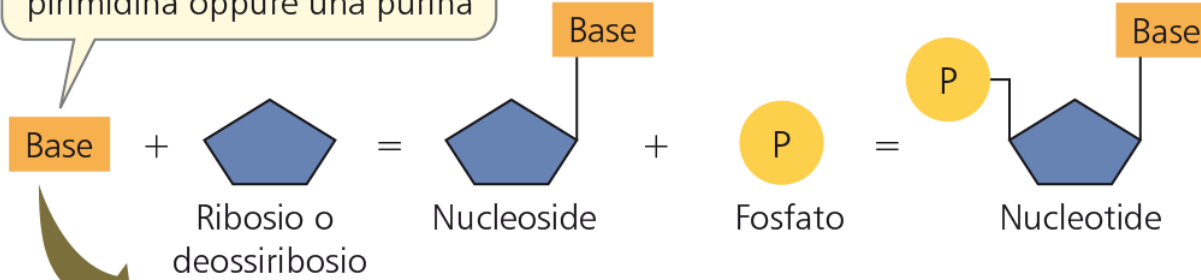


Lezione 7

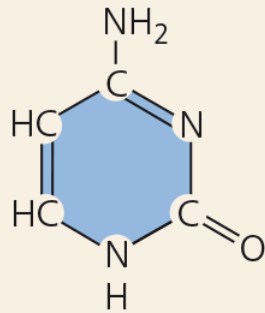
Struttura e replicazione del DNA

II DNA

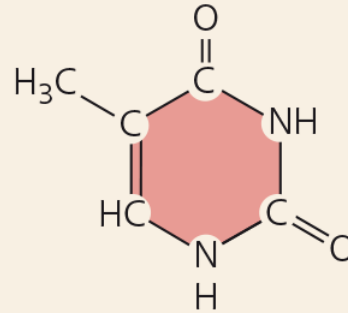
La base può essere una pirimidina oppure una purina



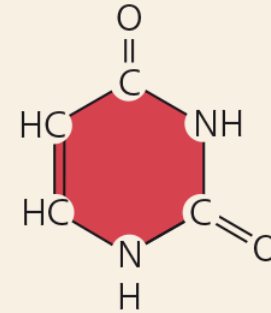
Pirimidine



Citosina (C)

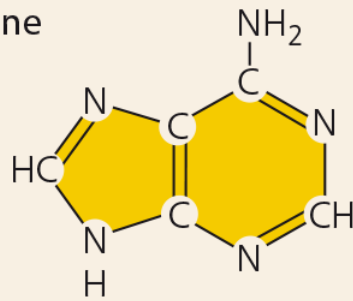


Timina (T)

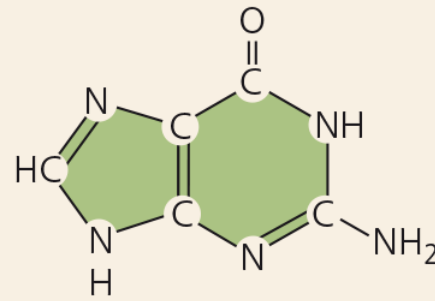


Uracile (U)

Purine

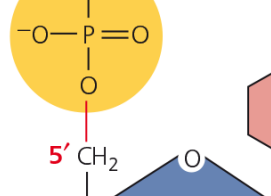
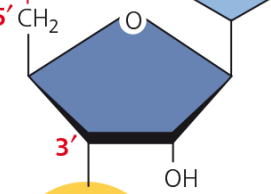
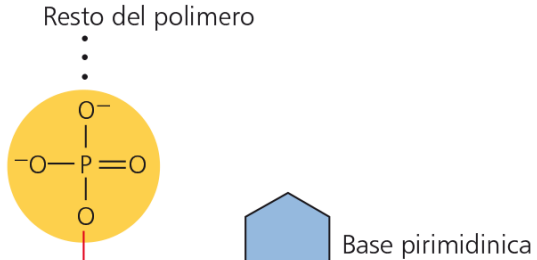


Adenina (A)



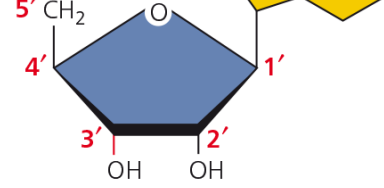
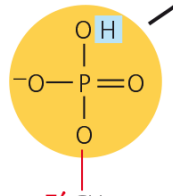
Guanina (G)

Estremità 5'
↓
Estremità 3'

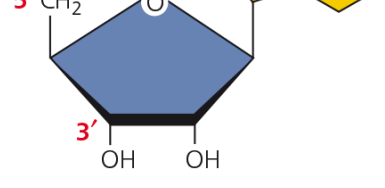
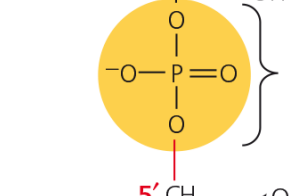
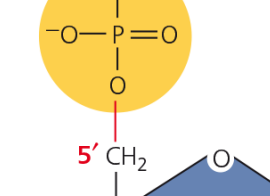
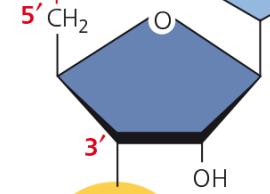
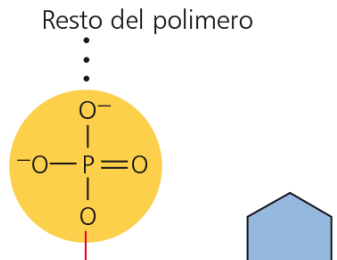


Base pirimidinica

Reazione di condensazione



Base purinica



La numerazione degli atomi di carbonio del ribosio è alla base dell'identificazione delle estremità 5' e 3' dei filamenti di DNA e di RNA.

Legame fosfodiester + H₂O

La formazione del legame tra nucleotidi si verifica sempre unendo l'estremità 5'-fosfato del nuovo nucleotide all'estremità 3'-OH dell'acido nucleico.

Nel DNA, A + G...



=



=



Purine

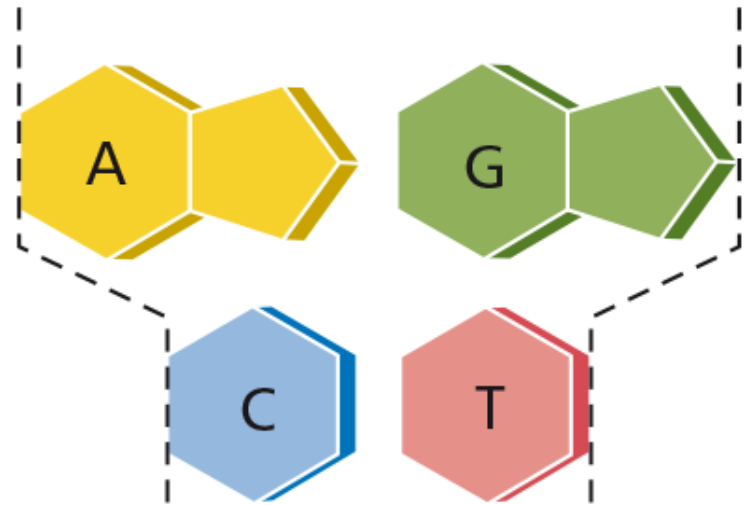
=

Pyrimidine

...è sempre uguale
a T + C.

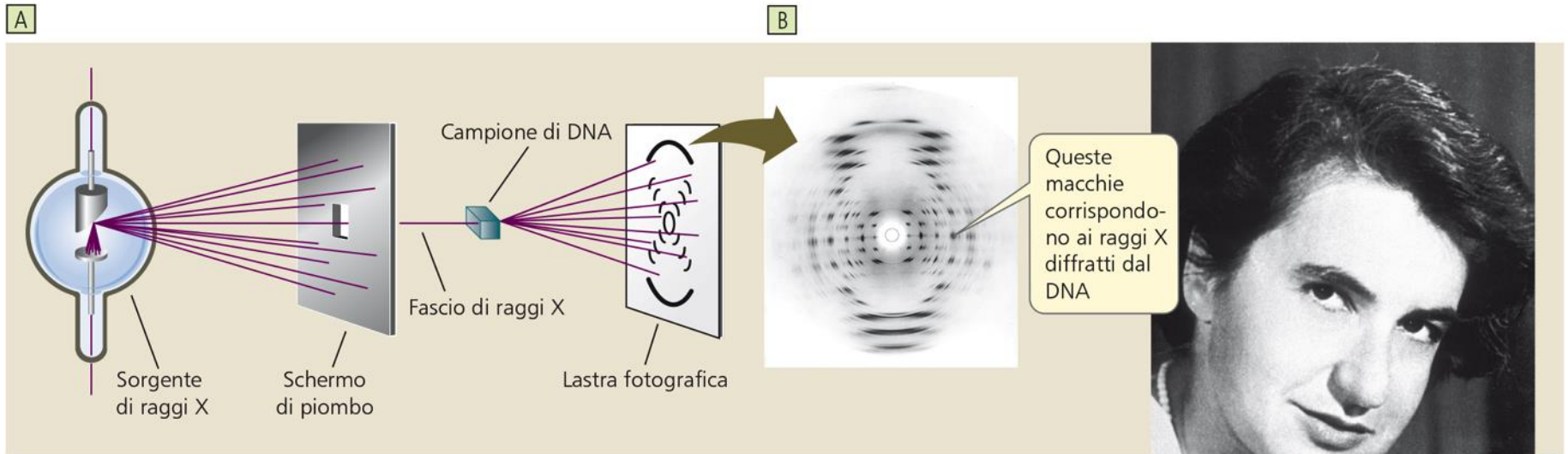


non



La struttura del DNA

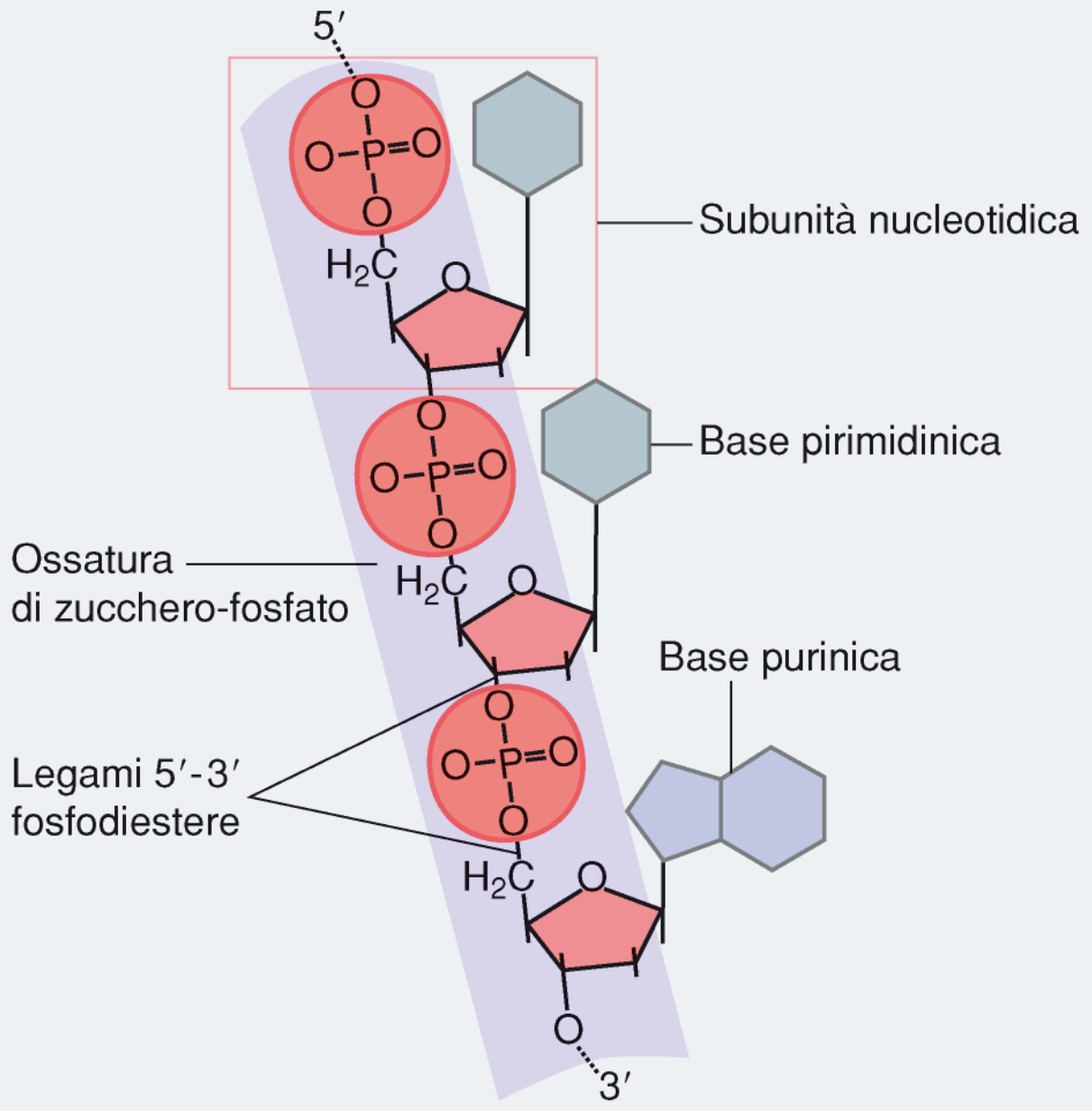
Studi di diffrazione a raggi X realizzate da **Rosalind Franklin**



«I dati di Rosalind Franklin, deceduta qualche anno fa, ci permisero di costruire modello migliore e ci aiutarono in modo imprescindibile a risalire alla struttura del DNA»

Francis Crick

premio Nobel per la scoperta della struttura del DNA

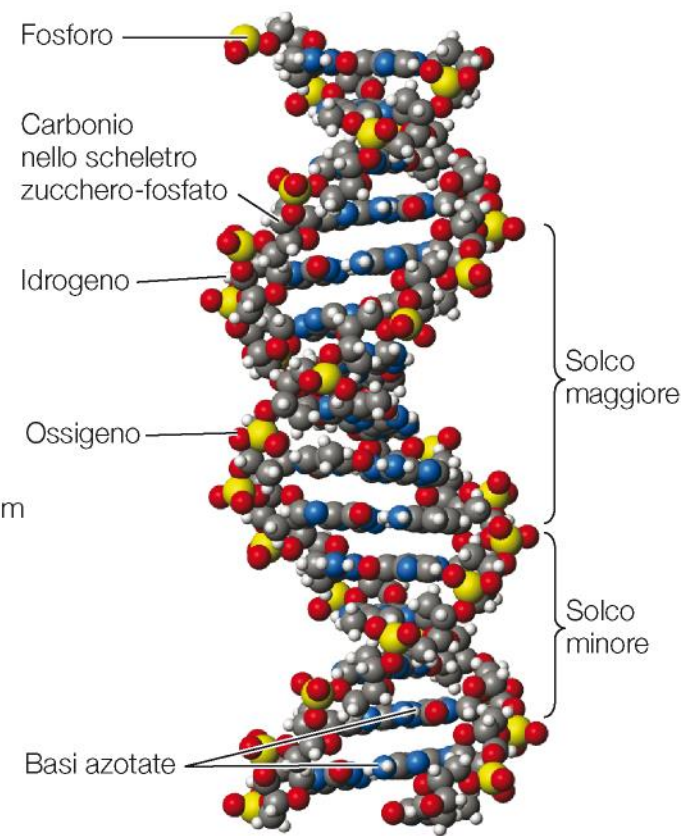
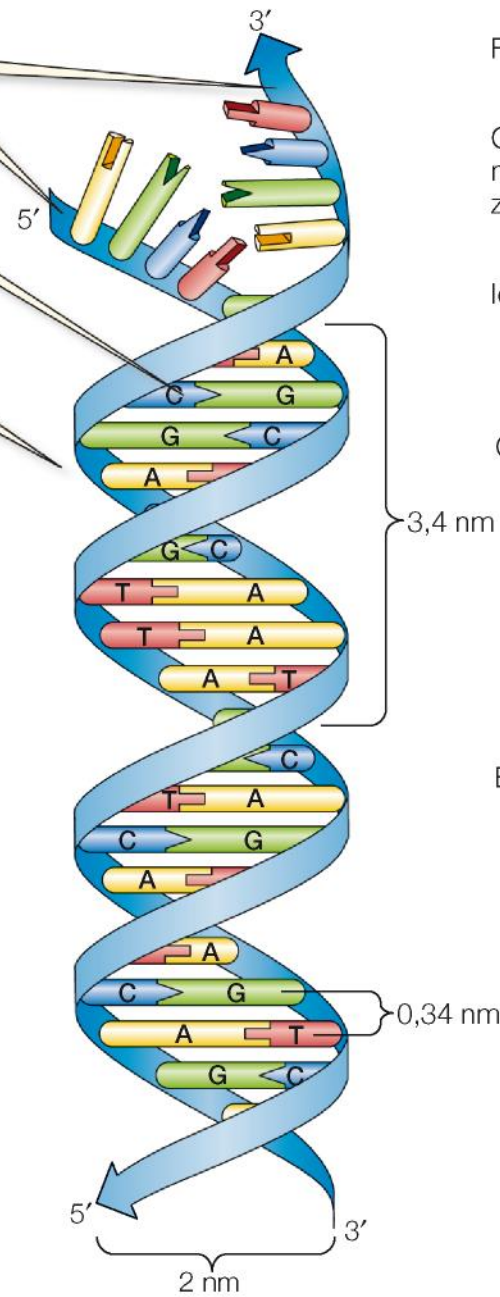


(b)

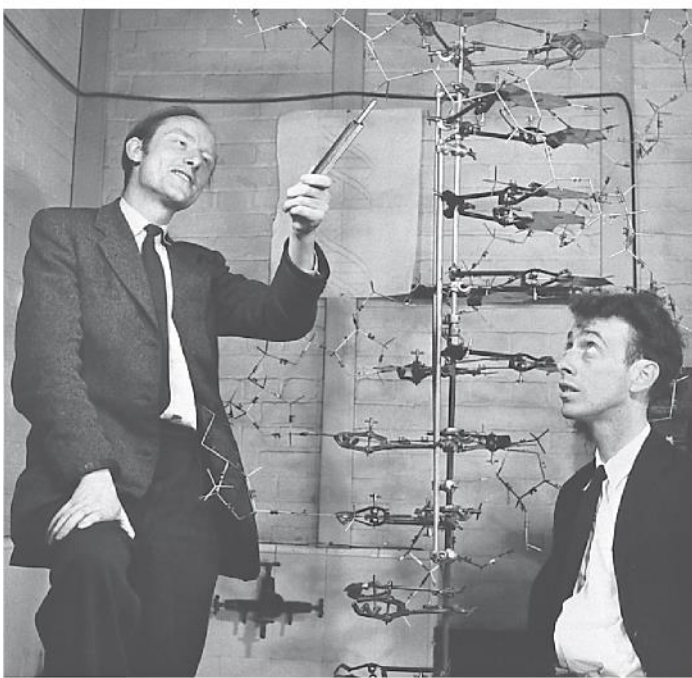
Le bande celesti rappresentano le due catene zucchero-fosfato.

