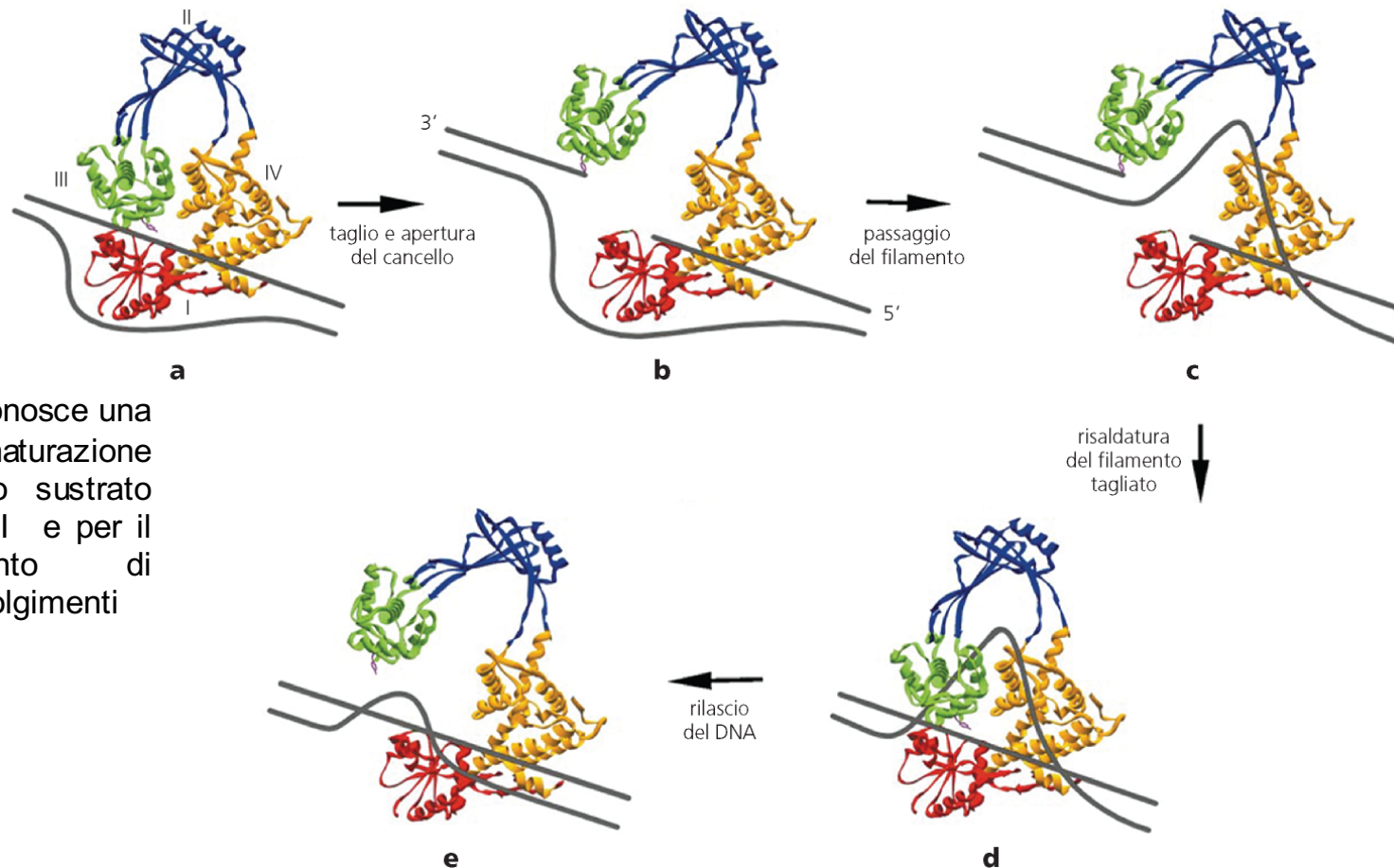
Il meccanismo è simile per topo I e topo II.



Un residuo di tirosina presente nel sito catalitico attacca un legame **fosfodiesterico** del DNA, ne provoca la rottura ma resta legata. Il legame fosfotirosina conserva l'energia per cui il DNA può essere risaldato.
 Topo II richiede ATP, pero l'ATP serve per promuovere cambiamenti nella conformazione del complesso.

Modello della reazione catalizzata dalla topo I

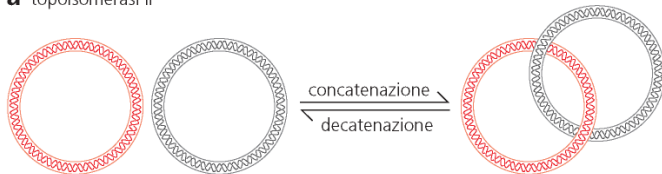
Prima della chiusura del DNA la topo promuove il passaggio di un tratto di DNA attraverso il taglio.



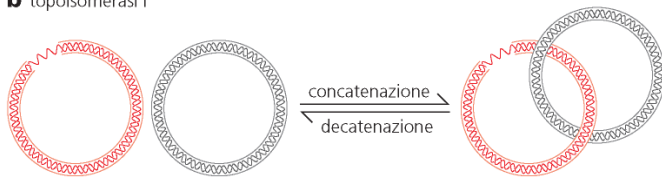
Topo I riconosce una locale denaturazione → ottimo substrato per Topo I e per il rilassamento di superavvolgimenti

Le topoisomerasi permettono anche l'eliminazione di nodi e la separazione di molecole di DNA

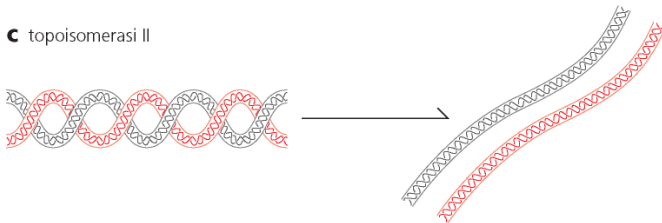
a topoisomerasi II



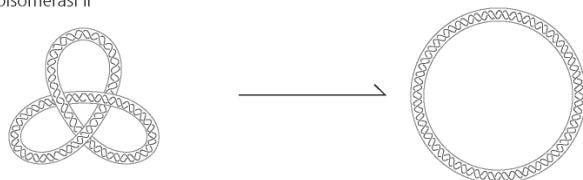
b topoisomerasi I



c topoisomerasi II



d topoisomerasi II



Le topoisomerasi possono **concatenare** o **decatenare** molecole circolari di DNA.

a)Essenziale per decatenare il DNA alla fine della replicazione.

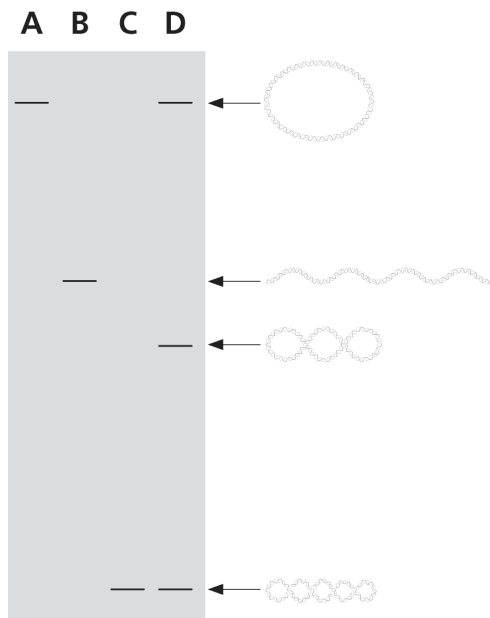
b)Anche topo I può decatenare però una delle due molecole deve avere un nick.

c)Non solo nel DNA circolare ma anche nei cromosomi lineari.

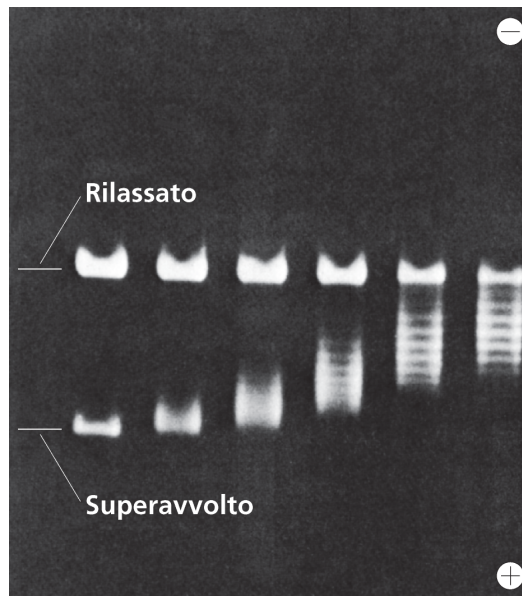
d)Il DNA può formare anche dei nodi (ad es. durante la ricombinazione sito-specifica).

ETOPOSIDE: inibitore della topoisomerasi II usato come farmaco antineoplastico.