Le coppie di basi formano collegamenti orizzontali tra le catene.

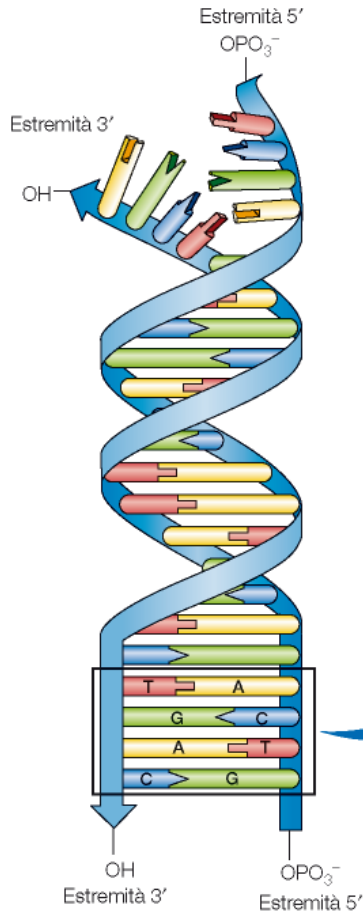
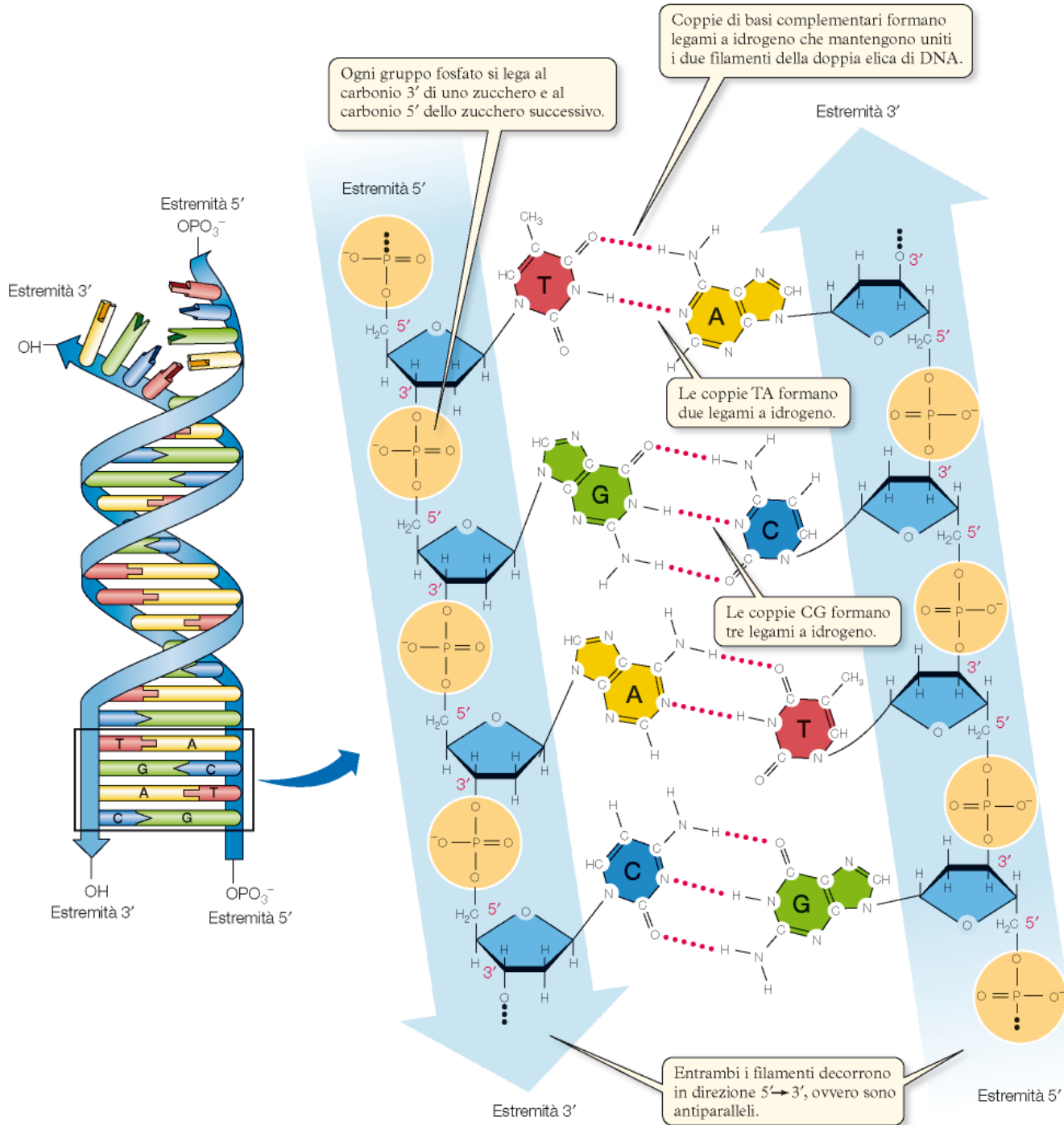
Le due catene decorrono in direzione opposta:
5' ↓ ↑ 3'
3' ↓ ↑ 5'



(a)



James Watson e Francis Crick



Ogni gruppo fosfato si lega al carbonio 3' di uno zucchero e al carbonio 5' dello zucchero successivo.

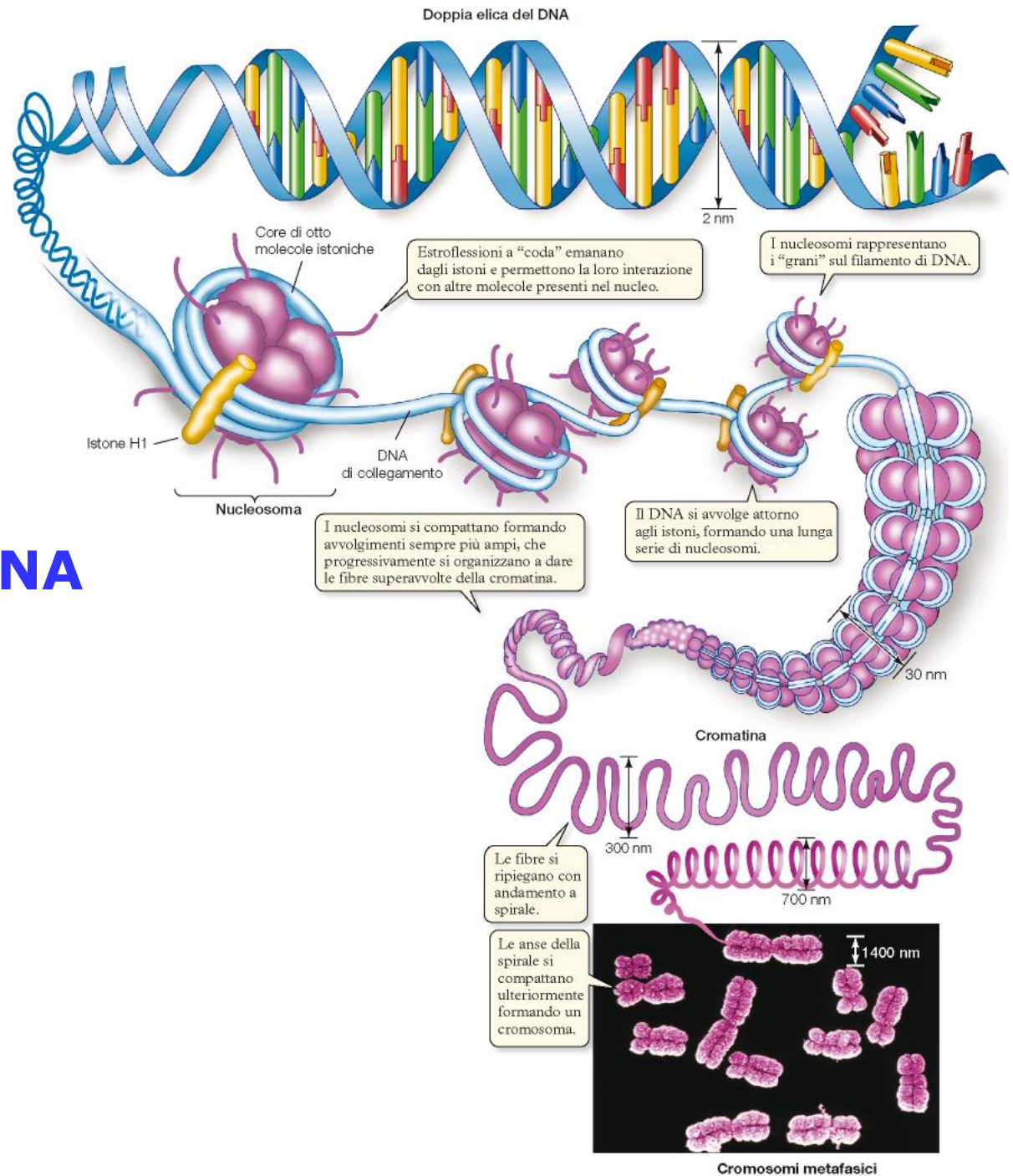
Copie di basi complementari formano legami a idrogeno che mantengono uniti i due filamenti della doppia elica di DNA.

Le coppie TA formano due legami a idrogeno.

Le coppie CG formano tre legami a idrogeno.

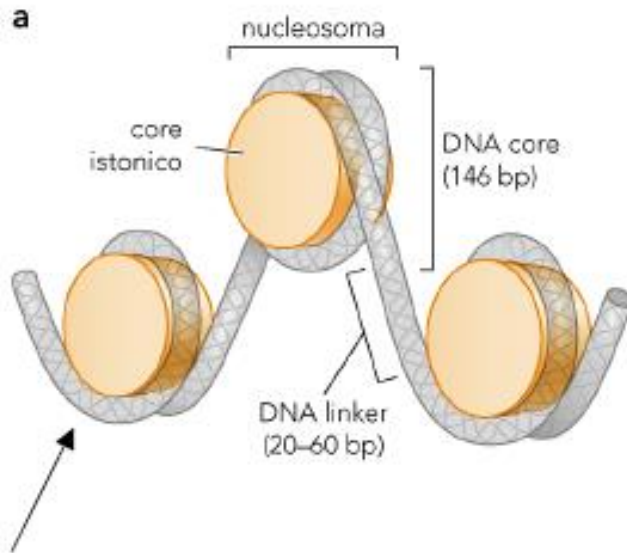
Entrambi i filamenti decorrono in direzione 5' → 3', ovvero sono antiparalleli.

Struttura del DNA

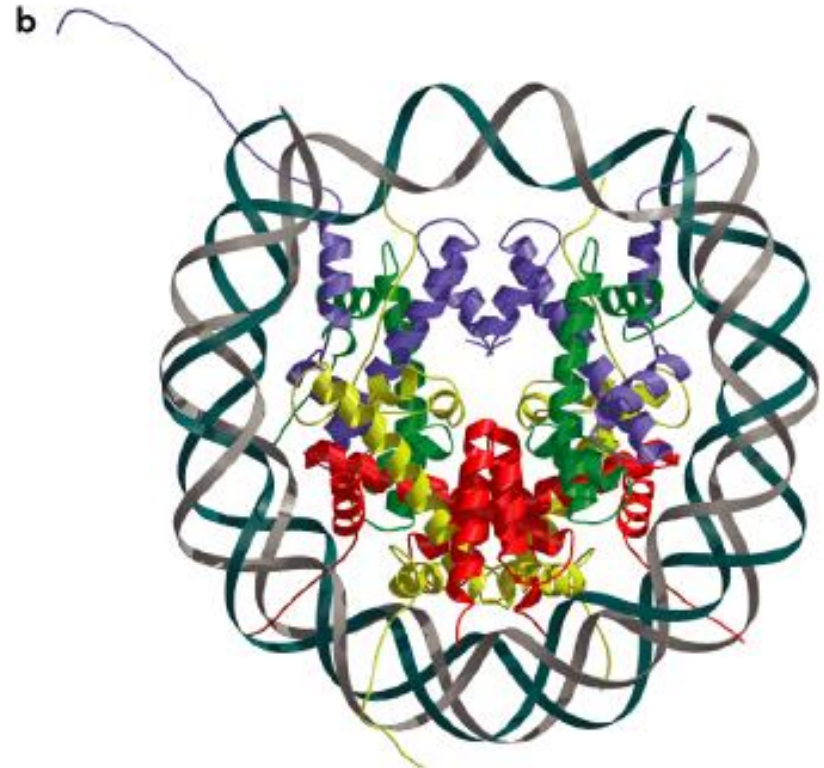
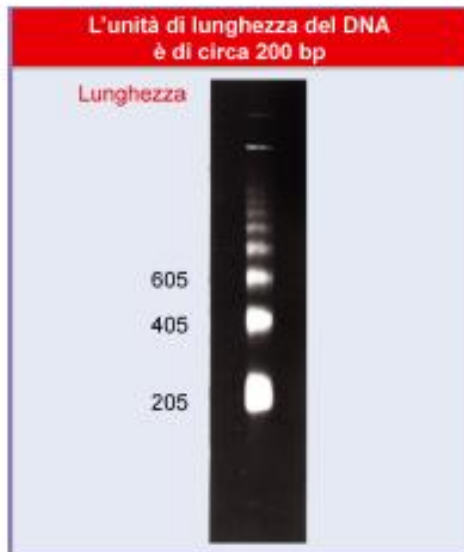


I NUCLEOSOMI

Sono la componente fondamentale dei cromosomi

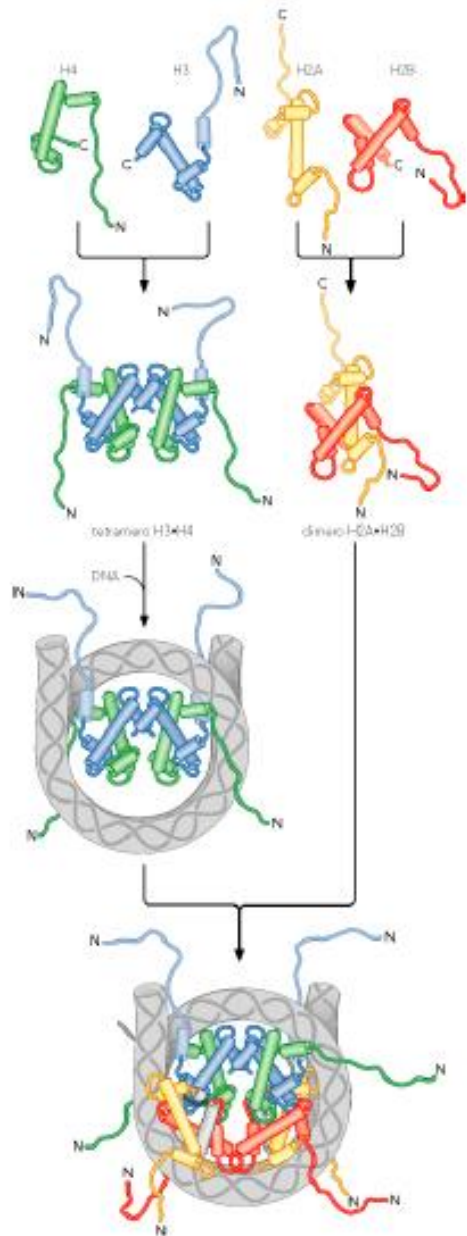


Avvolgimento di 1.65 volte

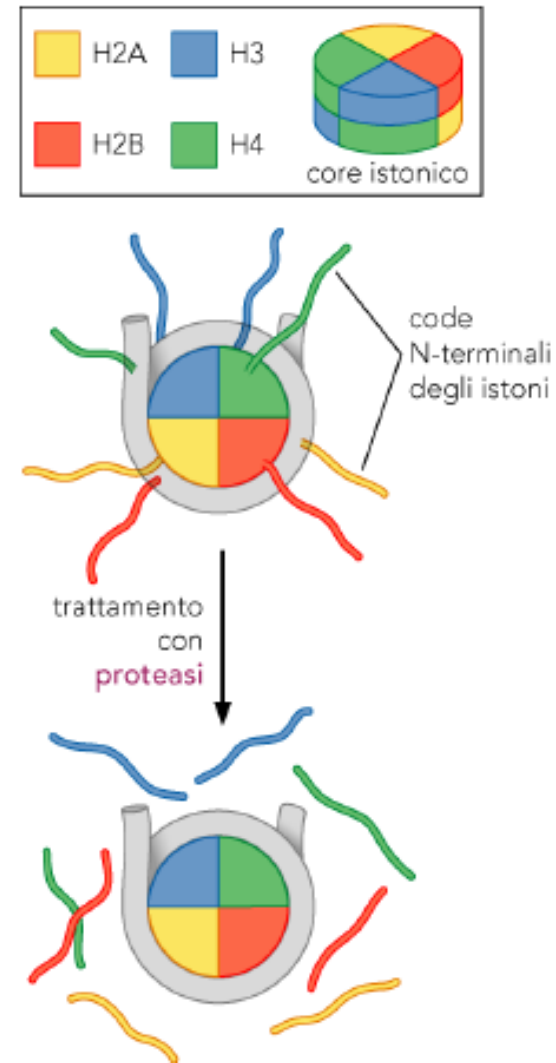


8 proteine istoniche (2x4): H2A (rosso), H2B (giallo), H3 (blu), H4 (verde)

Assemblaggio del nucleosoma



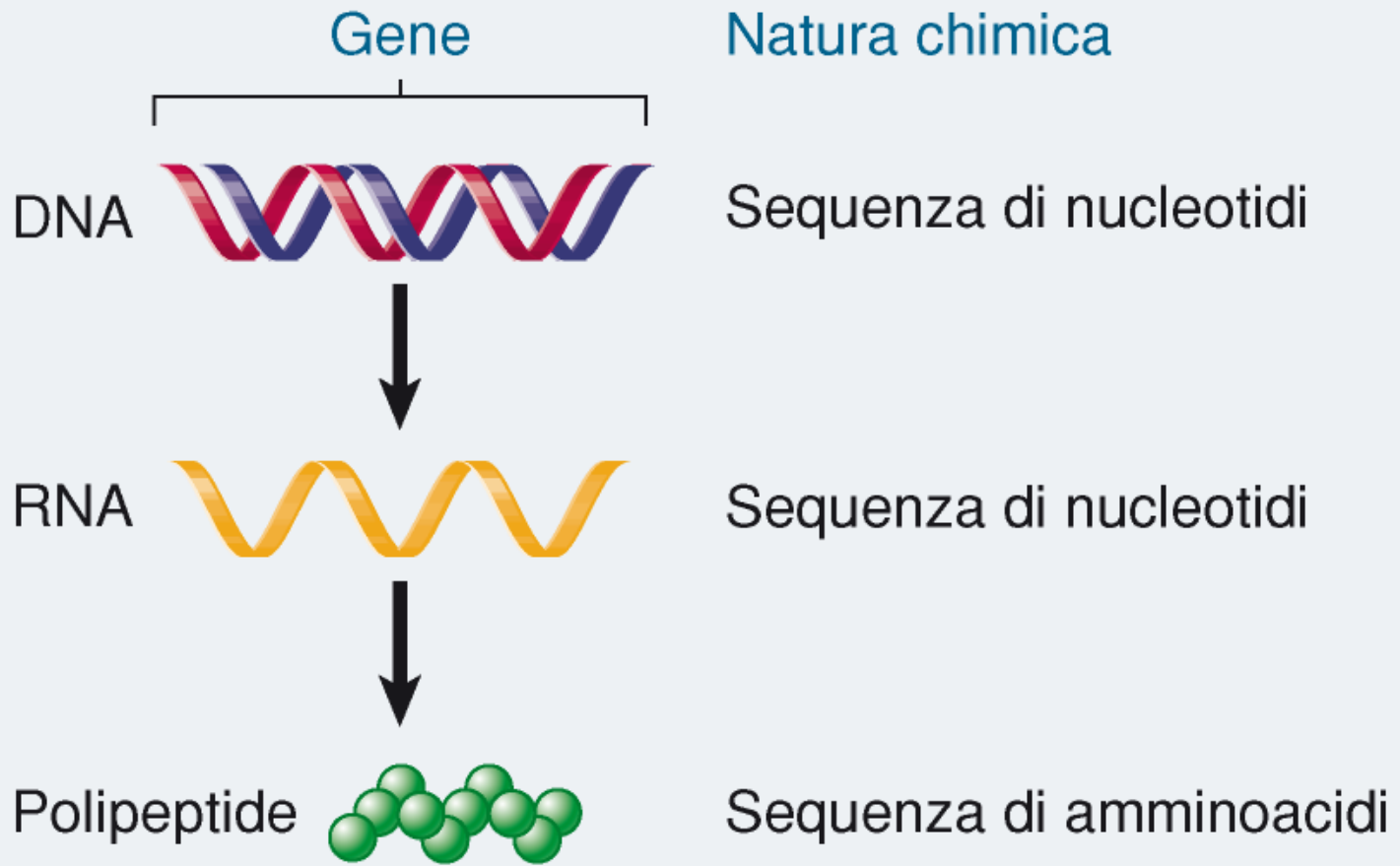
L'assemblaggio del nucleosoma consiste nella associazione ordinata dei complessi proteici istonici con il DNA.



Il trasferimento delle informazioni genetiche dal DNA all'RNA e alle proteine

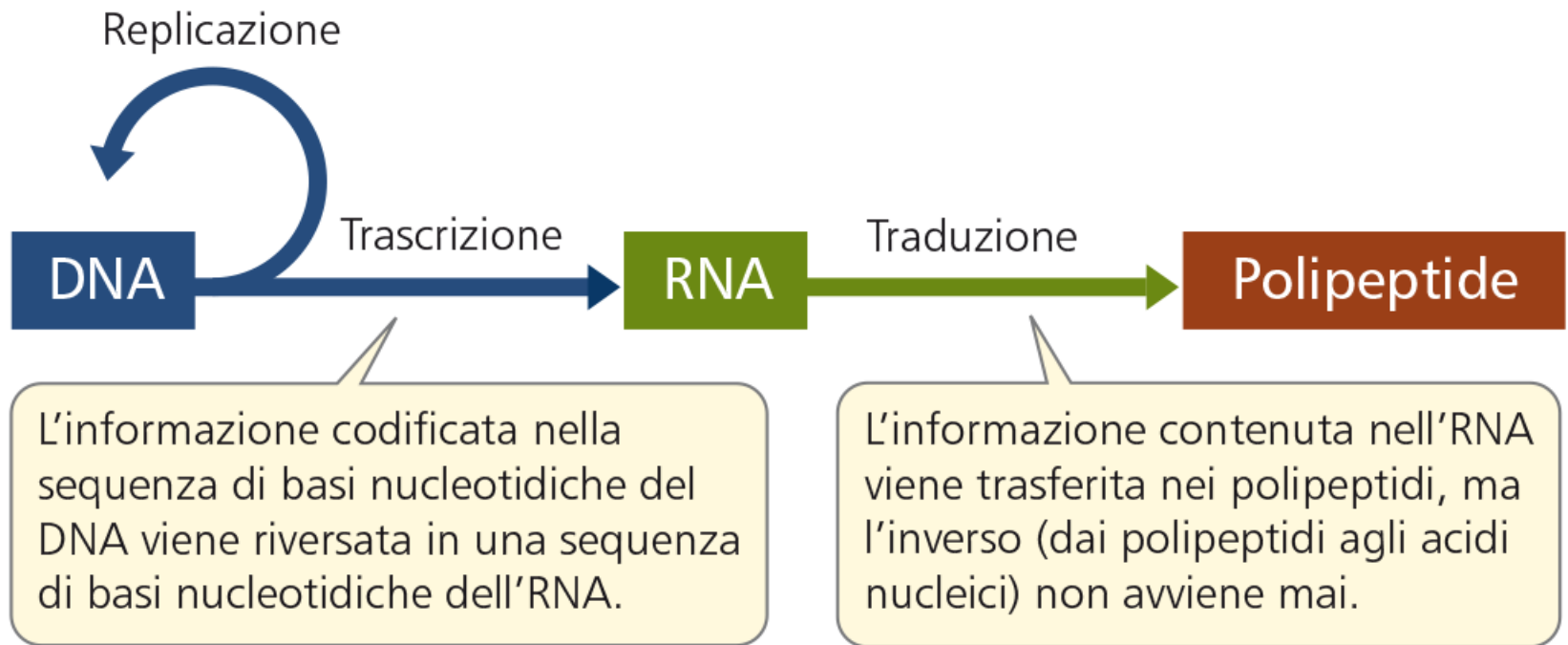
Il genotipo presente a livello di DNA si esprime nelle **proteine**, che determinano il **fenotipo**

- Il **genotipo** di un organismo è l'informazione ereditaria contenuta nel suo DNA (nella sequenza delle sue basi).
- Le proteine sono sintetizzate sulla base di informazioni contenute in sequenze di DNA dette **geni**.
- Un particolare **gene**, una sequenza lineare di molti nucleotidi, codifica per uno o più polipeptidi (fornisce cioè le istruzioni per la sintesi proteica).



DOGMA CENTRALE

della BIOLOGIA MOLECOLARE



LA REPLICAZIONE DEL DNA

Nel processo sono prodotte 2 eliche di DNA da una iniziale

FASE S

del ciclo cellulare

Replicazione

A

DNA



Durante la replicazione si producono due copie complete della molecola di DNA.



DNA



+

DNA

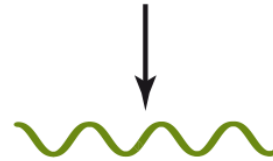


B

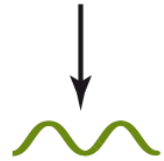
DNA



RNA per la
proteina 1



RNA per la
proteina 2



Le sequenze di DNA che codificano proteine specifiche vengono trascritte in RNA.

Trascrizione

LA REPLICAZIONE del DNA



La capacità di una cellula di sopravvivere e proliferare dipende dalla corretta duplicazione del suo materiale genetico, processo chiamato

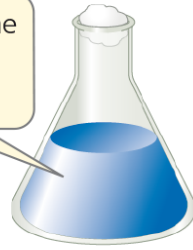
«**replicazione del DNA**»

Il cambiamento permanente del DNA dovuto ad errori di copiatura o danni accidentali è chiamato «**mutazione**» ed è alla base del processo di evoluzione

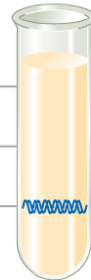


Esperimento di Meselson e Stahl, 1958

Si allestiscono colture batteriche in un terreno contenente ^{15}N (azoto pesante).



Campione a 0 minuti



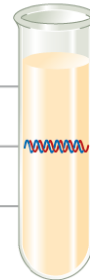
Parentale (tutto pesante)

- $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$ DNA (leggero)
- $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ DNA (intermedio)
- $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ DNA (pesante)

Si trasferiscono alcuni batteri in un terreno contenente ^{14}N (leggero); la crescita batterica continua.

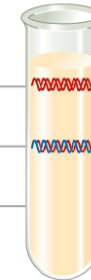


Campione dopo 20 minuti



Prima generazione (tutto intermedio)

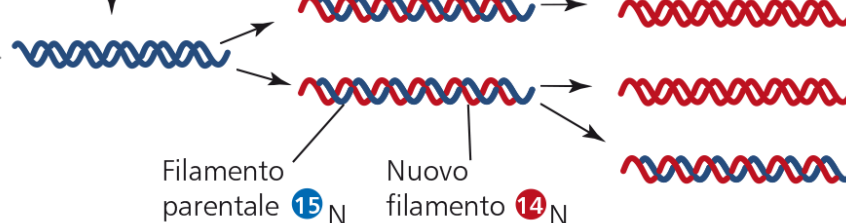
Campione dopo 40 minuti



Seconda generazione (metà intermedio, metà leggero)

Si raccolgono campioni dopo 0 minuti, 20 minuti (dopo un ciclo di replicazione) e 40 minuti (dopo due cicli di replicazione)

Prima che i batteri si riproducano per la prima volta nel substrato leggero (a 0 minuti), tutto il DNA (parentale) è pesante.

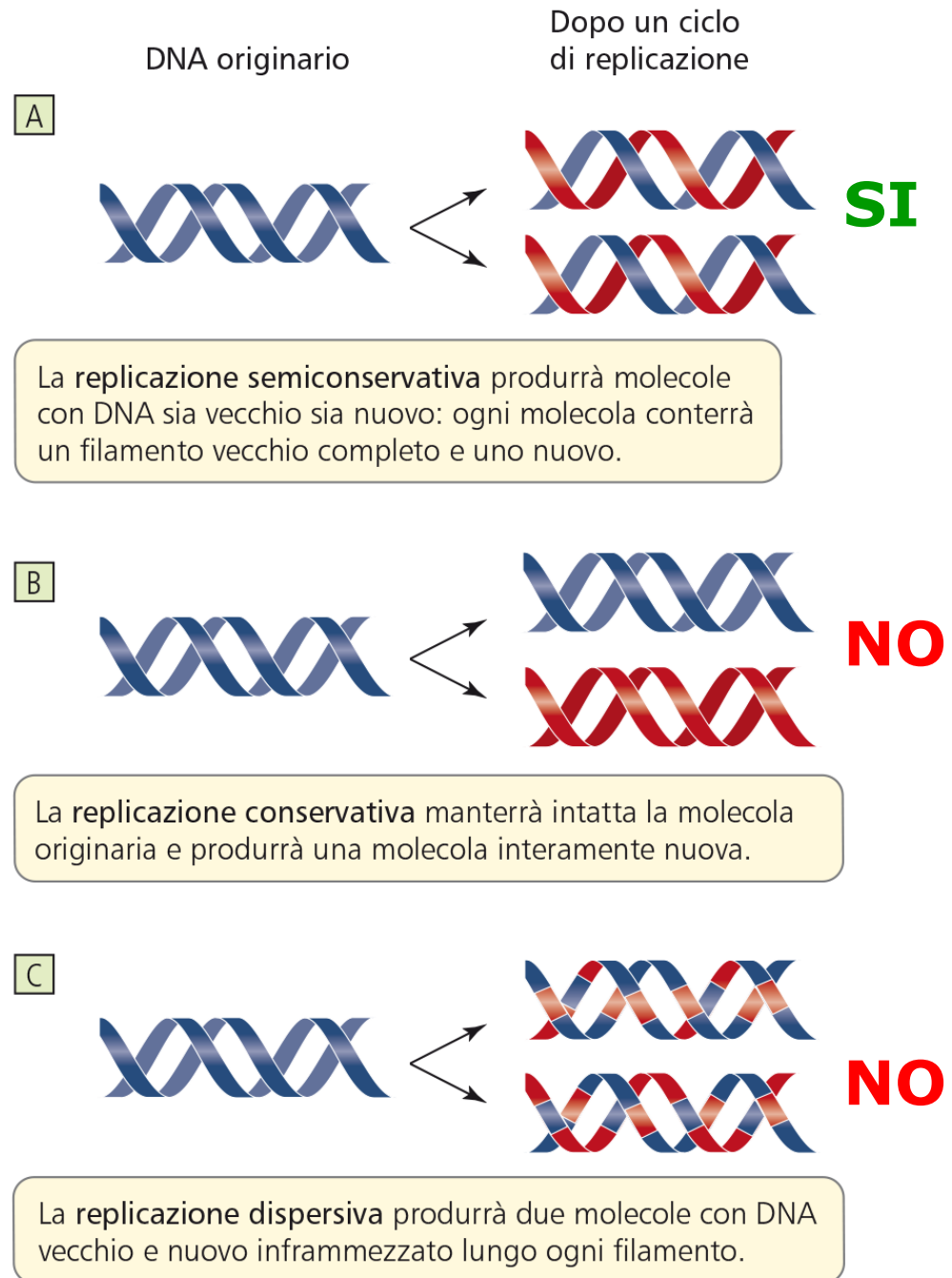


Dopo due generazioni, metà del DNA è intermedio e metà leggero; non è più presente DNA pesante.

LA REPLICAZIONE DEL DNA

La scoperta della natura complementare dei due filamenti di DNA chiari immediatamente le modalità del **PROCESSO SEMICONSERVATIVO** di replicazione