I topoisomeri di DNA possono essere separati mediante elettroforesi



Più elevato è il numero di write (più superavvolto) più compatto è il cccDNA più veloce migra in elettroforesi.



topoisomerase



Ethitiumbromide
Intercalates into
DNA →
UV-light →
Red light emission

Alcuni video sulla topologia del DNA e sulle topoisomerasi

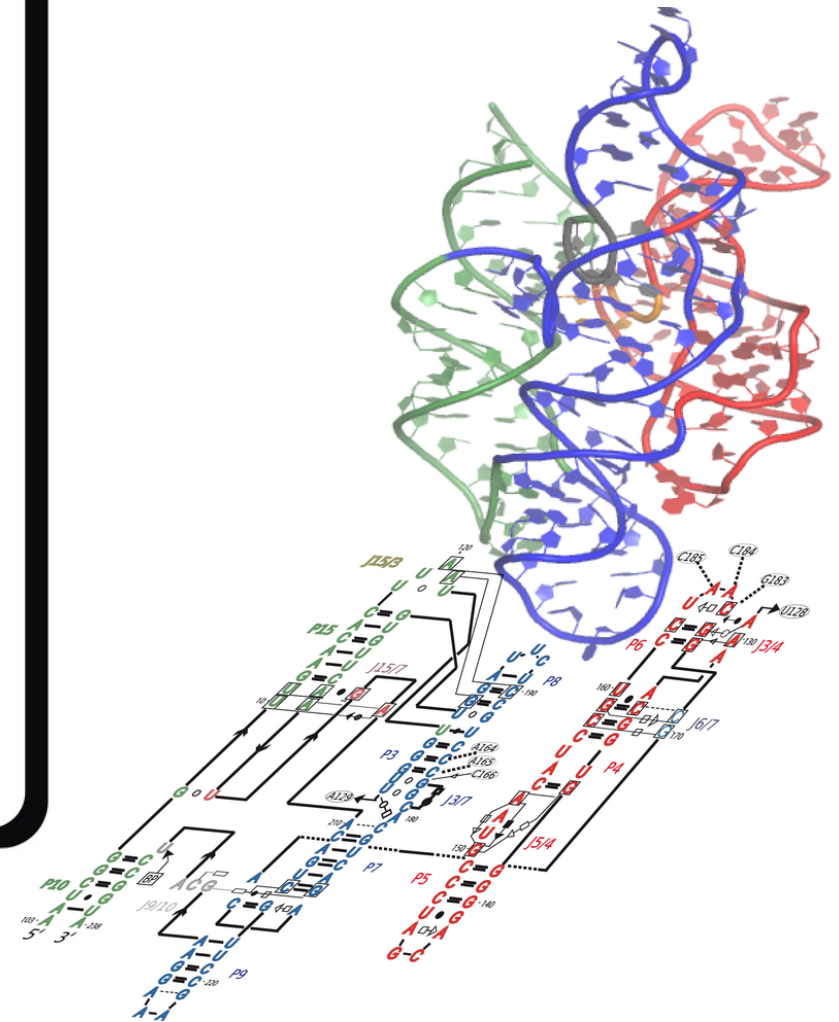
<http://www.youtube.com/watch?v=az2c6UbEdug>

<http://www.youtube.com/watch?v=3QWA-tFdGN8&feature=related>

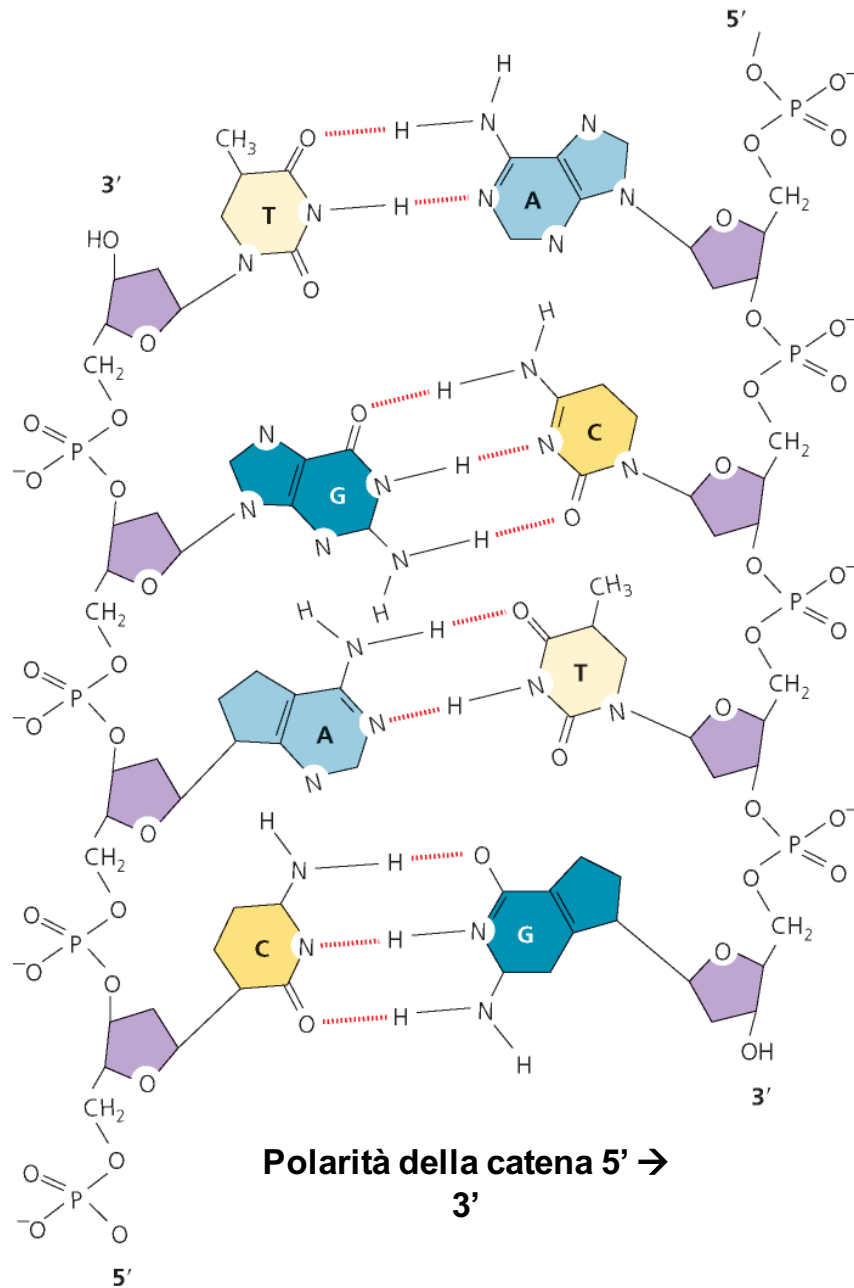
<http://www.youtube.com/watch?v=EYGrEIVyHnU>

2. La struttura e versatilità dell'RNA

<p>Cytosine</p> <chem>NC1=NC(=O)NC=C1</chem> <p>Guanine</p> <chem>O=C1NC2=C(N1)N=CN=C2</chem> <p>Adenine</p> <chem>NC1=NC=NC2=C1N=CN2</chem> <p>Thymine</p> <chem>CC1=CNC(=O)NC1=O</chem> <p>Nitrogenous Bases</p>	<p>DNA Deoxyribonucleic Acid</p>	<p>Cytosine</p> <chem>NC1=NC(=O)NC=C1</chem> <p>Guanine</p> <chem>O=C1NC2=C(N1)N=CN=C2</chem> <p>Adenine</p> <chem>NC1=NC=NC2=C1N=CN2</chem> <p>Uracil</p> <chem>O=C1NC=CC(=O)N1</chem> <p>Replaces Thymine in RNA</p> <p>Nitrogenous Bases</p>	<p>RNA Ribonucleic Acid</p>
--	---	---	--



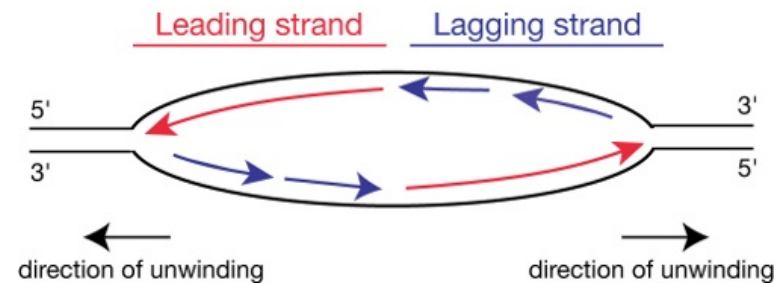
CARATTERISTICHE DEL DNA



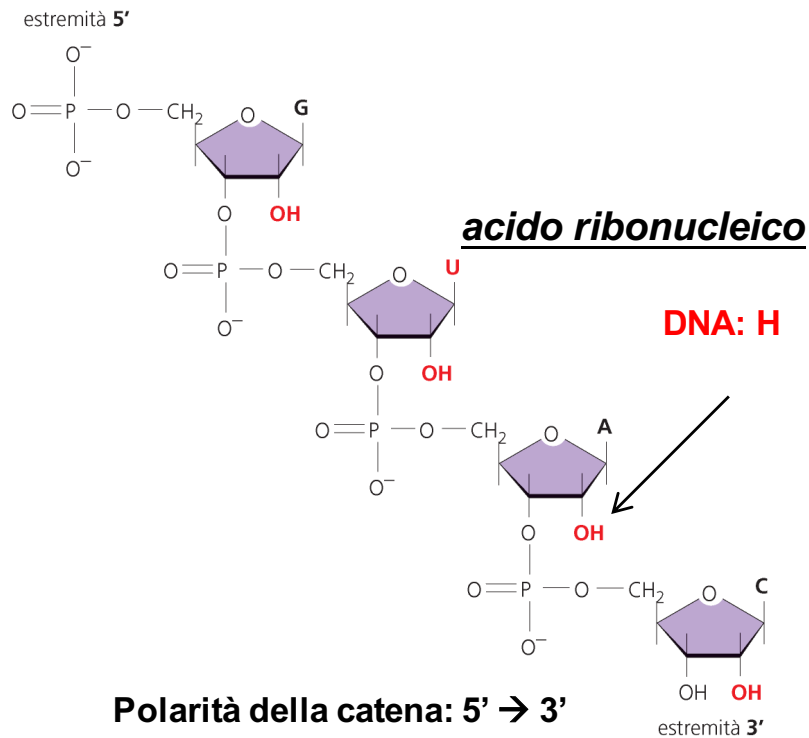
DNA (acido desossiribonucleico o deossiribonucleico)