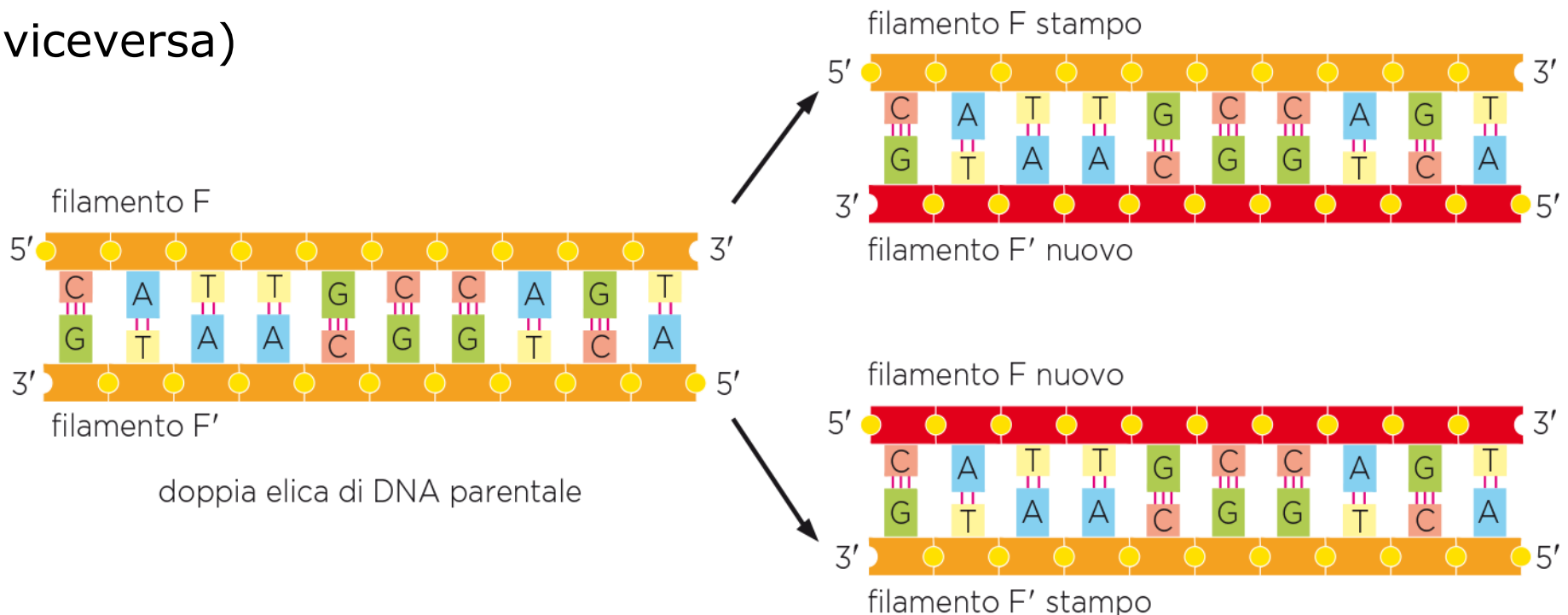
IPOTESI



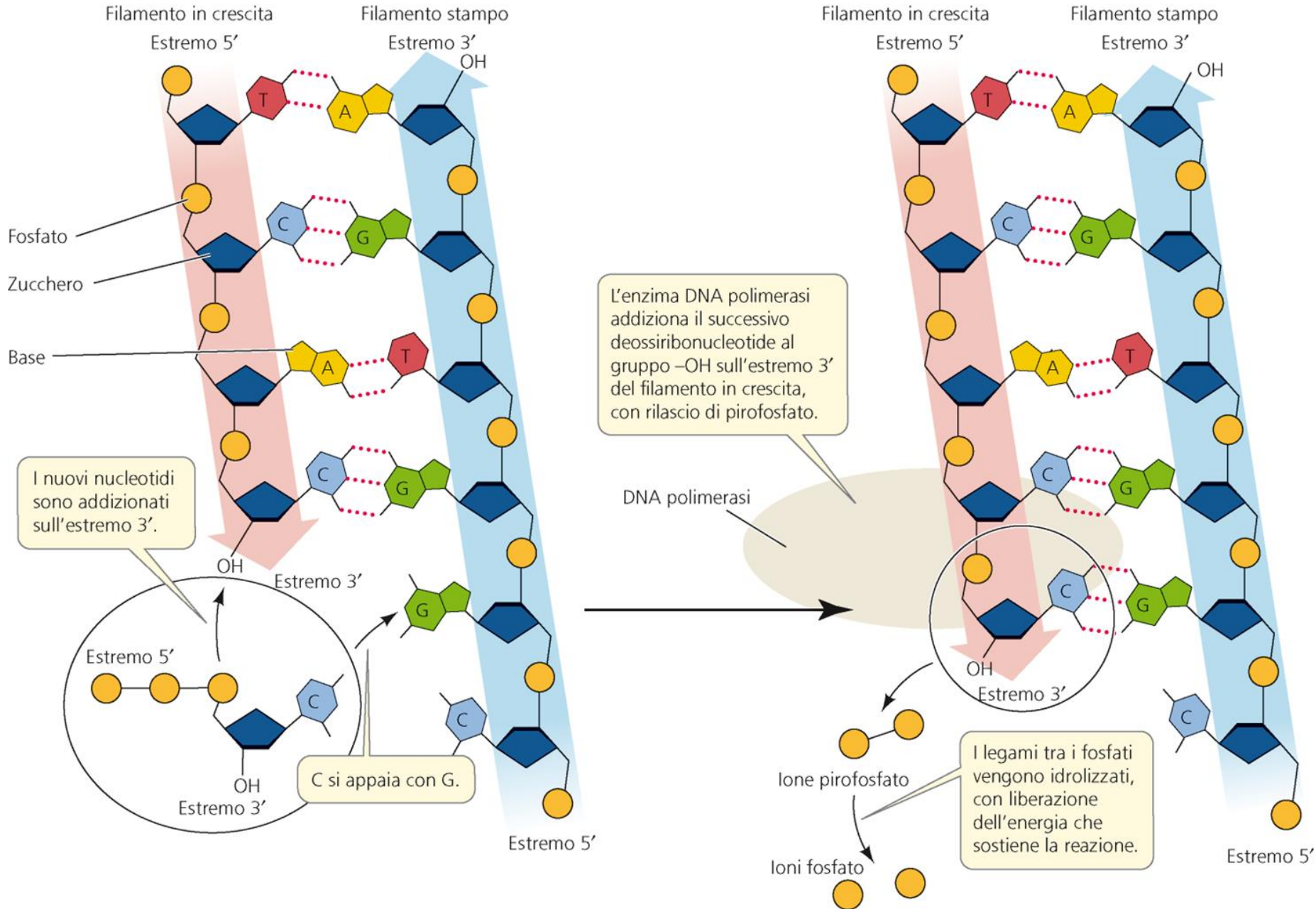
LA REPLICAZIONE DEL DNA

Ciascun filamento della doppia elica di DNA fa da «**stampo**» per la sintesi di un nuovo filamento di DNA. 5' e 3' indicano l'orientamento di ciascun filamento che risultano tra loro «**antiparalleli**».

Sono inoltre «**complementari**» dato che a ciascuna A corrisponderà una T e a ciascuna G corrisponderà una C (e viceversa)

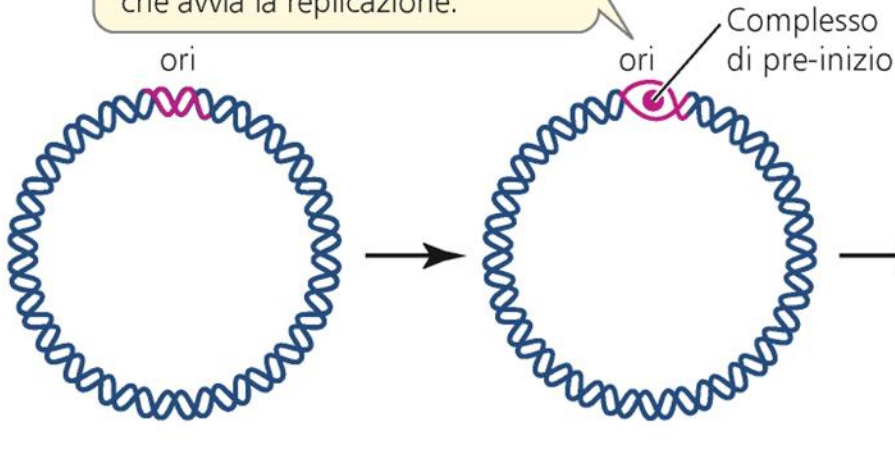


SINTESI del DNA in DIREZIONE 5' ► 3'



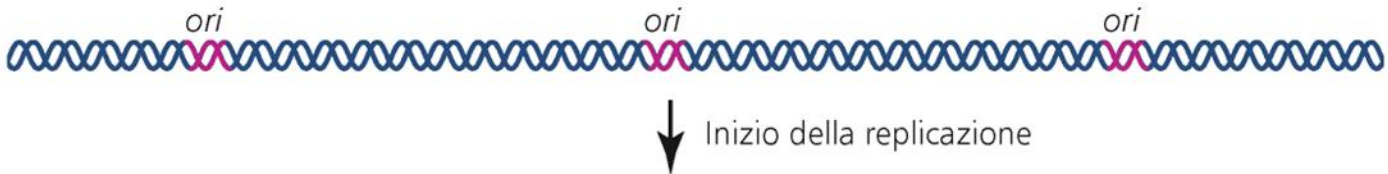
A Cromosomi procariotici

1 La sequenza *ori* lega il complesso che avvia la replicazione.

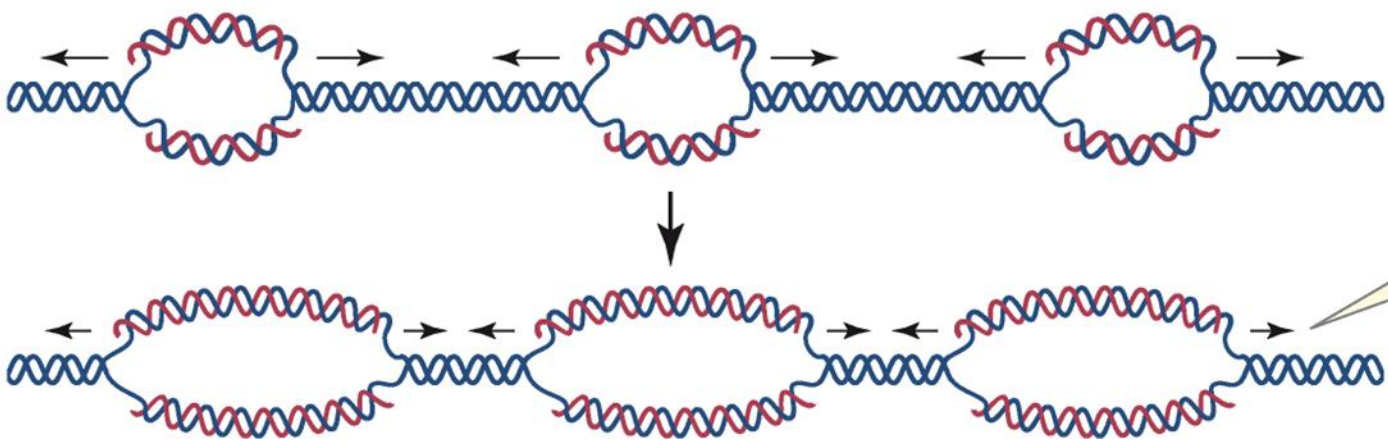


2 Due forcelle di replicazione avanzano in direzioni opposte, allontanandosi l'una dall'altra.

B Cromosomi eucariotici

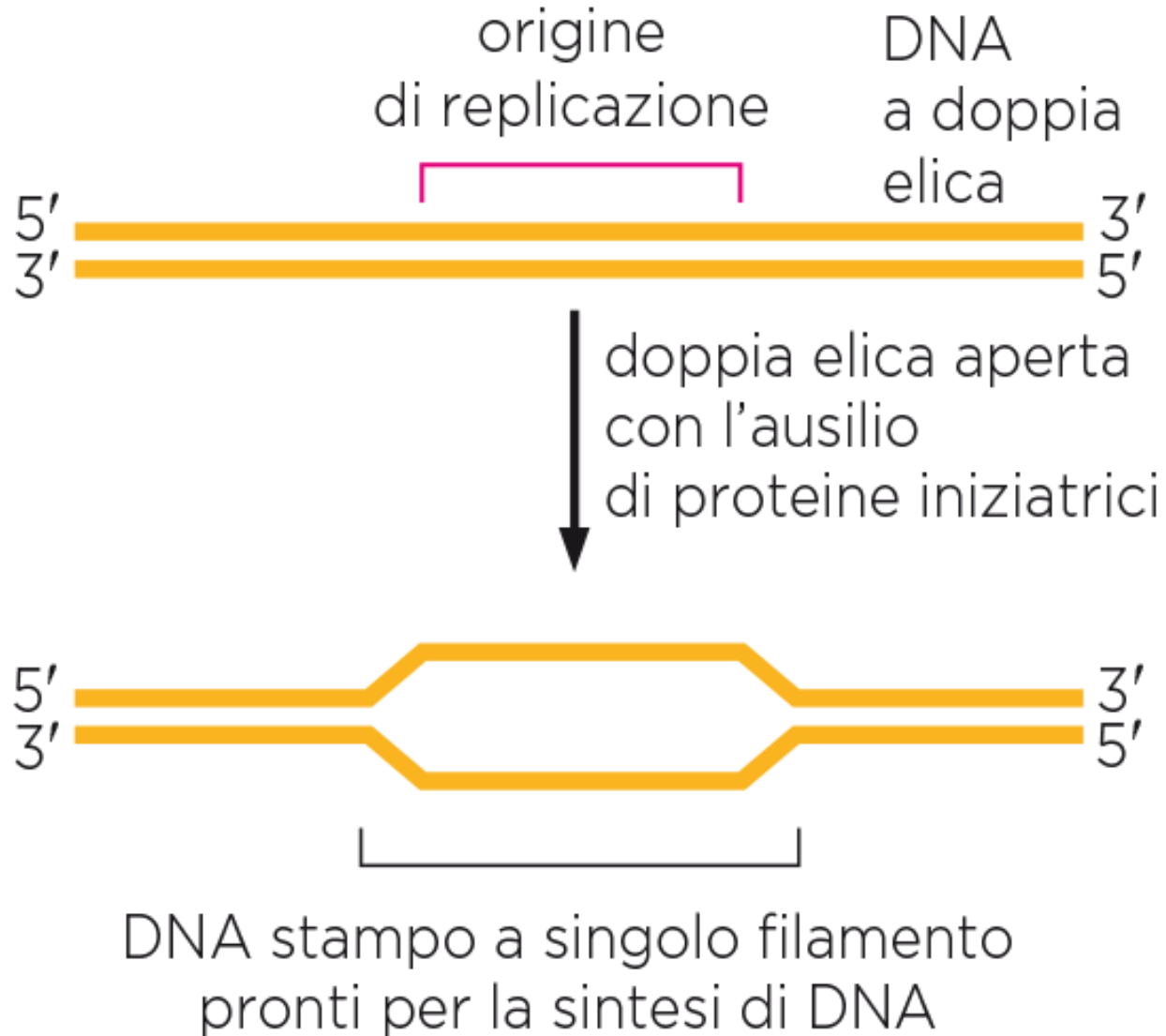


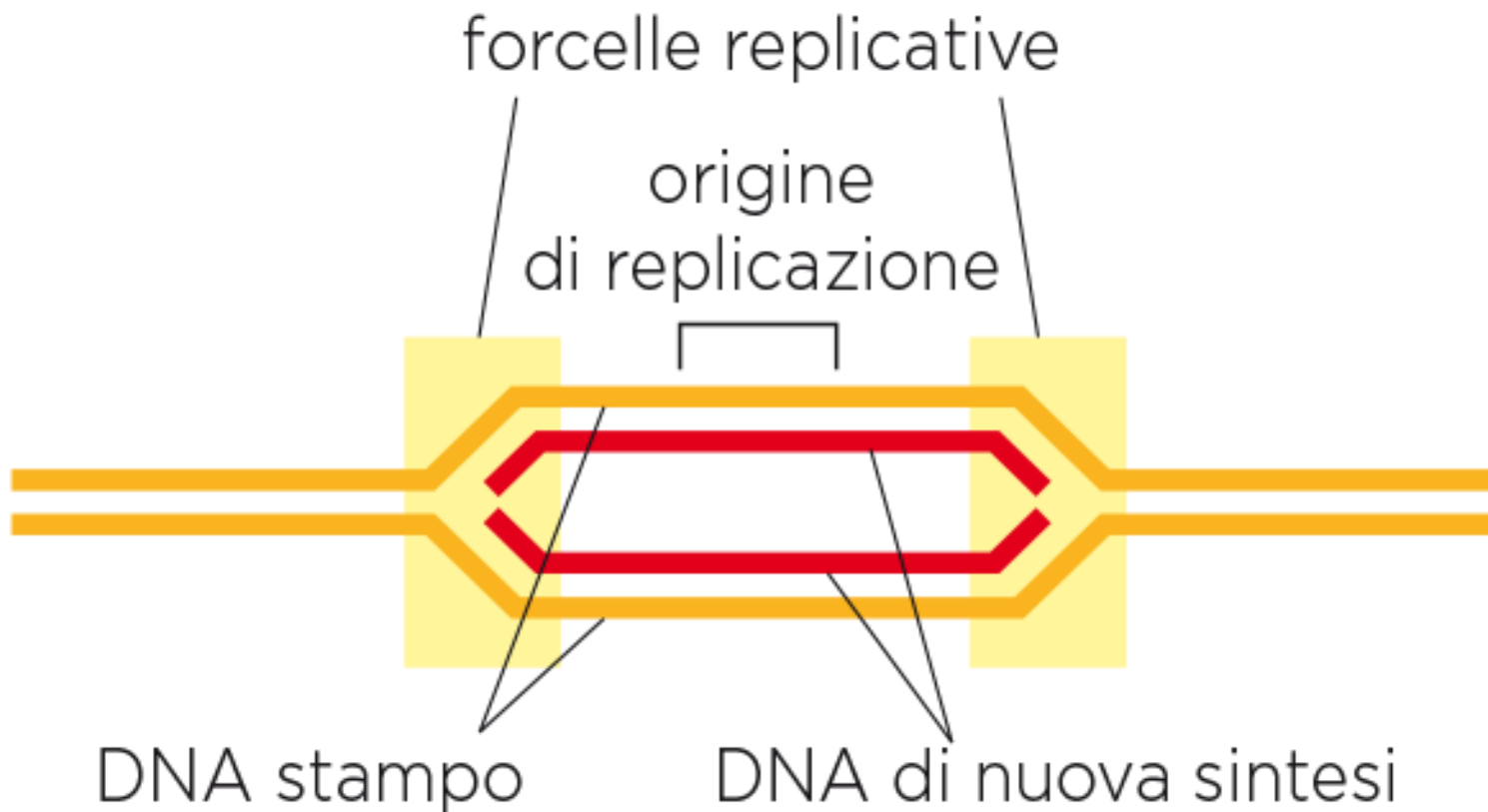
Contengono origini di replicazione multiple.

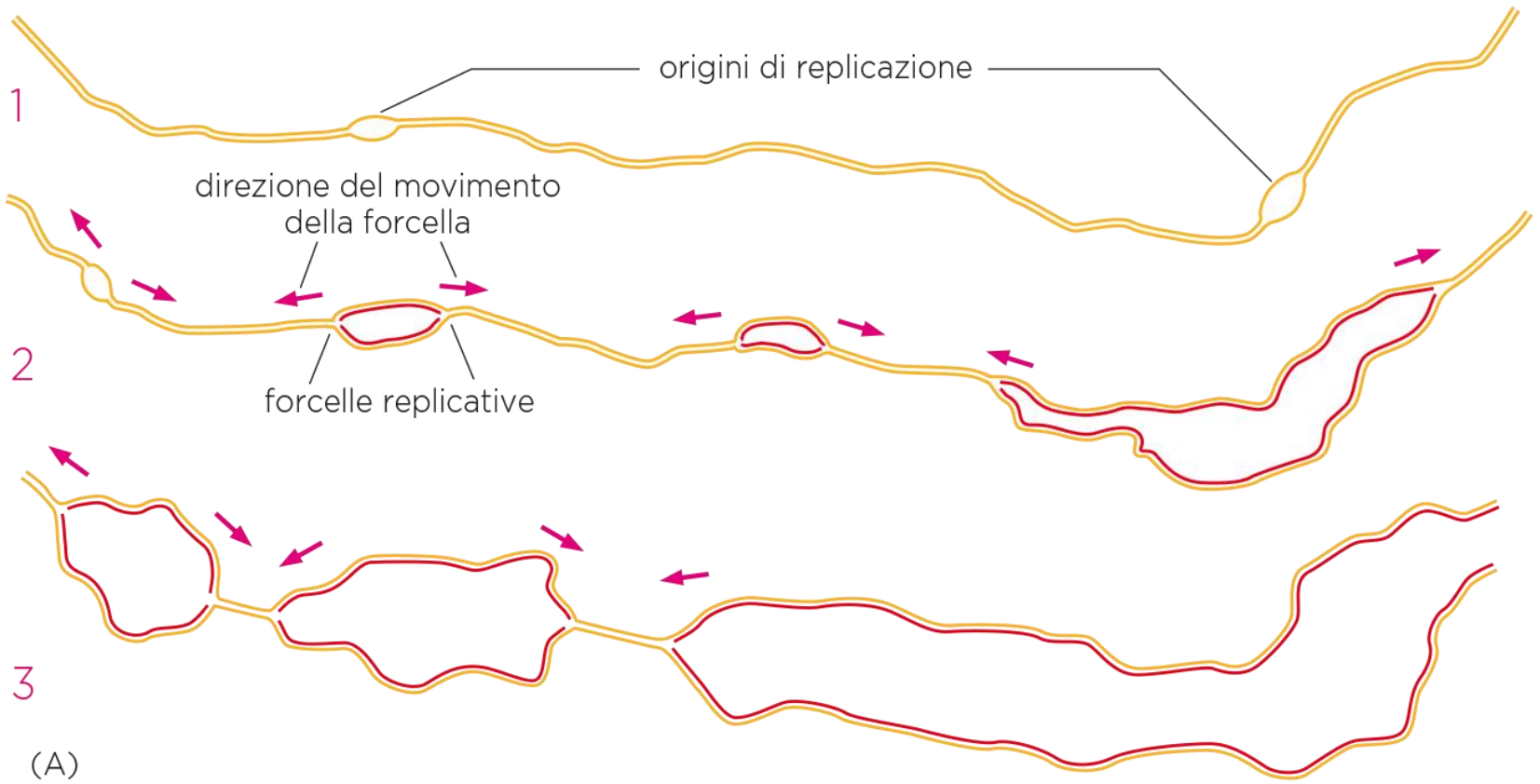


Le forcelle si muovono in direzioni opposte

REPLICAZIONE EUCARIOTICA



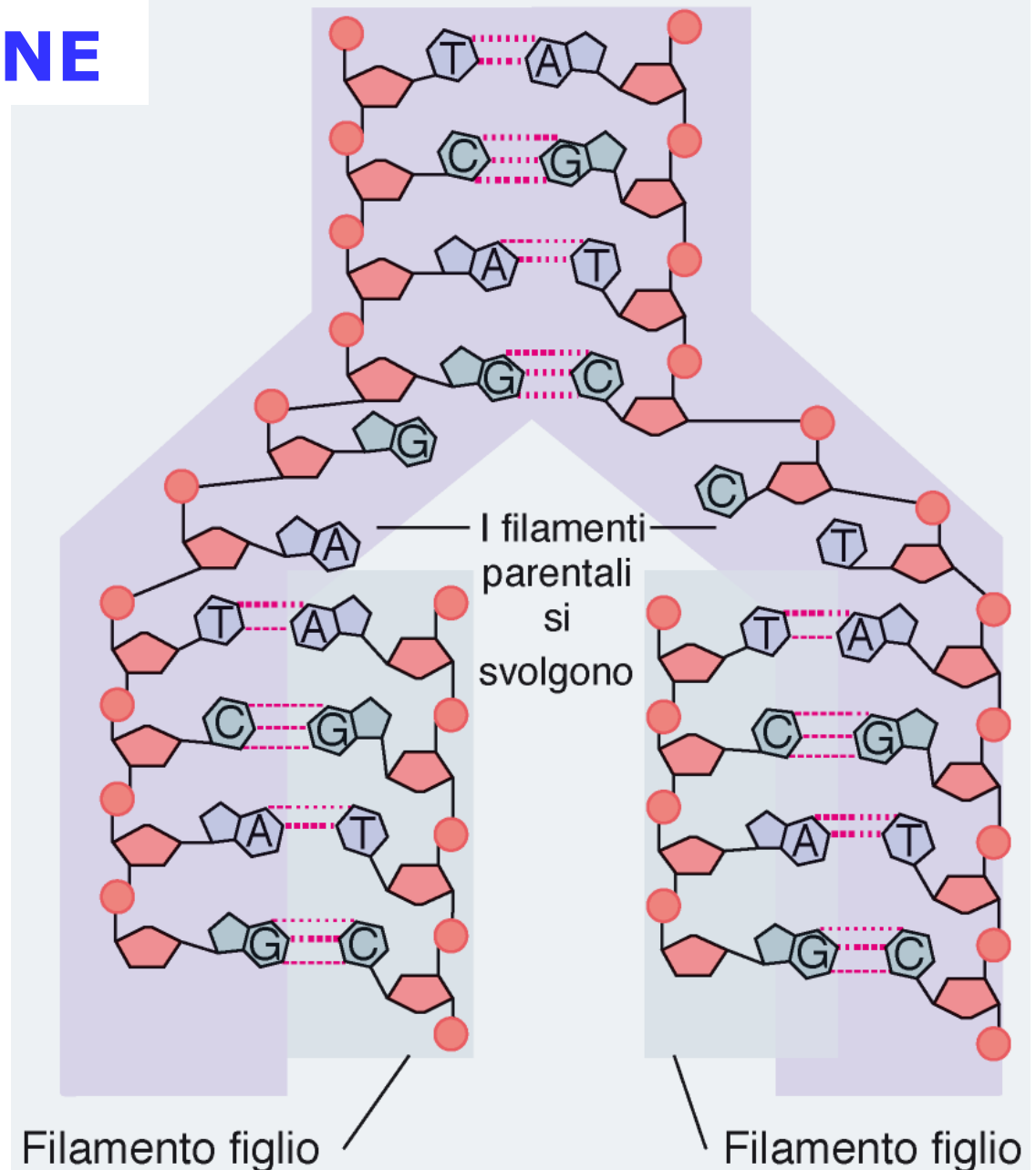




0,1 μm

DENATURAZIONE

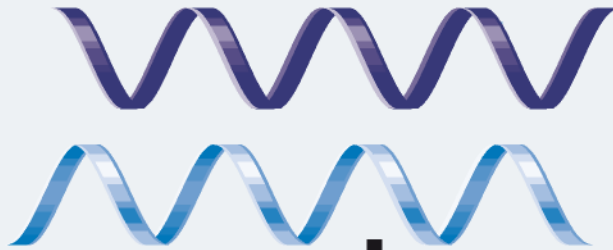
I due filamenti di DNA vengono replicati contemporaneamente. L'inizio della replicazione richiede la **separazione dei due filamenti** in modo da esporre i due filamenti stampo.





DNA a doppio
filamento

Denaturazione



DNA a singolo
filamento

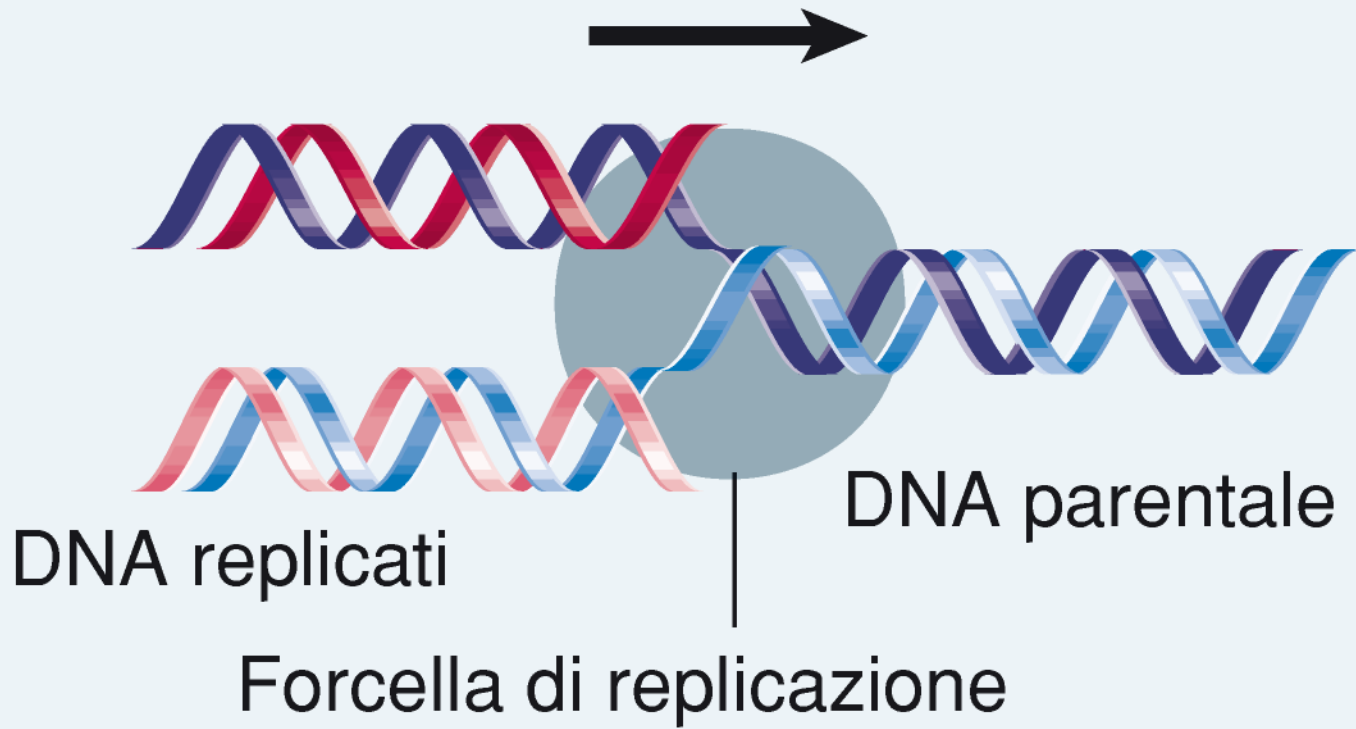


Rinaturazione

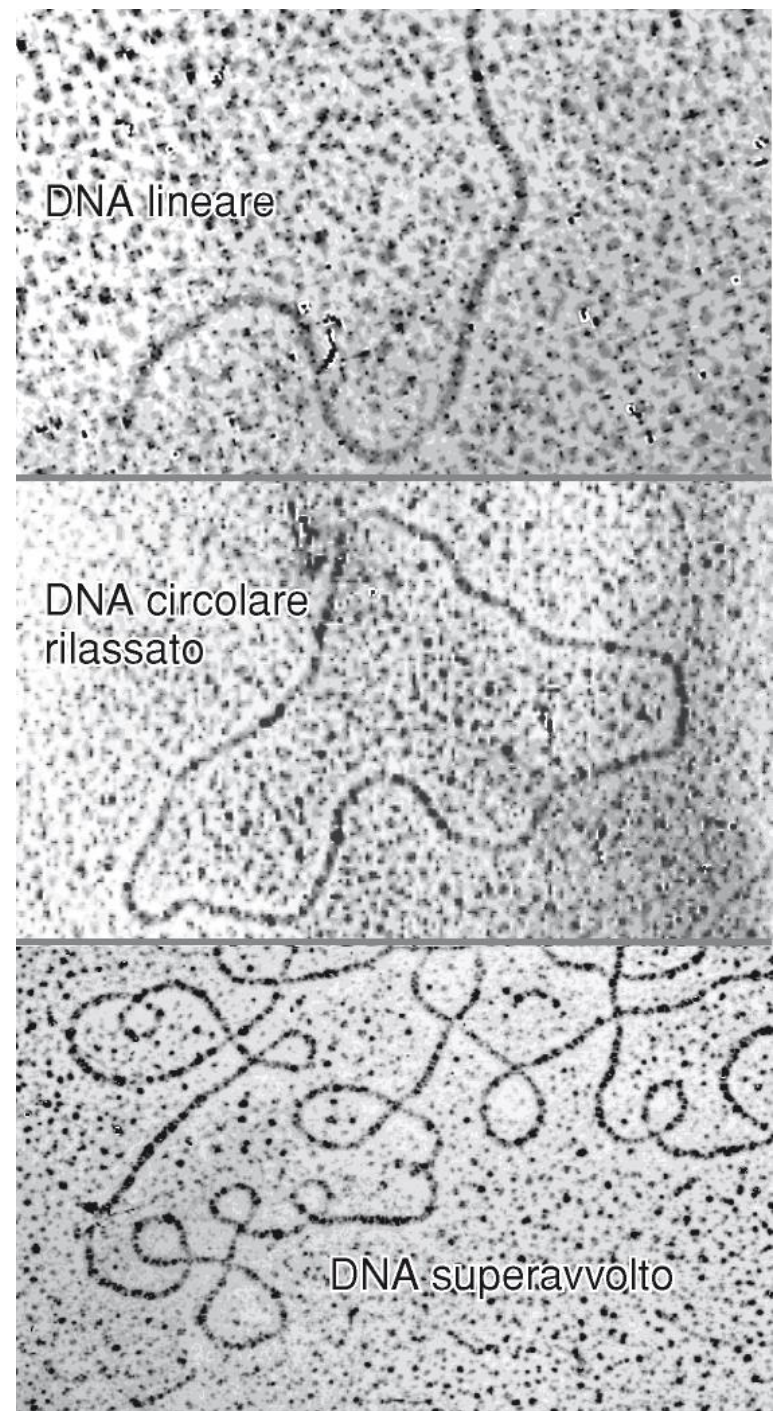


DNA
rinaturato

FORCA di REPLICAZIONE



**PROBLEMI
TOPOLOGICI DELLA
REPLICAZIONE DEL
DNA**



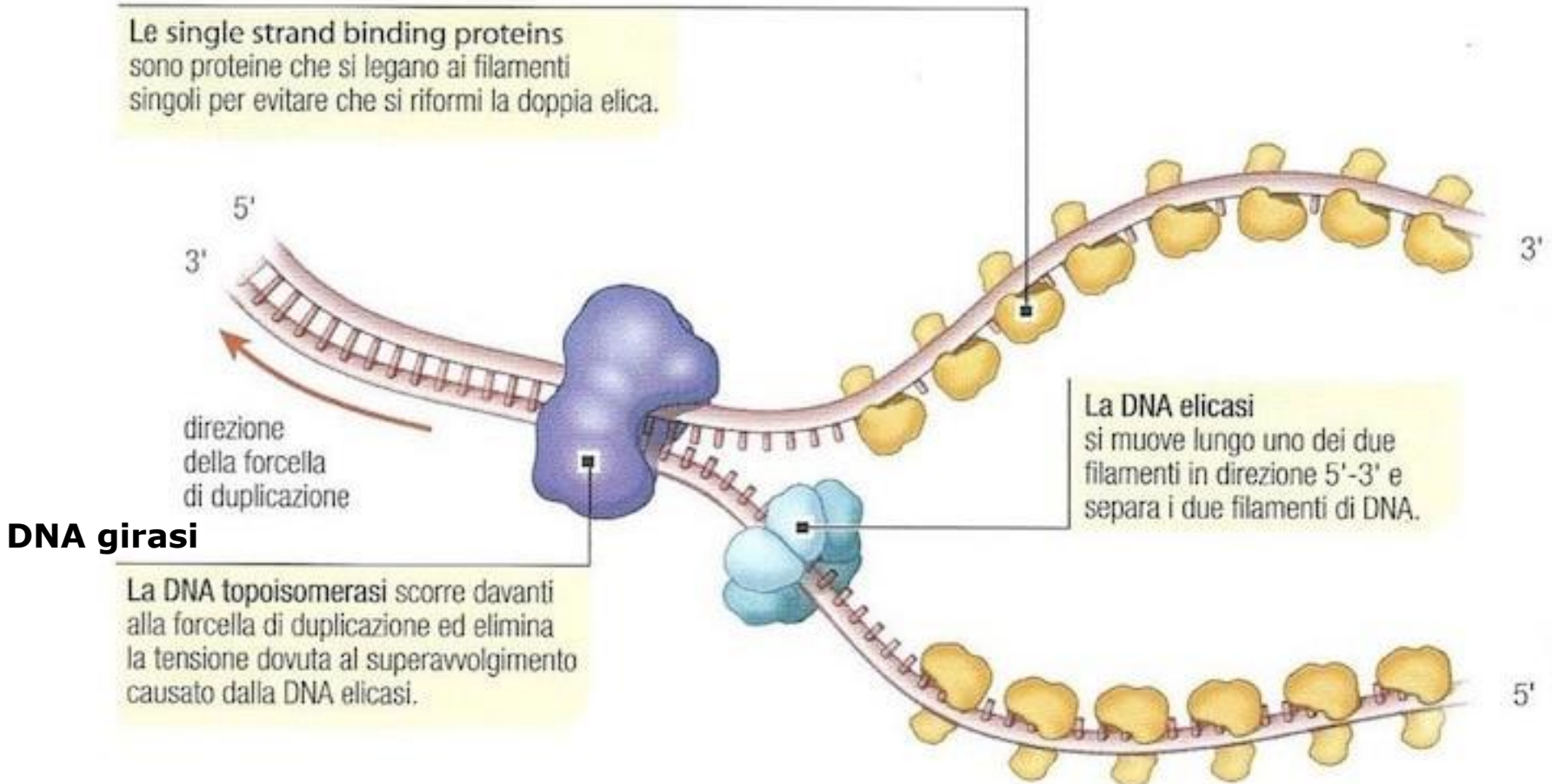
Problemi topologici della replicazione del DNA

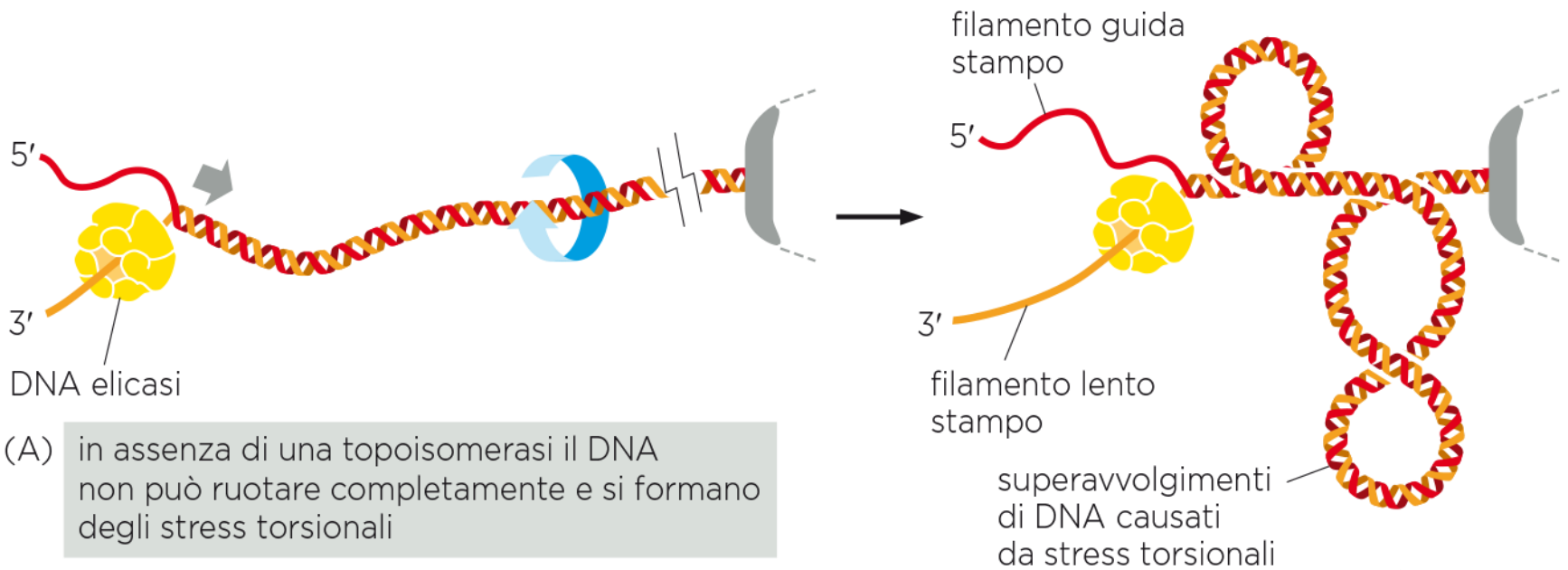
La progressione della forca replicativa presenta dei problemi dovuti alla formazione di **superavvolgimenti positivi** che devono essere rimossi per non rallentare e infine bloccare il processo di replicazione.