3 caratteristiche del DNA:

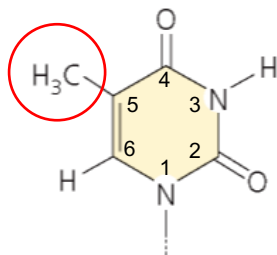
- 1) 2'-desossiribosio
- 2) Adenina, Timina, Citosina, Guanina
- 3) E' una doppia catena polinucleotidica
- 4) Legame fosfodiesterico
- 5) DNA SYNTEHSIS: BI-DIRECTIONAL, con innesco (primer)



CARATTERISTICHE DEL RNA

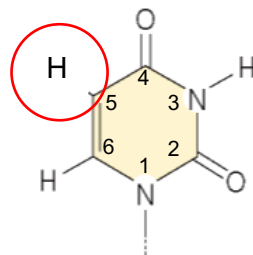


timina



DNA

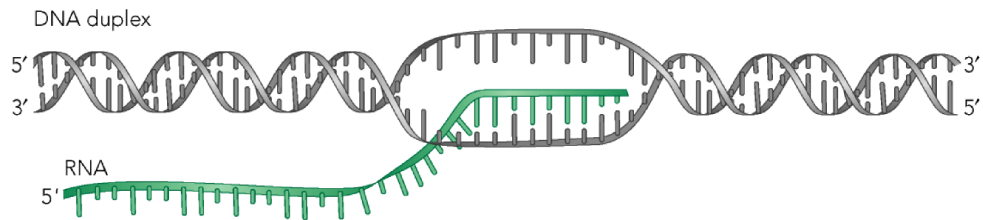
uracile



RNA

3 caratteristiche del RNA:

- 1) Ribosio invece del 2'-desossiribosio
- 2) Adenina, Citosina, Uracile, Guanina
!!!Uracile al posto della timina!!!
- 3) E' una singola catena polinucleotidica
- 4) Legame fosfodiesterico
- 5) RNA synthesis: UNI-DIRECTIONAL,
senza innesco (primer)



Why???

Uracile is evolutionary older!

Thymine is methylated form of Uracil

Thymine gives a more stabilized structure to DNA

RNA is an easily degradable (mechanism of gene regulation)

RNA IS “MULTIPOTENT”

Tranne alcune eccezioni è a singolo filamento

Non è un materiale genetico che viene duplicato

Eccezione: alcune RNA viruses: RNA dependent RNA Polymerase

Funzione di intermediario: mRNA

Funzione di raccordo: tRNA

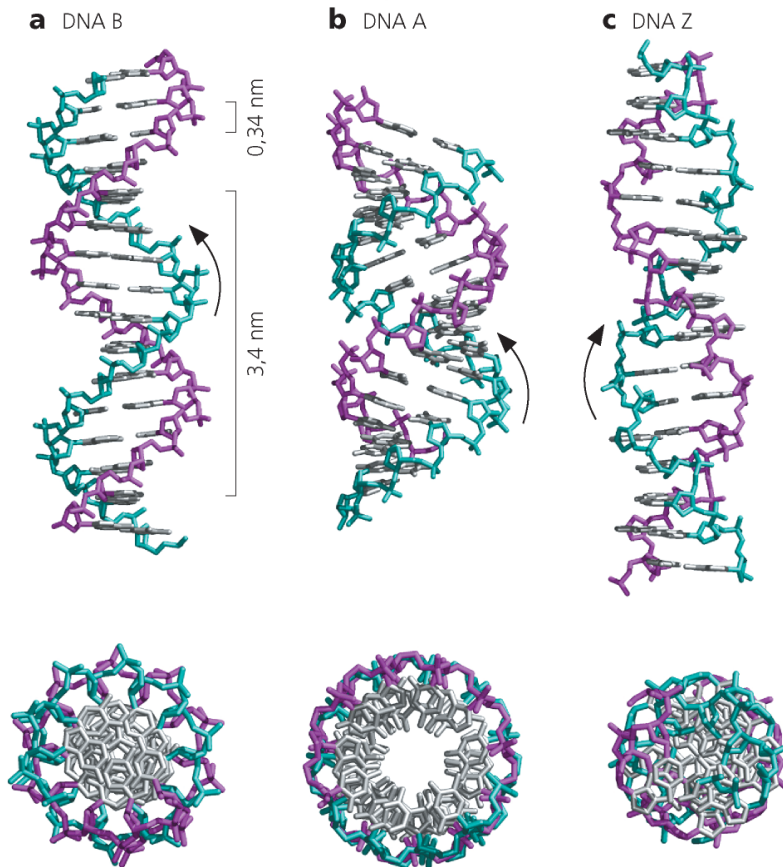
Funzione strutturale: rRNA

Funzione catalitica: ribozimi

**Funzione di regolazione: miRNA, lincRNA, rasiRNA
piRNA, IncRNA, snoRNA, etc, etc**

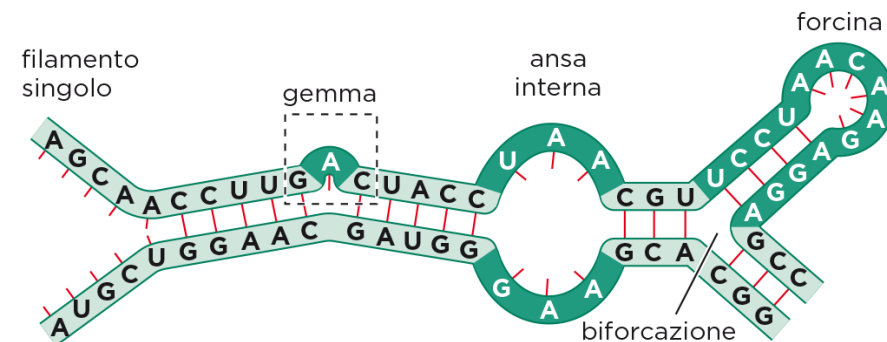
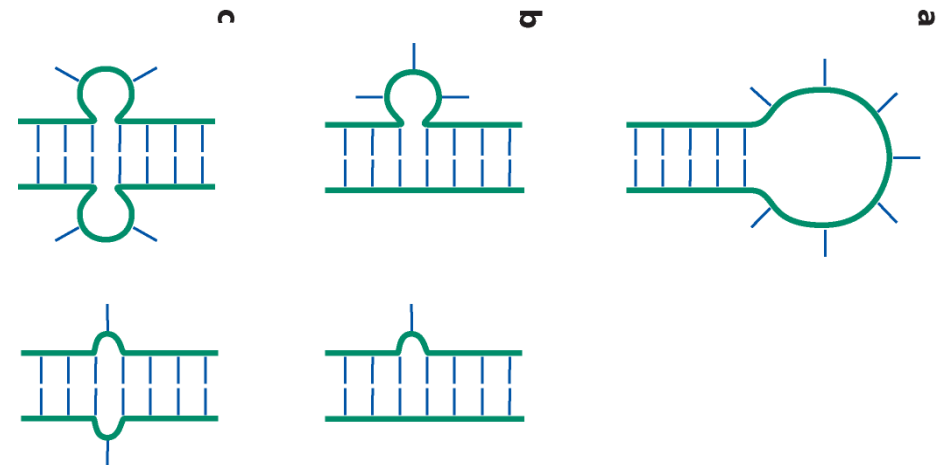
L'RNA può ripiegarsi su se stesso per formare tratti a doppia elica simili al DNA a forma A