LE DNA ELICASI e DNA GIRASI

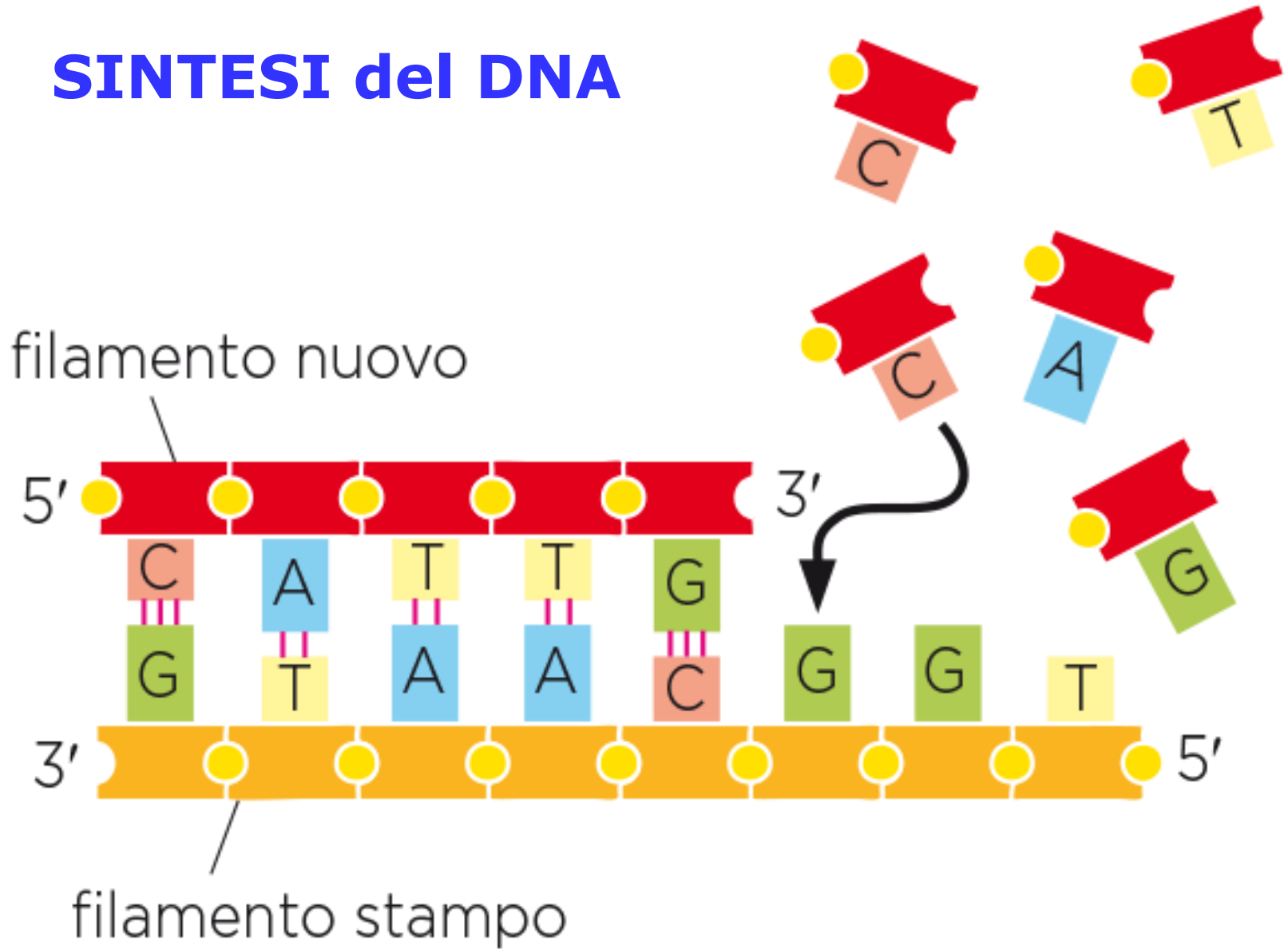
L'apertura della doppia elica e la progressione della forca replicativa richiede l'attività delle **DNA ELICASI** e **DNA GIRASI** enzimi che svolgono il DNA muovendosi nella stessa direzione della forca replicativa, sfruttando l'energia fornita dall'ATP.





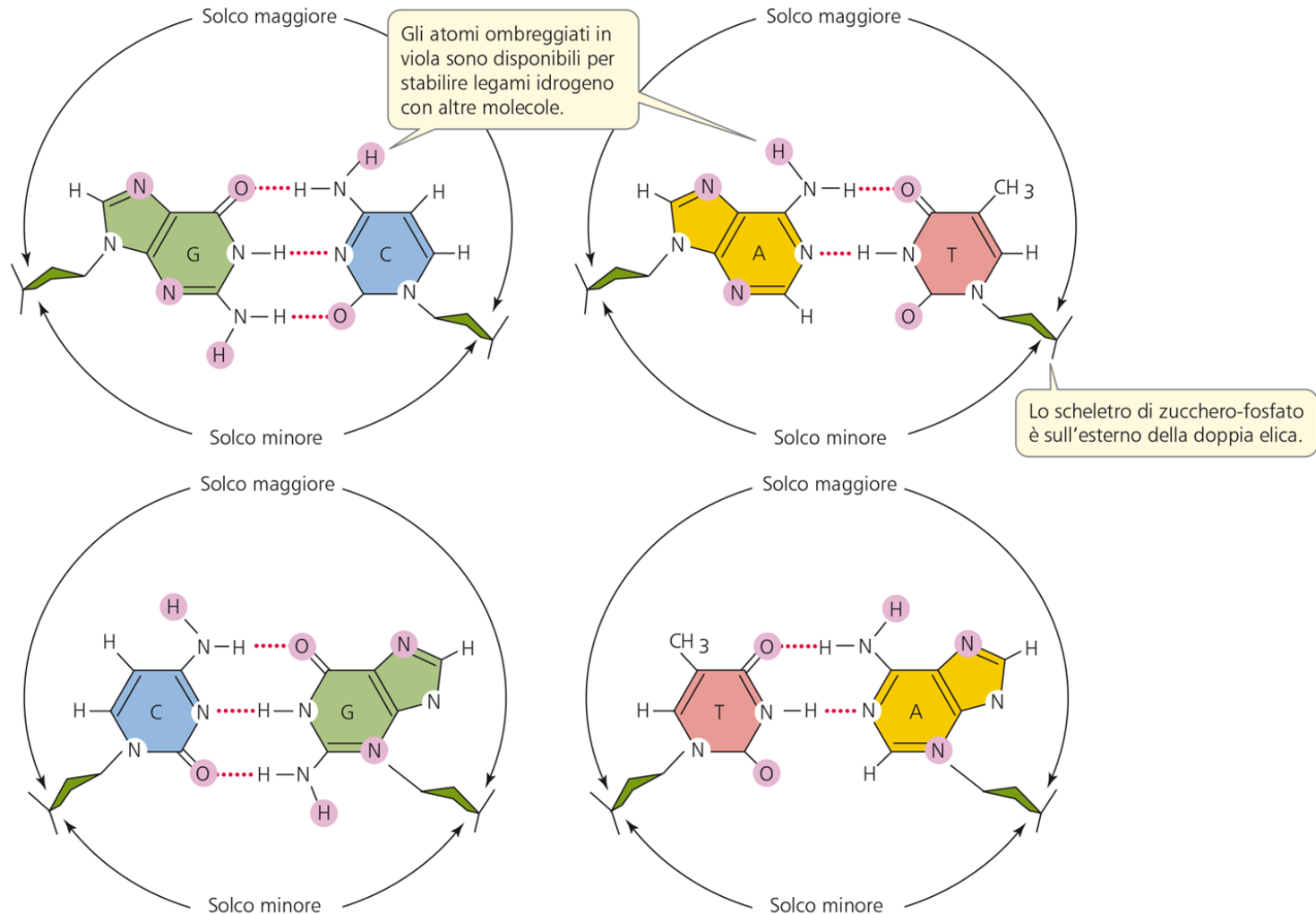
(B) la rotazione libera della doppia elica attorno al legame fosfodiesterico diminuisce lo stress torsionale a monte dell'elicasi; dopo ciò la rottura del singolo filamento viene saldata

SINTESI del DNA

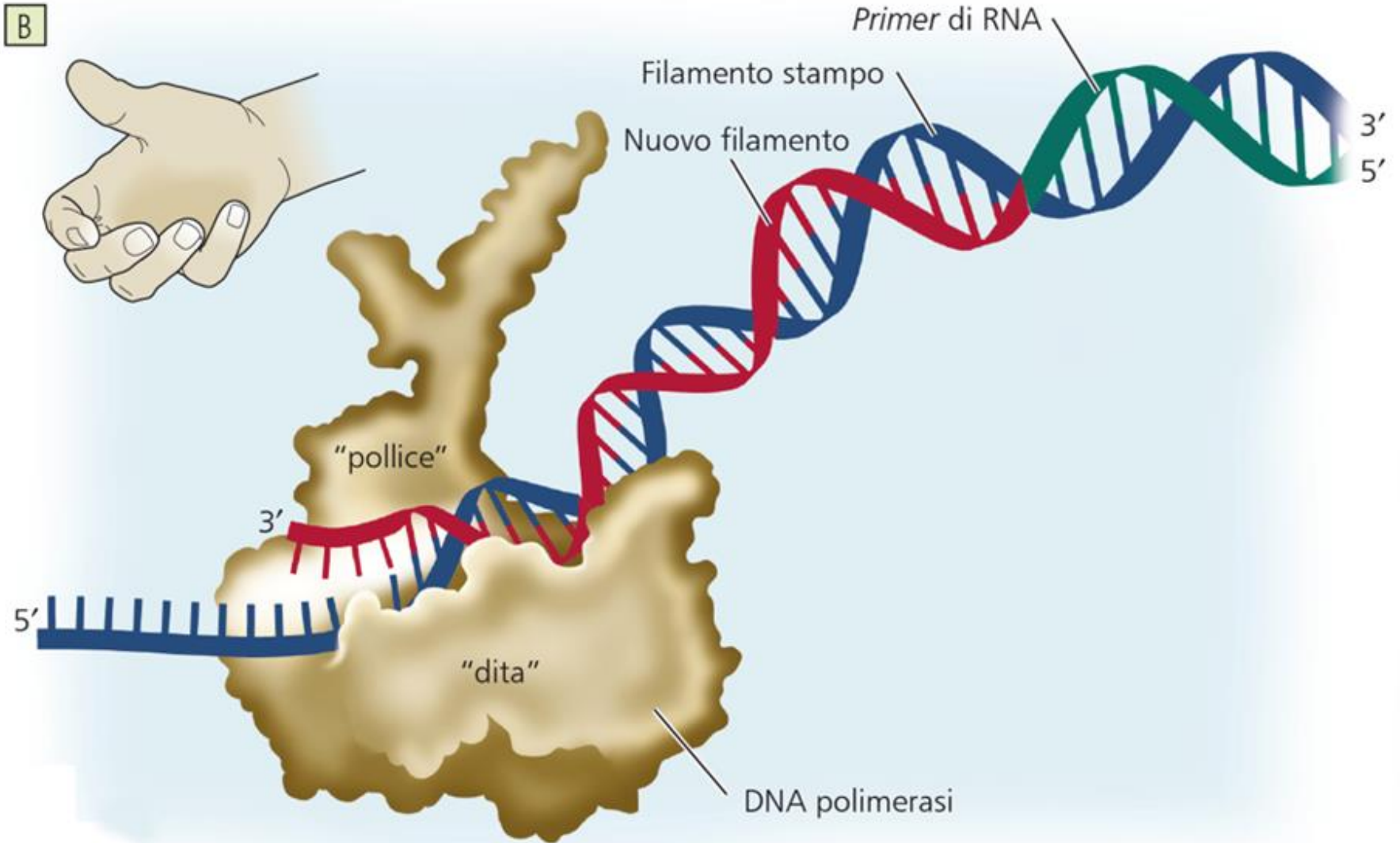


La sintesi del DNA è catalizzata dalla DNA polimerasi

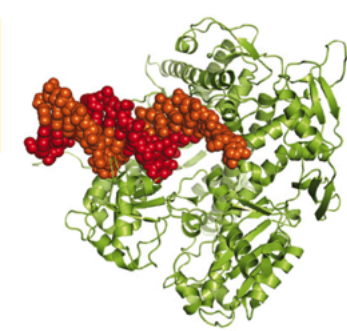
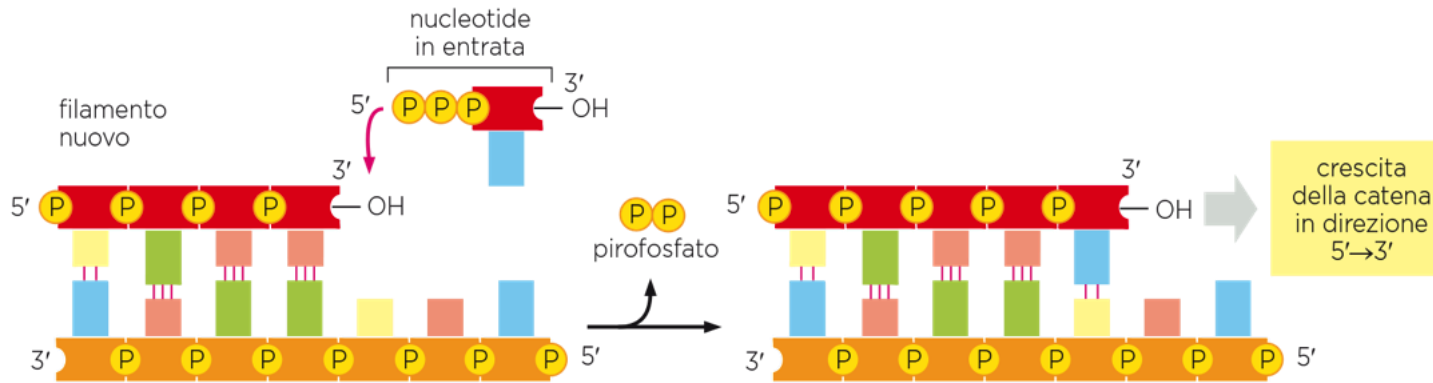
Il sito attivo della DNA polimerasi non distingue tra i 4 nucleotidi ma riconosce la geometria che caratterizza le coppie di basi **A:T** e **G:C**.



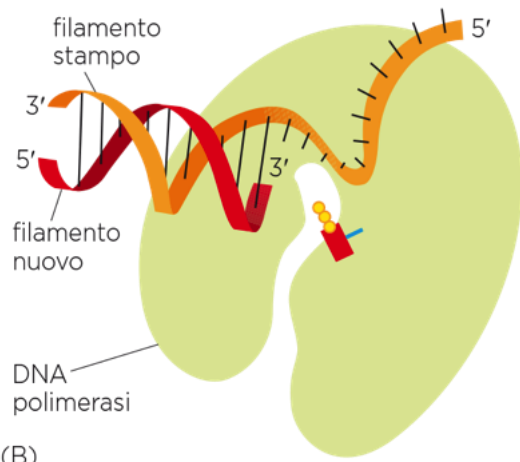
DNA POLIMERASI



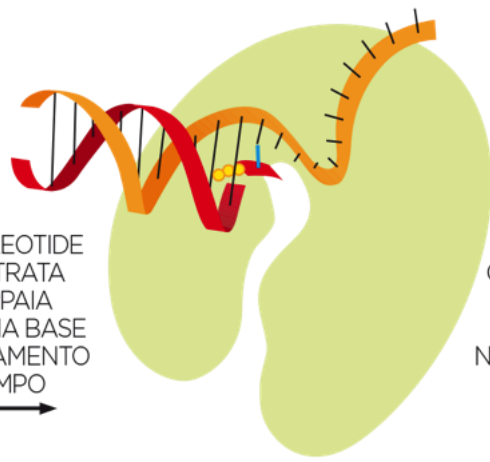
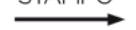
DNA POLIMERASI



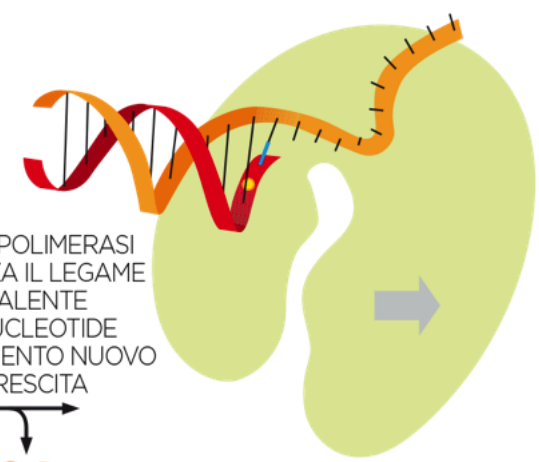
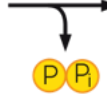
(A)



IL NUCLEOTIDE IN ENTRATA SI APPAIA CON UNA BASE DEL FILAMENTO STAMPO



LA DNA POLIMERASI CATALIZZA IL LEGAME COVALENTE DEL NUCLEOTIDE NEL FILAMENTO NUOVO IN CRESCITA



(C)