DNA: struttura stabile, flessibilità ridotta

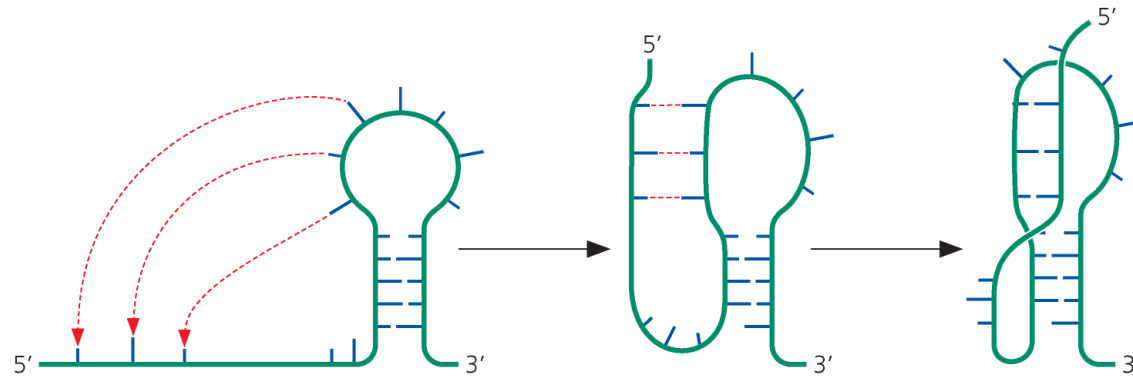


RNA: Struttura flessibile; se due tratti di sequenze complementari si trovano vicini può assumere varie strutture:

- a) Forcina (stem-loop, hairpin)**
- b) Gemma (bulge)**
- c) Ansa (internal loop)**



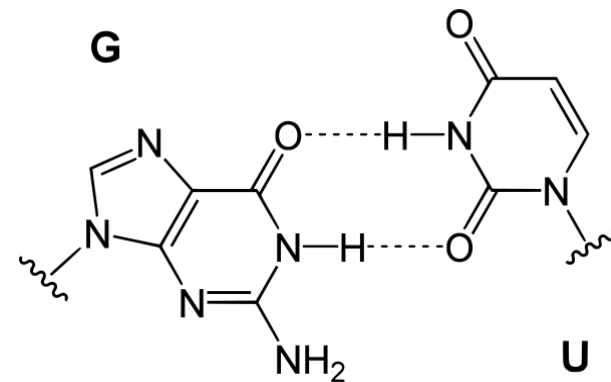
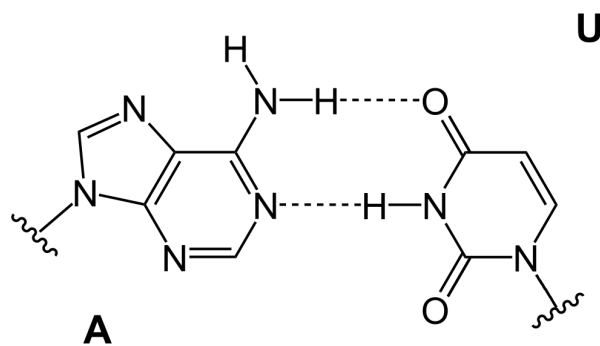
L'RNA può ripiegarsi su se stesso per formare tratti a **doppia elica** simili al DNA a forma A



L'appaiamento di basi può avvenire anche fra regioni non contigue.

**Pseudoknot
con type A helical
twist**

Propensione a formare strutture a doppia elica utilizzando appaiamenti **diversi da Watson e Crick (U-G)**.

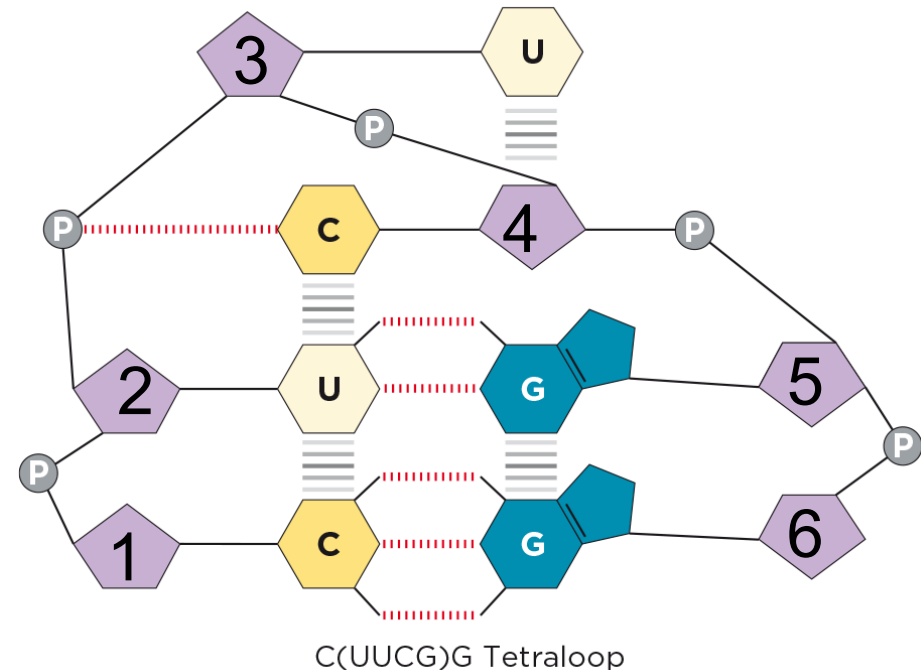
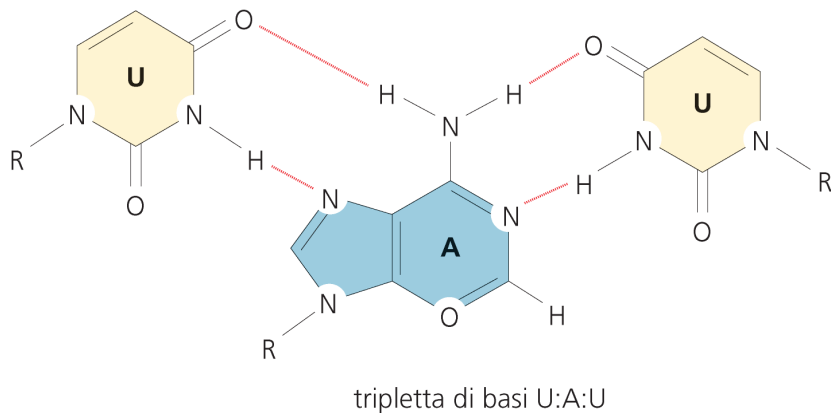


L'RNA può ripiegarsi per formare complesse strutture terziarie

RNA non forma eliche regolari come il DNA è quindi libero di ripiegarsi nelle più diverse strutture terziarie.

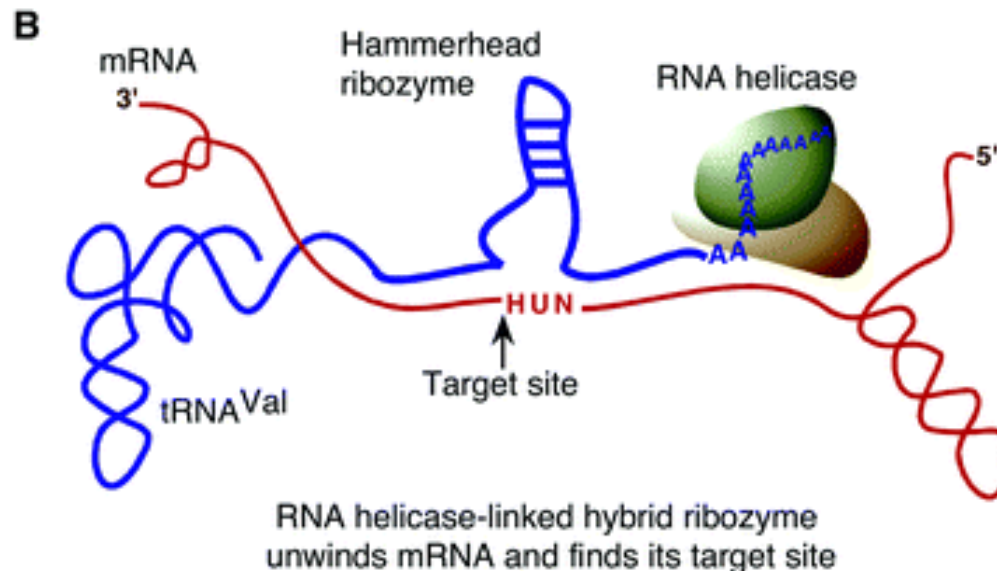
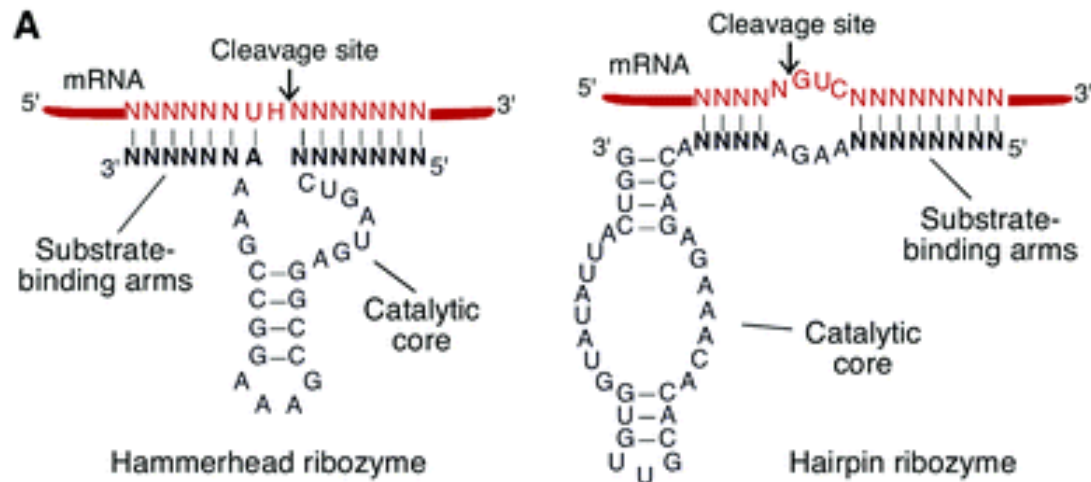
Sono possibili anche legami tra tre basi contemporaneamente.