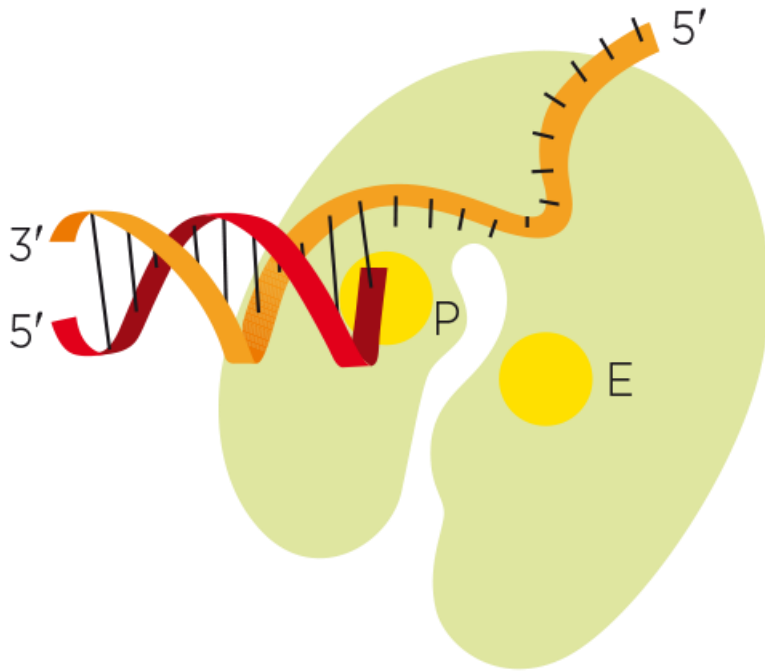
(B)

LE DNA POLIMERASI

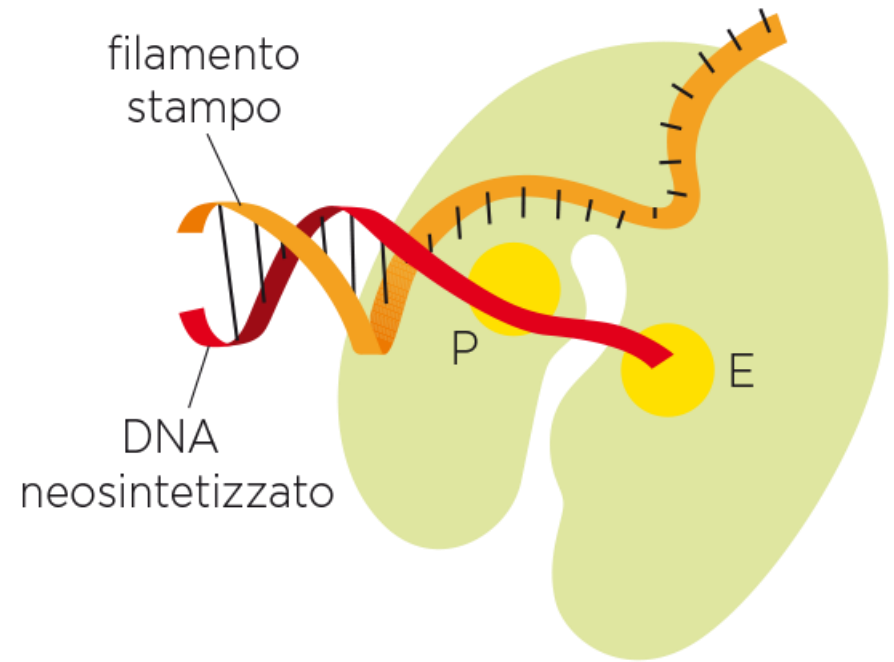
In E. Coli si distinguono almeno **5 DNA polimerasi** diverse, mentre negli **eucarioti** si distinguono circa **15 DNA polimerasi**

Enzimi	Direzione della sintesi	Attività esonucleasica	Funzioni possibili
Procariotici			
Polimerasi I	5' → 3'	5' → 3' 3' → 5'	riempimento dei "gap" lasciati dalla rimozione dell'innesco; riparazione del DNA
Polimerasi II	5' → 3'	3' → 5'	riempimento dei "gap" lasciati dalla rimozione dell'innesco; riparazione del DNA
<u>Polimerasi III</u>	5' → 3'	3' → 5'	enzima principale della replicazione
Eucariotici			
<u>Polimerasi α</u>	5' → 3'	5' → 3'	enzima principale della replicazione (con la Polimerasi δ); riparazione del DNA
Polimerasi β	5' → 3'	nessuna	riparazione del DNA
Polimerasi γ	5' → 3'	3' → 5'	enzima principale della repl. nei mitocondri e cloroplasti
<u>Polimerasi δ</u>	5' → 3'	3' → 5'	enzima principale della replicazione (con la Polimerasi α)
Polimerasi ε	5' → 3'	3' → 5'	riparazione del DNA; può cooperare con le Polimerasi α e δ nei meccanismi principali della replicazione

CORREZIONE di ERRORI



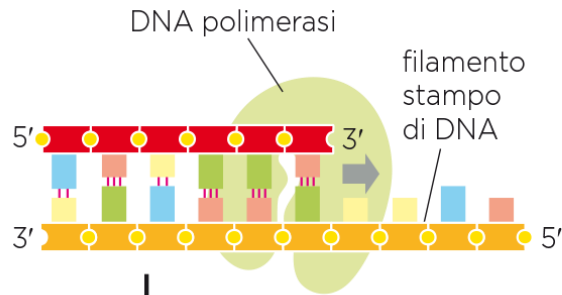
ATTIVITÀ DI POLIMERIZZAZIONE



ATTIVITÀ DI AUTOCORREZIONE

CORREZIONE di BOZZE

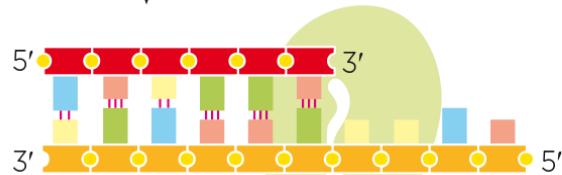
«Proofreading»



LA POLIMERASI AGGIUNGE UN NUCLEOTIDE ERRATO



IL NUCLEOTIDE CON APPAIAMENTO SCORRETTO VIENE RIMOSSO PER ATTIVITÀ AUTOCORRETTIVA

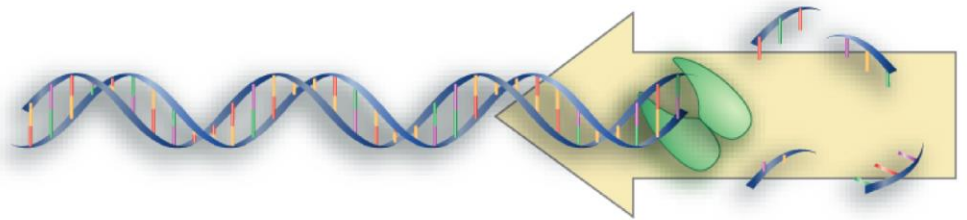


L'ESTREMITÀ 3' CON APPAIAMENTO CORRETTO PERMETTE L'AGGIUNTA DEL NUCLEOTIDE SUCCESSIVO

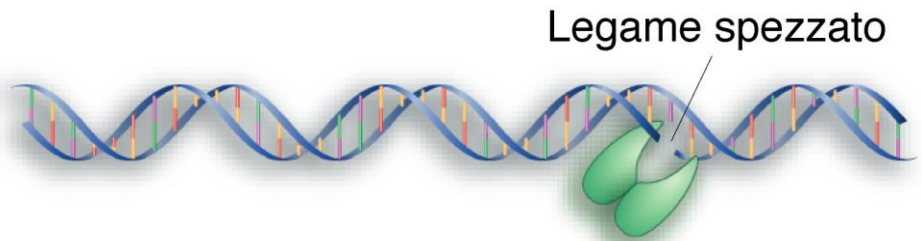


LA SINTESI PROCEDE IN DIREZIONE 5' → 3'

Le esonucleasi tagliano un pezzo alla volta a partire dalle estremità

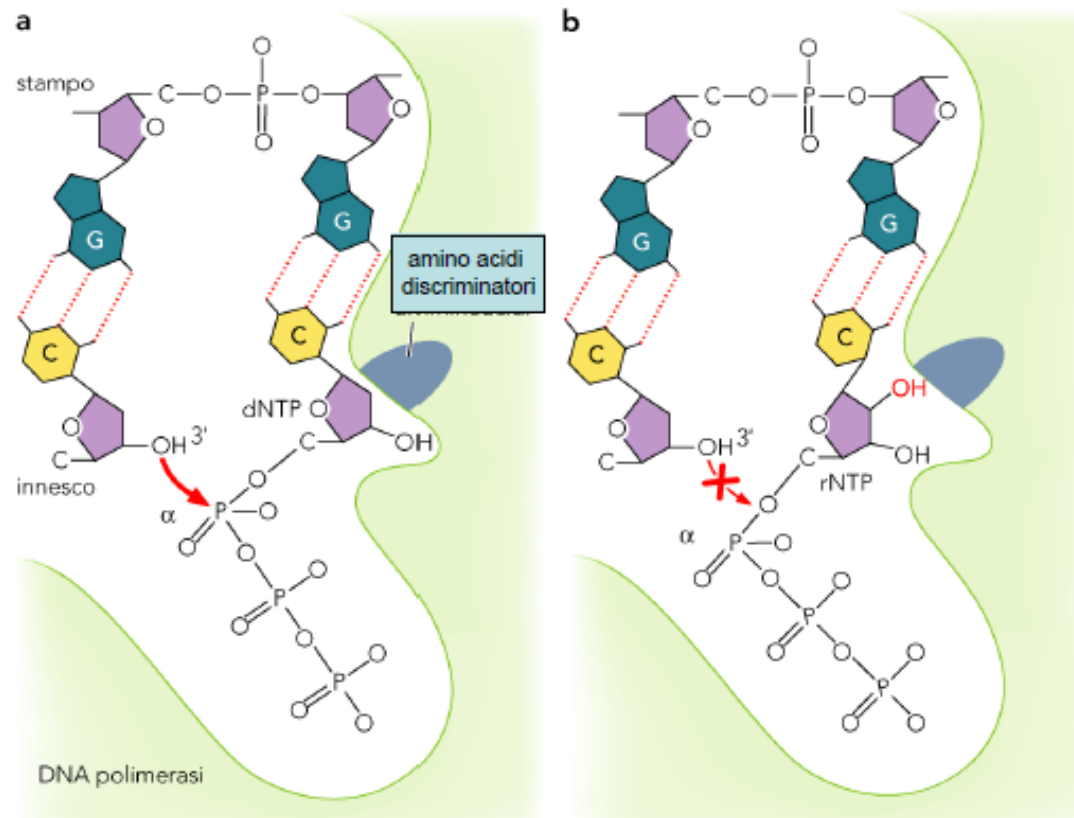


Le endonucleasi attaccano legami interni



La DNA polimerasi discrimina i ribonucleotidi

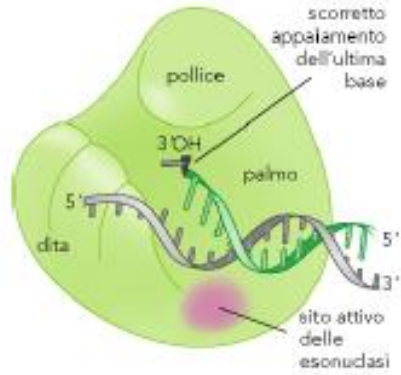
La **DNA polimerasi discrimina** in modo estremamente efficiente i **ribonucleotidi** che sono incorporati con un'efficienza molto bassa (1/1000).



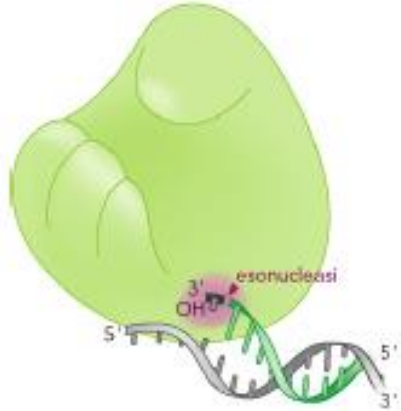
Ciò è dovuto al fatto che c'è un impedimento sterico alla presenza del 2'OH.

Attività 3'-esonucleasica della DNA polimerasi

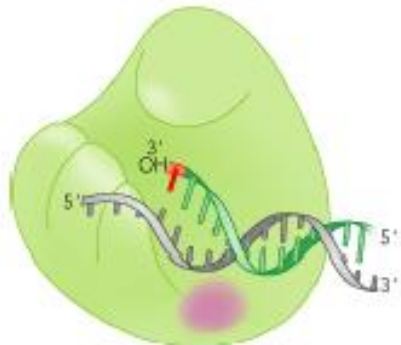
a sintesi del DNA lenta o assente



b rimozione dei nucleotidi non complementari



c ripristino della normale attività di sintesi

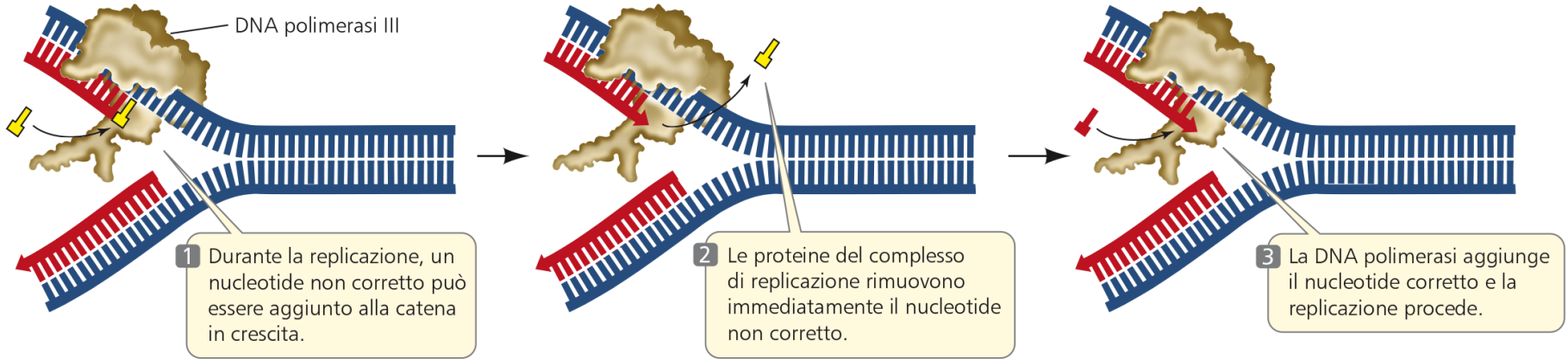


L'incorporazione di basi errate (~ 1 su 100) diminuisce l'affinità per il dominio catalitico. Gli appaiamenti errati vengono quindi immediatamente rimossi ad opera dell'attività **3'-esonucleasica** presente nella DNA polimerasi (detta anche attività di "**proofreading**").

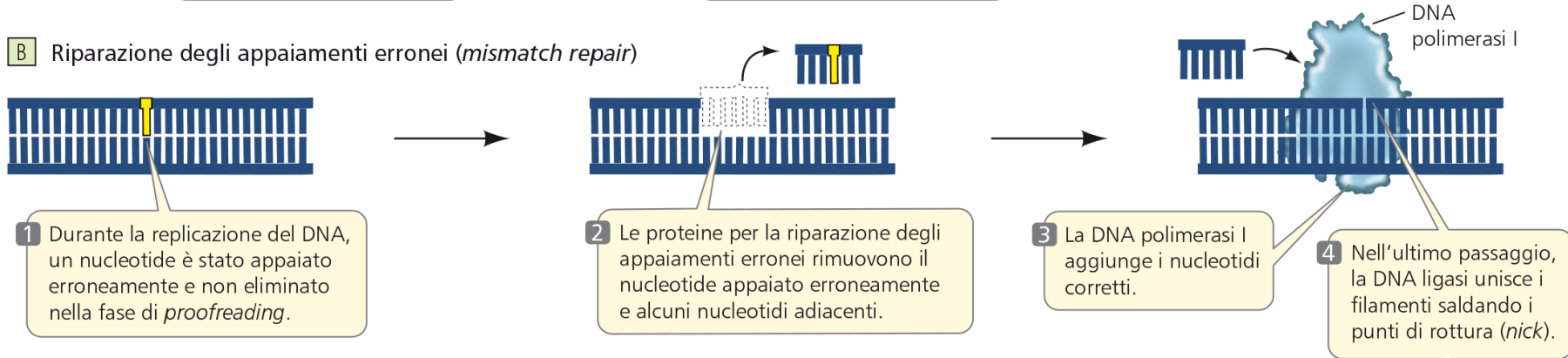
La rimozione della distorsione provocata dall'appaiamento errato ripristina l'affinità per il dominio catalitico e consente alla replicazione di continuare. L'attività proofreading aumenta la **fedeltà della replicazione di circa 100 volte**. Un ulteriore livello di accuratezza è garantito dai **meccanismi di riparazione del DNA**.