Anche le proteine possono contribuire alla formazione di strutture terziarie (ribosomi).



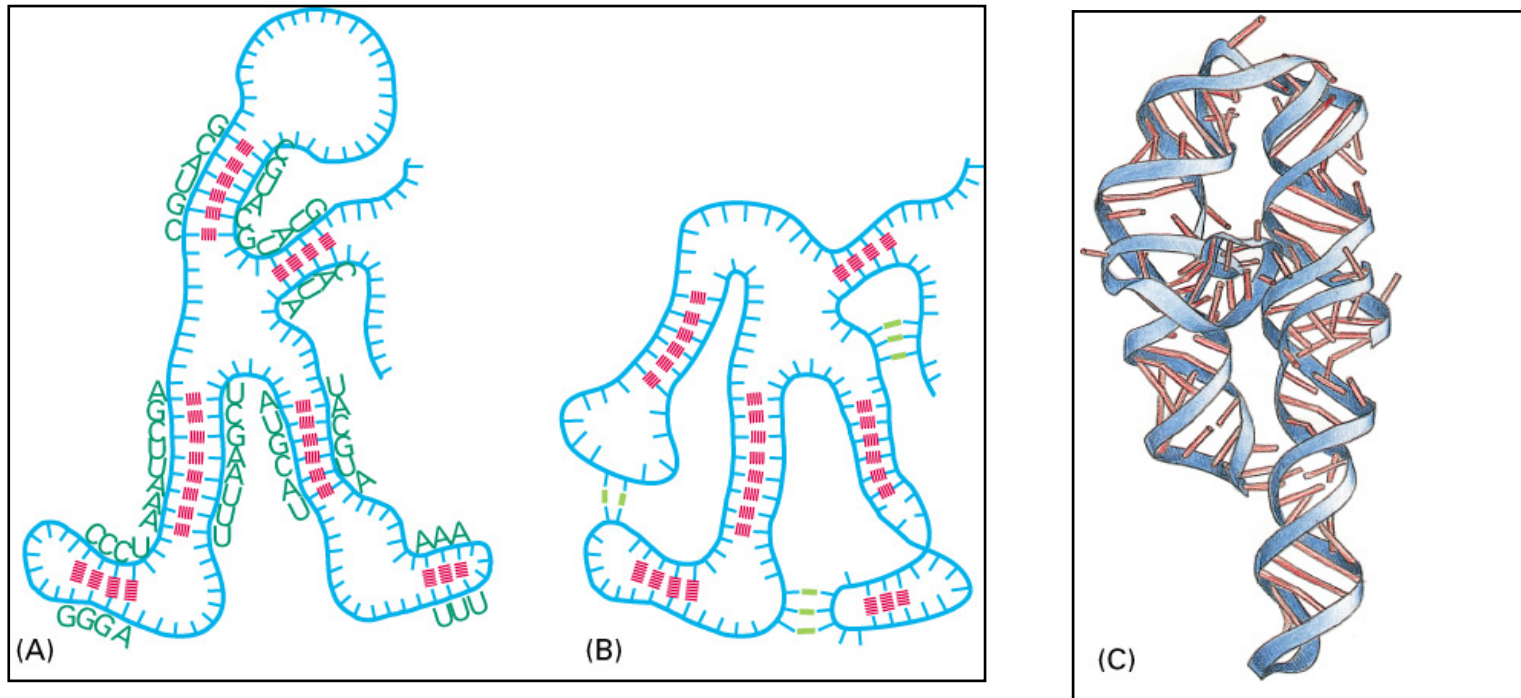
Impilamento tra le basi promuove e stabilizza la struttura del tetraloop

RNA Structure can mediate enzymatic activity = Ribozymes



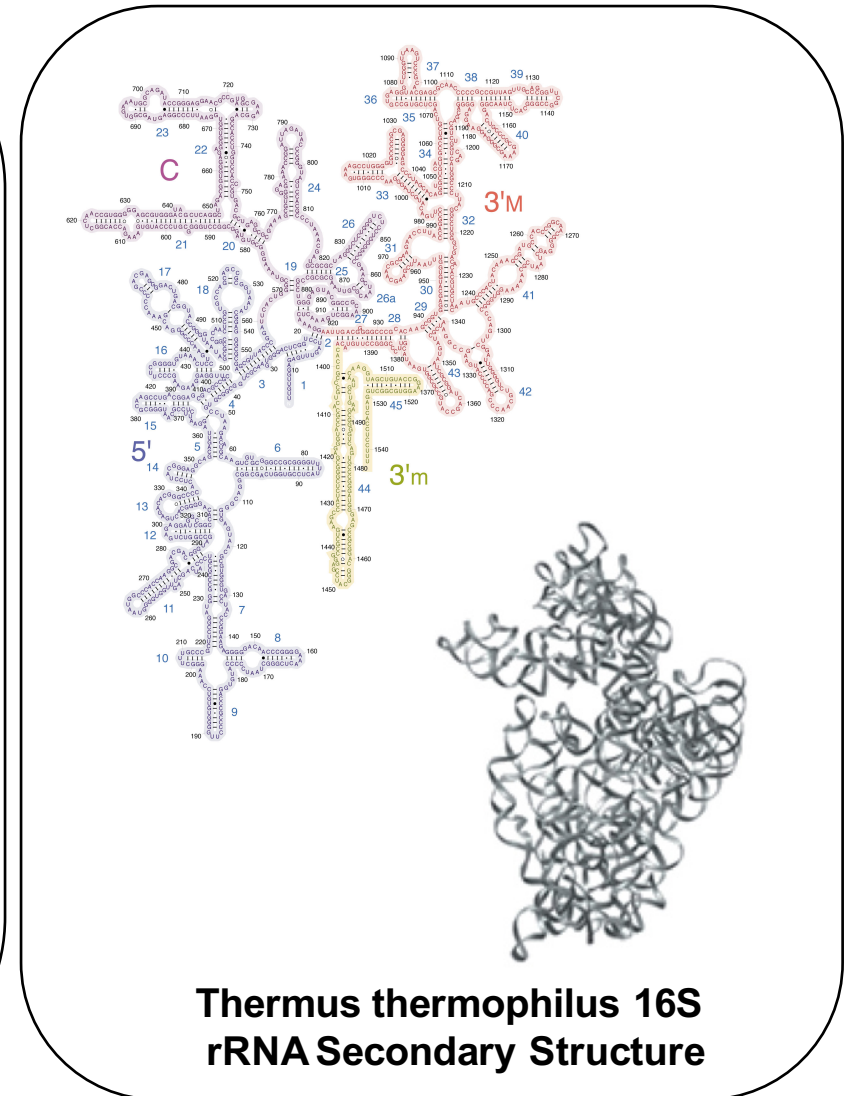
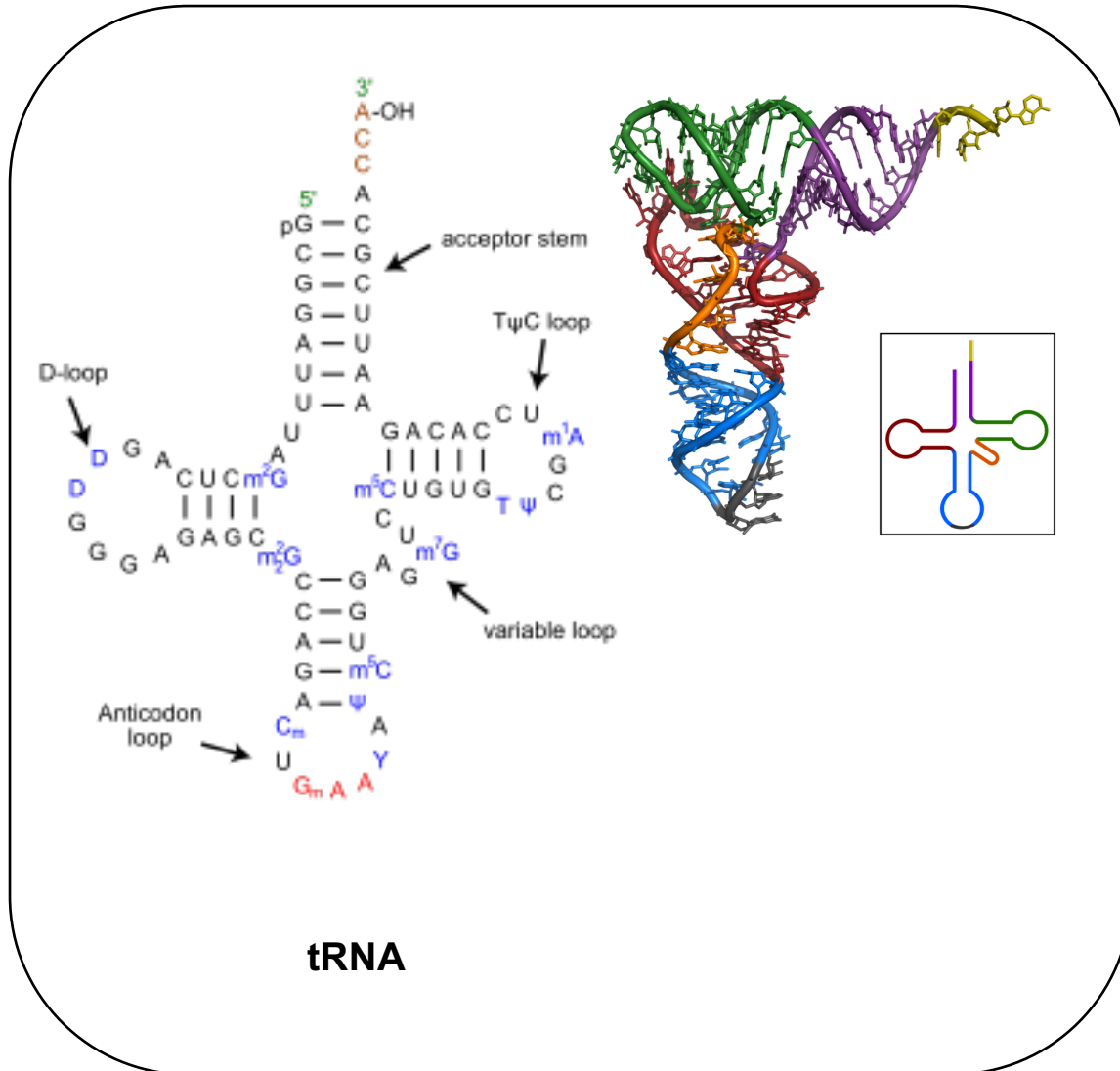
- GIR1 branching ribozyme
- glmS* ribozyme
- Group I self-splicing intron
- Group II self-splicing intron - Spliceosome is likely derived from Group II self-splicing ribozymes.
- Hairpin ribozyme
- Hammerhead ribozyme
- HDV ribozyme
- rRNA - Found in all living cells and links amino acids to form proteins (Ribosome).
- RNase P
- Twister ribozyme
- Twister sister ribozyme
- VS ribozyme
- Pistol ribozyme
- Hatchet ribozyme

Folding dell'RNA



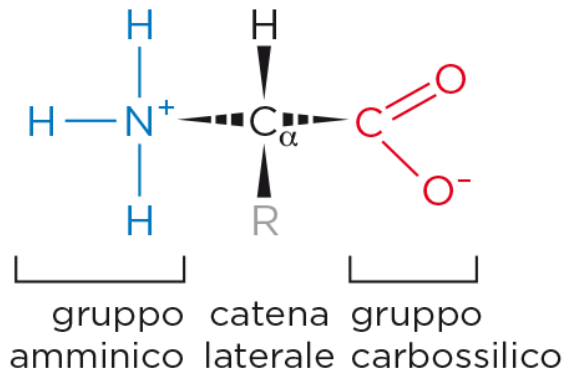
- L'RNA a singolo filamento si ripiega i strutture stabilizzata da base-pair convenzionali (rossi) e non convenzionali (verdi)

RNA structure is important for RNA function



3. La struttura delle proteine

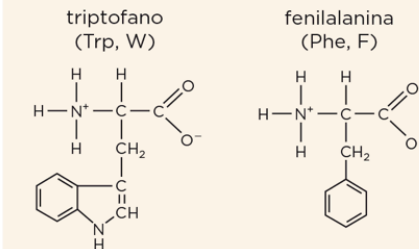
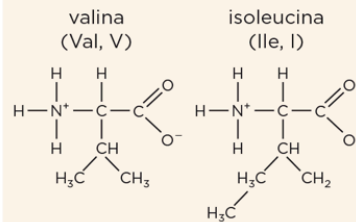
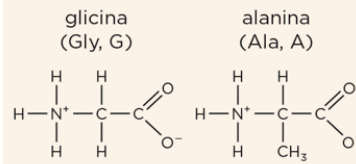
Gli aminoacidi: 20



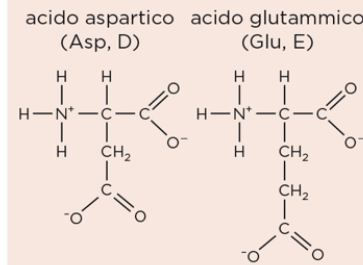
Aminoacids can be post-translationally modified

Phosphorylation, methylation, acetylation,...

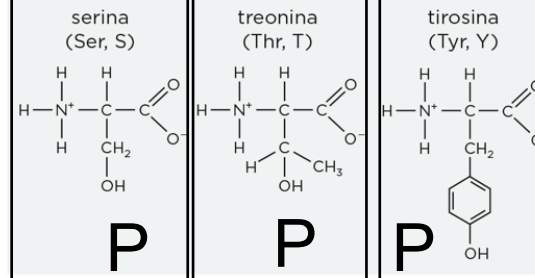
amminoacidi neutri-non polari



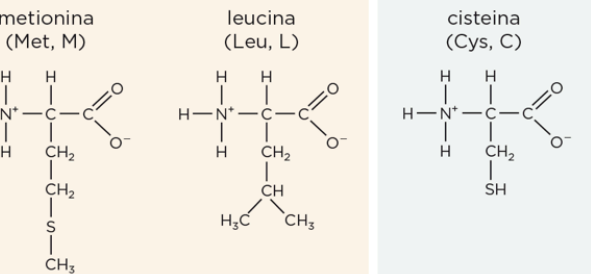
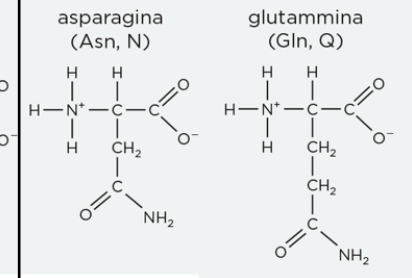
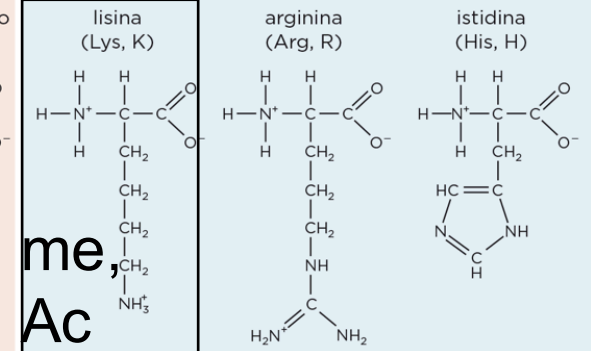
amminoacidi acidi



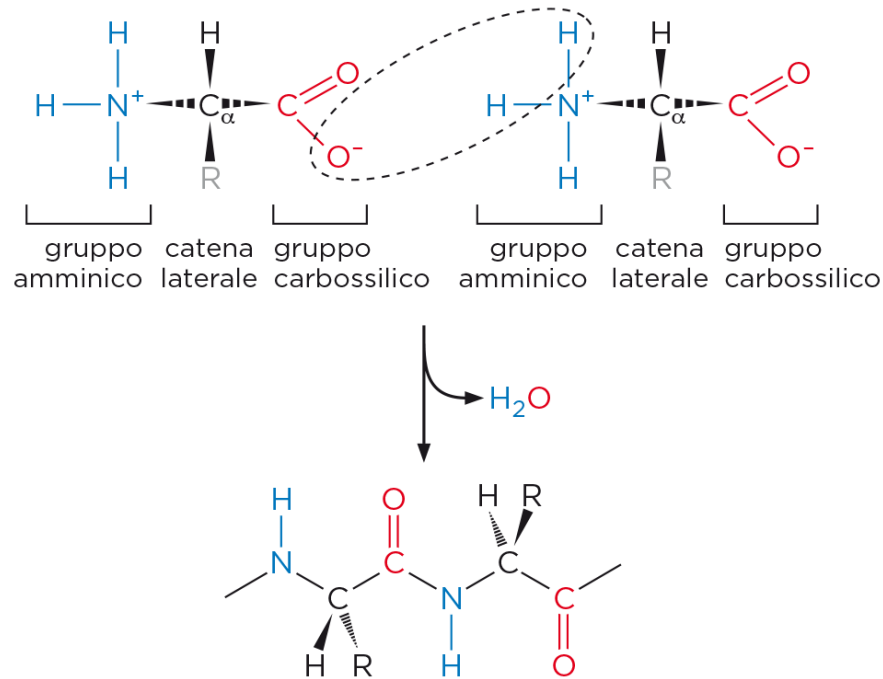
amminoacidi neutri-polari



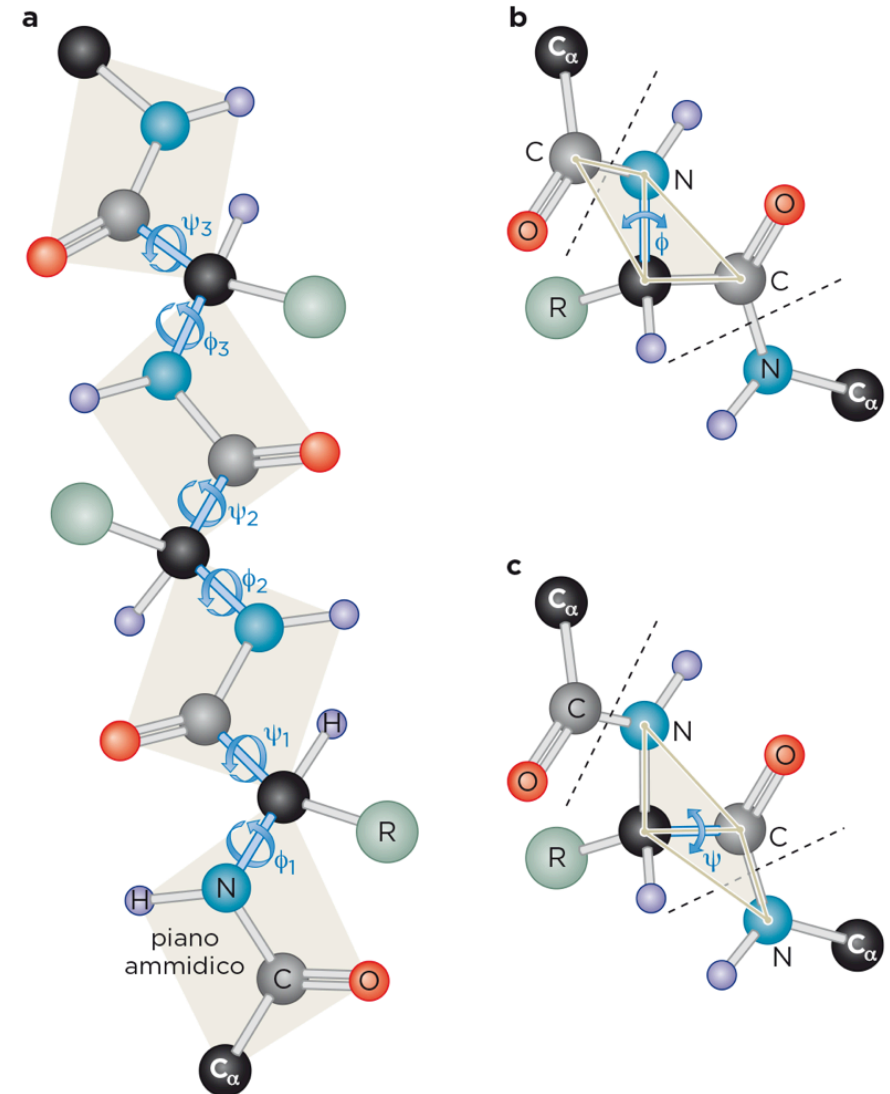
amminoacidi basici



Il legame peptidico: legami covalenti che uniscono gli aminoacidi

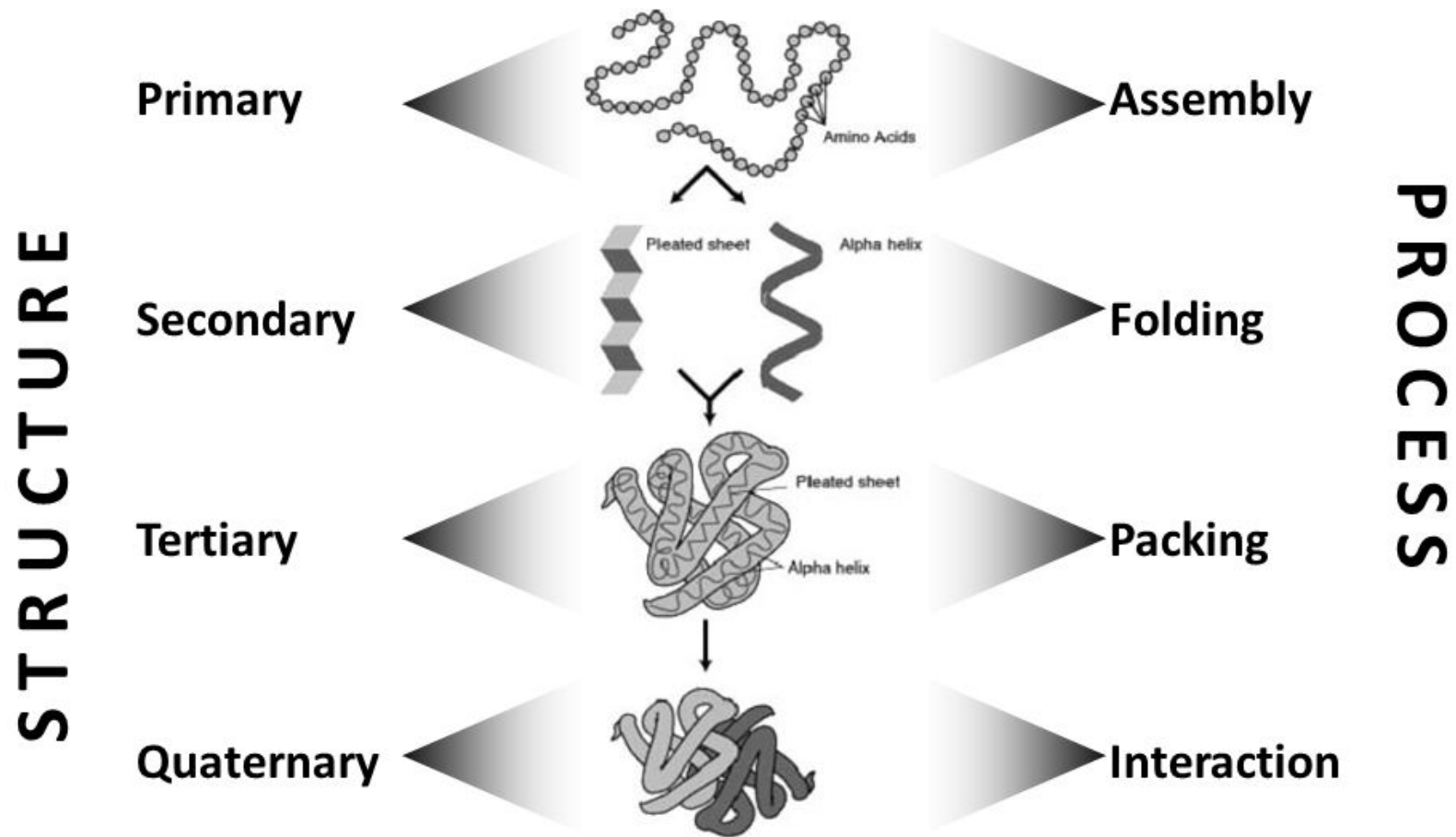


Il legame peptidico si genera nel momento in cui, tramite un processo di condensazione (ovvero l'unione di due strutture molecolari con la perdita di una molecola di H_2O), quando la parte acida di un aminoacido (il gruppo funzionale carbossilico $-\text{COOH}$) si unisce con quella basica di un altro aminoacido (il gruppo funzionale amminico $-\text{NH}_2$). Quando ciò avviene, uno degli idrogeni (H^+) legati all'azoto si separa e si unisce al gruppo OH^- legato al carbonio formando una molecola d'acqua e permettendo a C e ad N di unirsi con un legame detto appunto peptidico



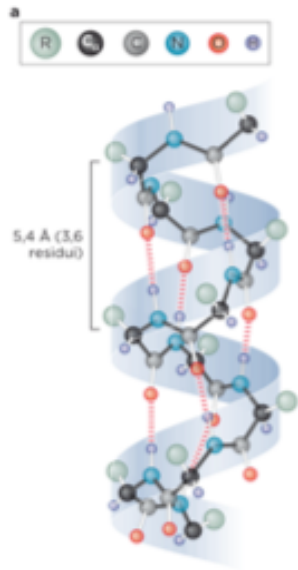
Catena polipeptidica LINEARE - flessibile

Struttura primaria, secondaria, terziaria e quaternaria delle proteine

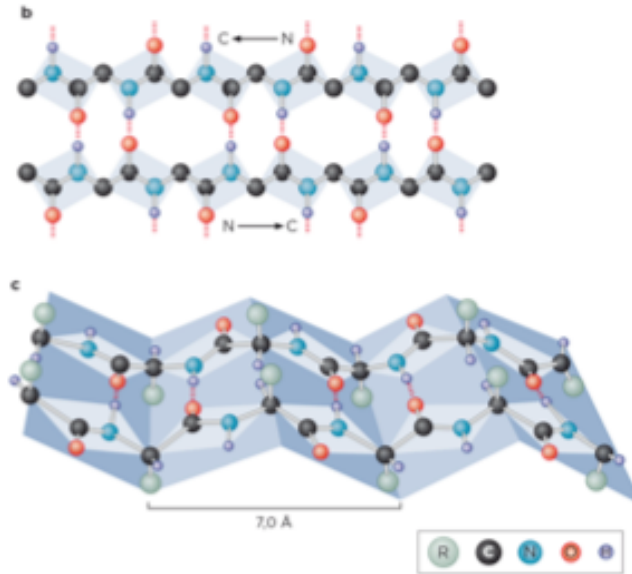


Strutture secondarie delle proteine

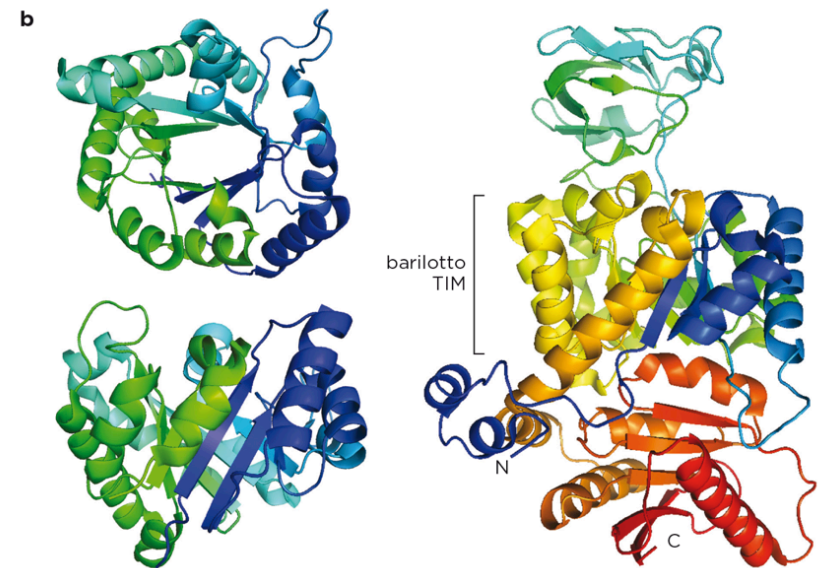
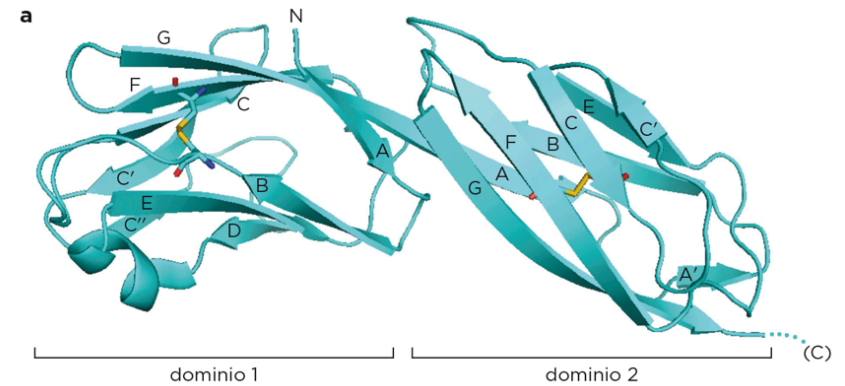
Foglietto beta, antiparallelo
Parallel beta sheet



Alpha helix
Alpha elica
(destorso)



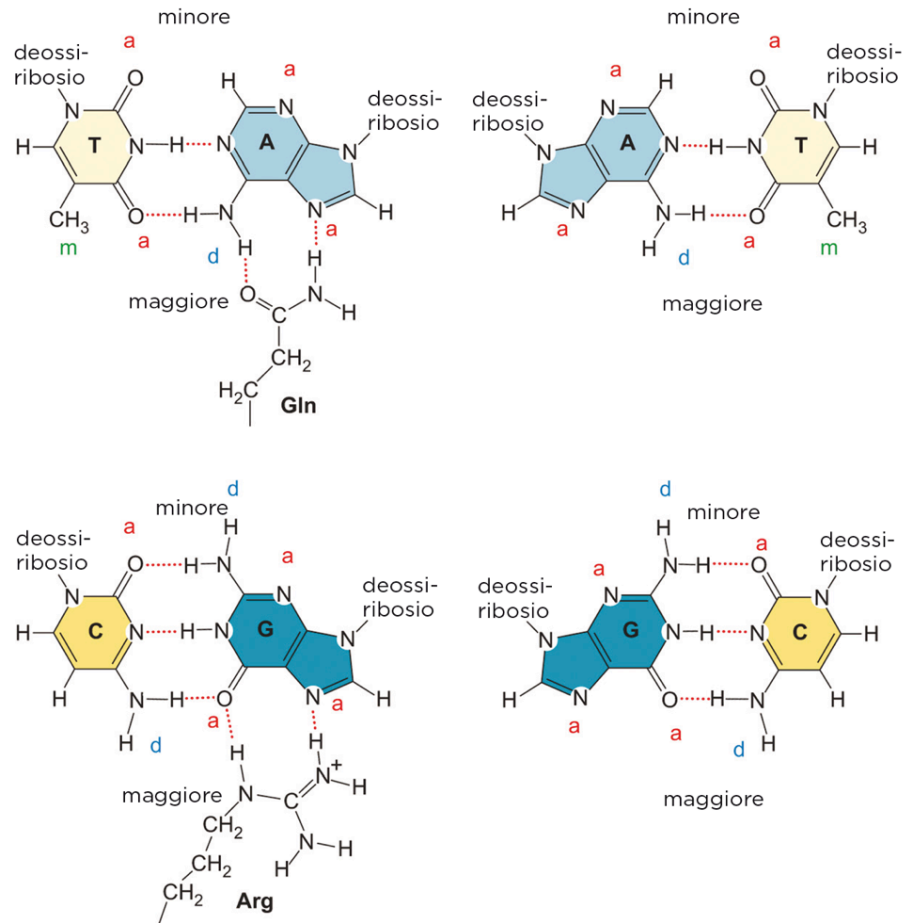
Foglietto beta, parallelo
Parallel beta sheet



Domini: derivano da un antenato comune. Hanno necessariamente lo stesso ripiegamento, e spesso (ma non sempre) hanno sequenze amminoacidiche tanto simili da renderne evidente l'origine comune

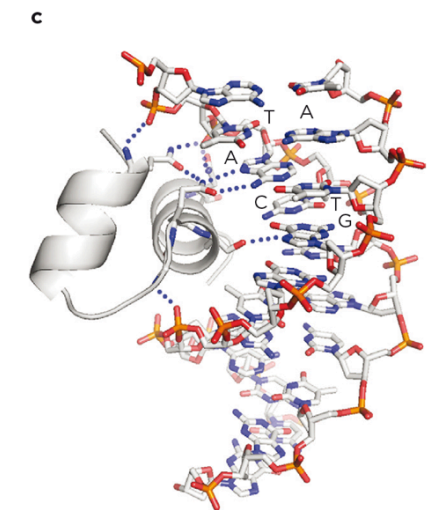
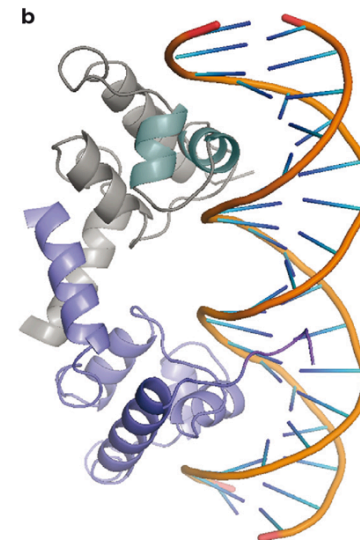
Le catene polipeptidiche si ripiegano in uno o più domini

Le proteine riconoscono siti molecolare specifici



a

OR1	5'	T	A	C	C	T	C	T	G	G	C	G	G	T	G	A	T	A	5'	
		A	T	G	G	A	G	A	C	C	G	C	C	A	C	T	A	T		
OR2		T	A	A	C	A	C	C	G	T	G	C	G	T	G	T	T	G		
		A	T	T	G	T	G	G	C	A	C	G	C	A	C	A	A	C		
OR3		T	A	T	C	A	C	C	G	C	A	A	G	G	G	T	A	A		
		A	T	A	G	T	G	G	C	G	T	T	C	C	C	T	A	T		
OL1		T	A	T	C	A	C	C	G	C	C	A	G	T	G	G	T	A		
		A	T	A	G	T	G	G	C	G	G	T	C	A	C	C	A	T		
OL2		C	A	A	C	A	C	C	G	G	C	A	G	A	G	A	T	A		
		G	T	T	G	T	G	G	C	C	G	T	C	T	C	T	A	T		
OL3		T	A	T	C	A	C	C	G	C	C	A	G	A	T	G	G	T	T	
		A	T	A	G	T	G	G	C	G	T	C	T	A	C	C	A	A		



Il riconoscimento del DNA da parte del Repressore del batterio lambda

Accettori e Donatori di un legame idrogeno liberi,
al interno del solco

Minore o maggiore interagiscono
conamminoacidi

→ DNA-Protein complex

→ RNA-Protein complex