ALTRE MODALITA' di RIPARAZIONE

A Correzione di bozze (DNA proofreading)



B Riparazione degli appaiamenti erranei (mismatch repair)

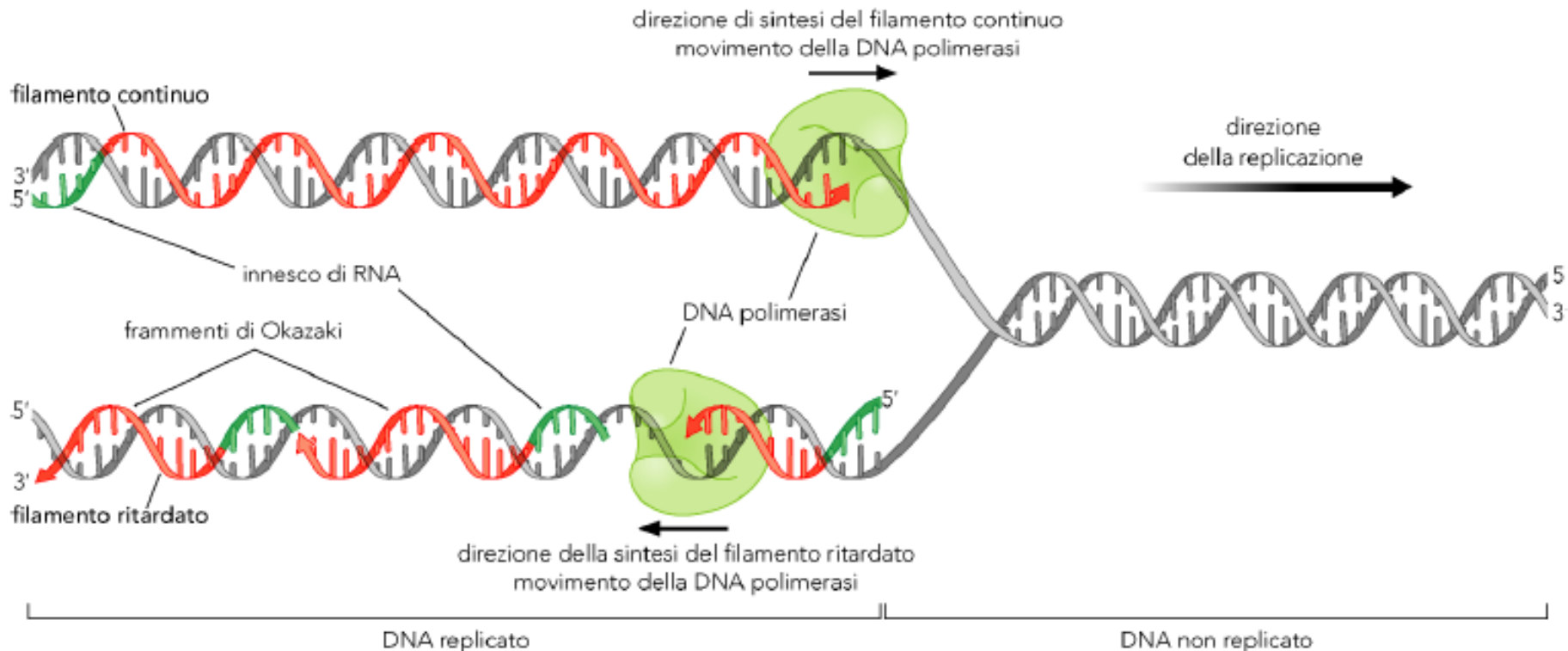


C Riparazione per escissione



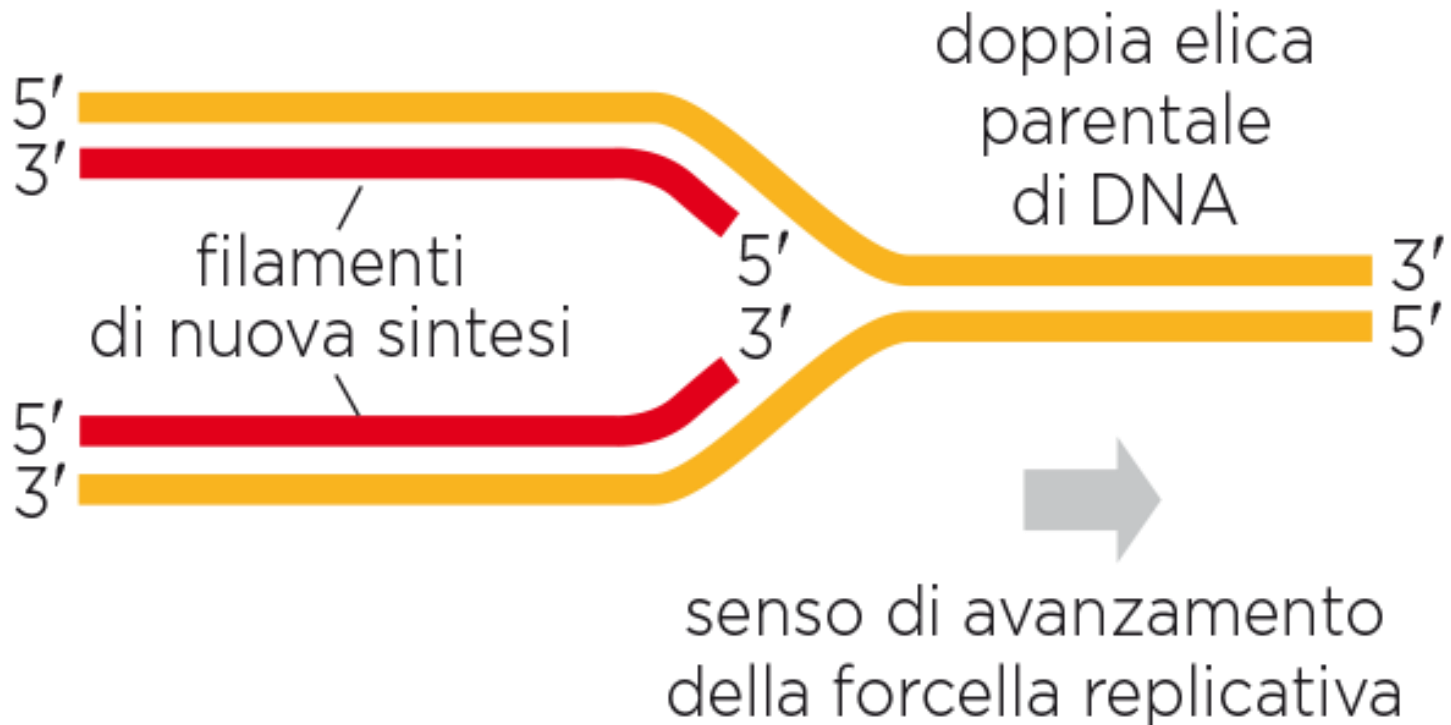
FORCA di REPLICAZIONE

La natura antiparallela del DNA complica il processo di replicazione per il fatto che per uno dei filamenti la sintesi del DNA procede nella **direzione della replicazione** (**leading strand**), mentre per l'altro procede in **direzione opposta** (**lagging strand**).

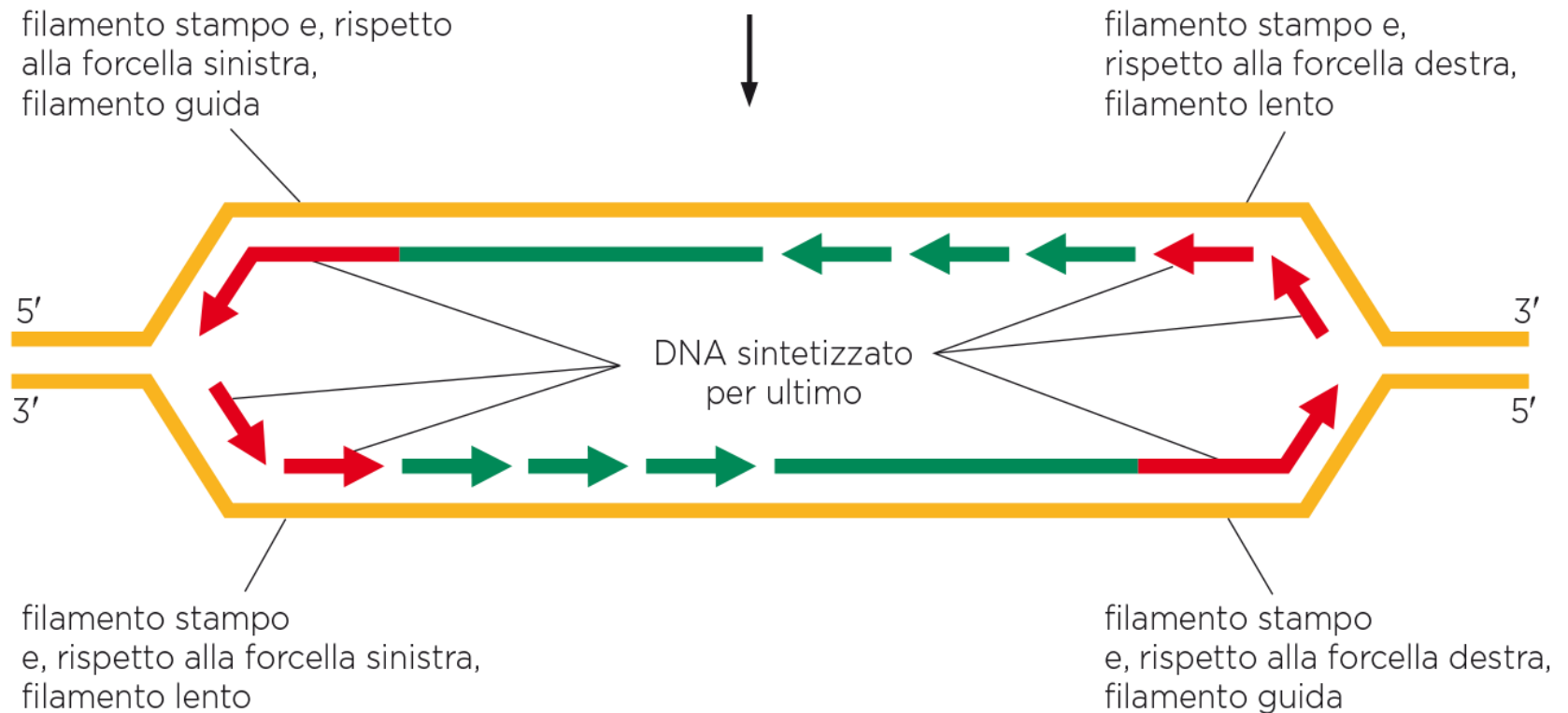
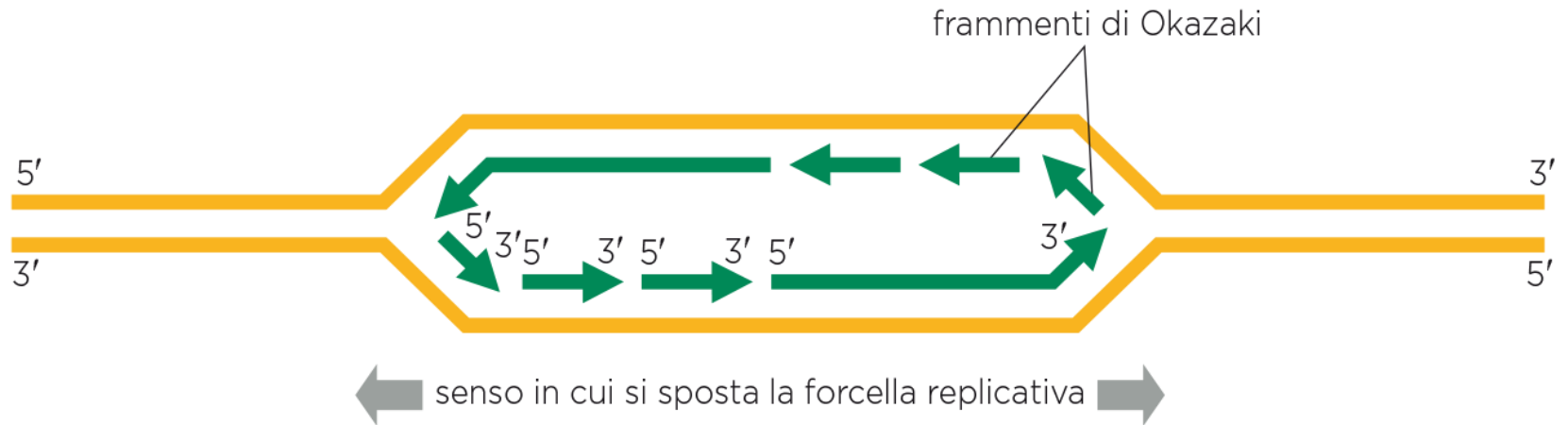


SINTESI sui 2 FILAMENTI

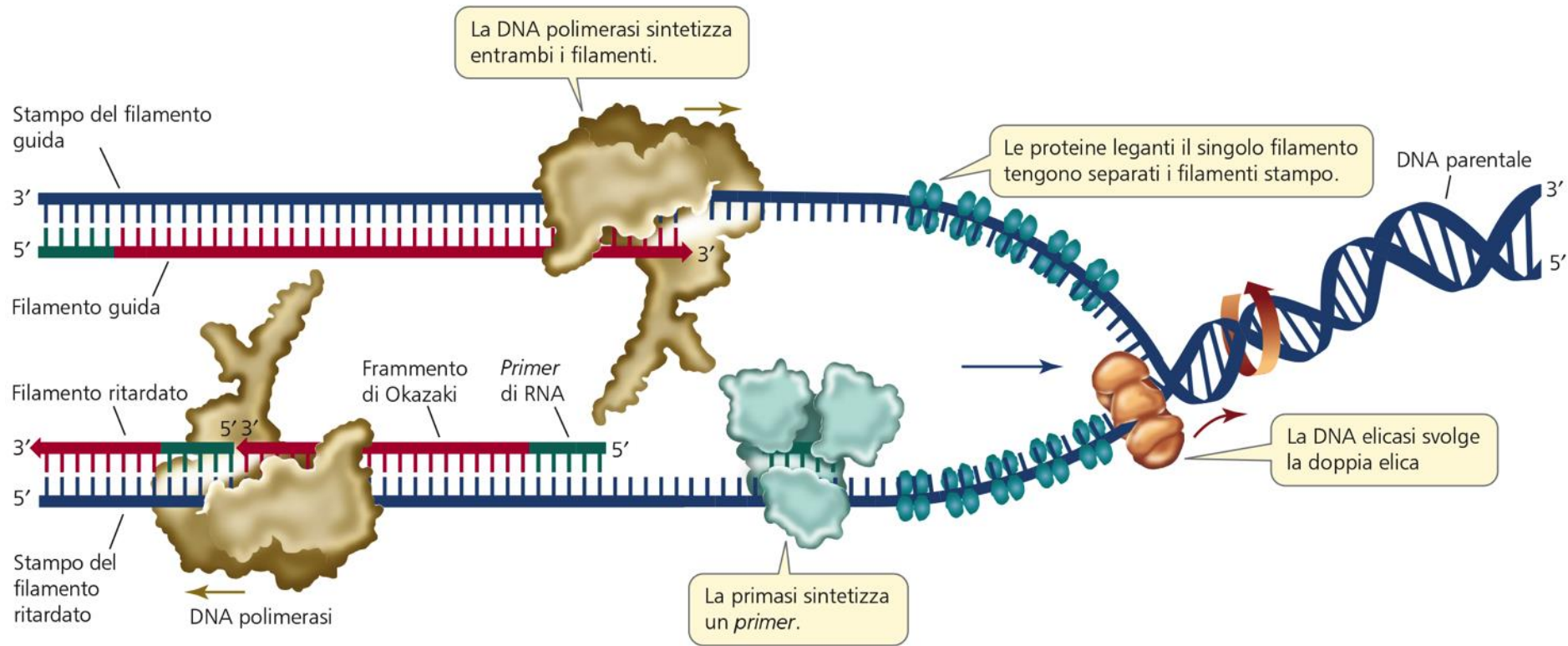
Su un filamento (leading strand) la sintesi sarà ininterrotta dato che sarà nel senso della forza di replicazione. Sul secondo (lagging strand) sarà a pezzi. Essendo l'avanzamento della bolla di replicazione bidirezionale, esistono in realtà due mezzi filamenti leading e lagging...



SINTESI sui 2 FILAMENTI



SINTESI sui 2 FILAMENTI

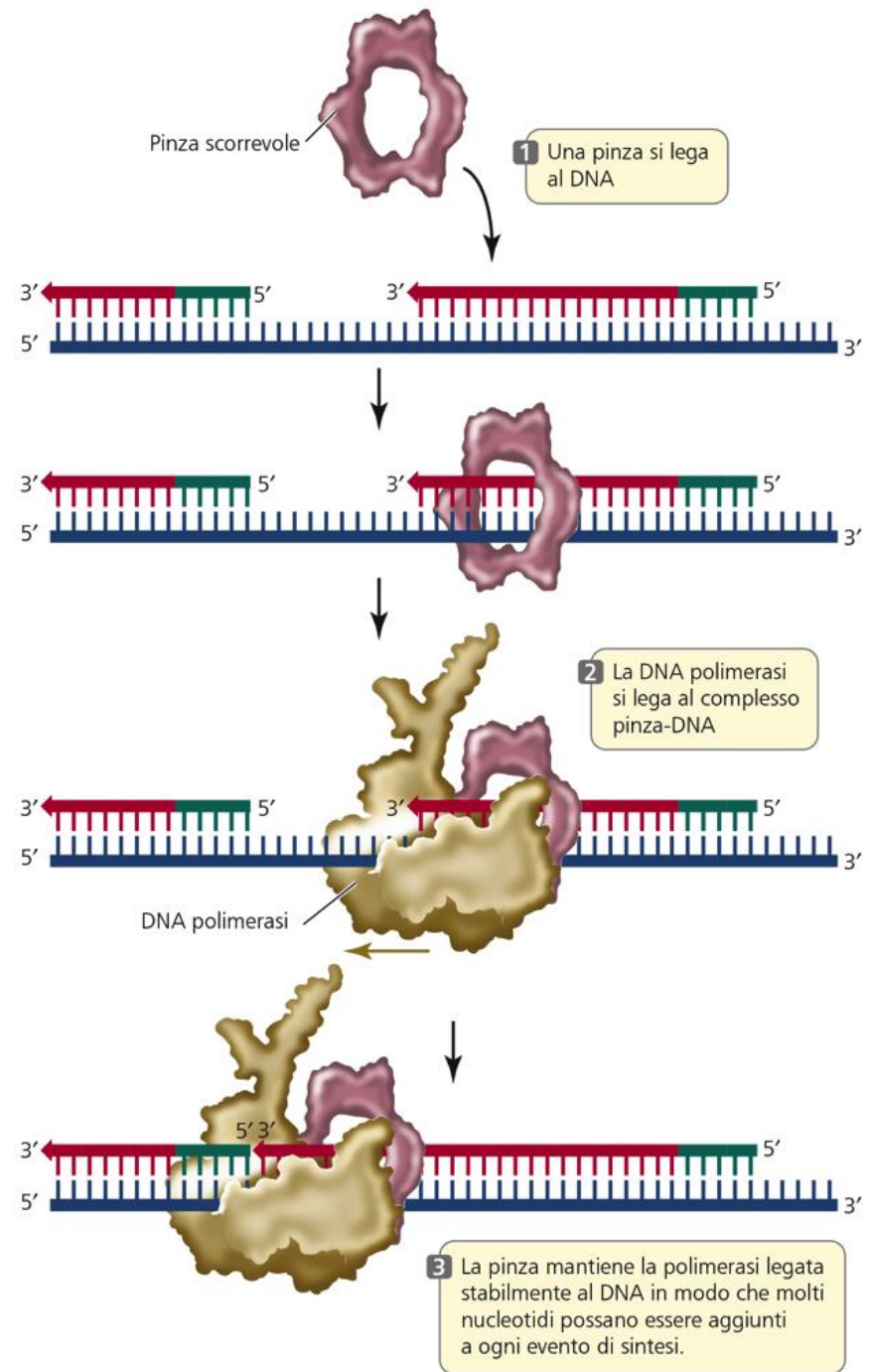


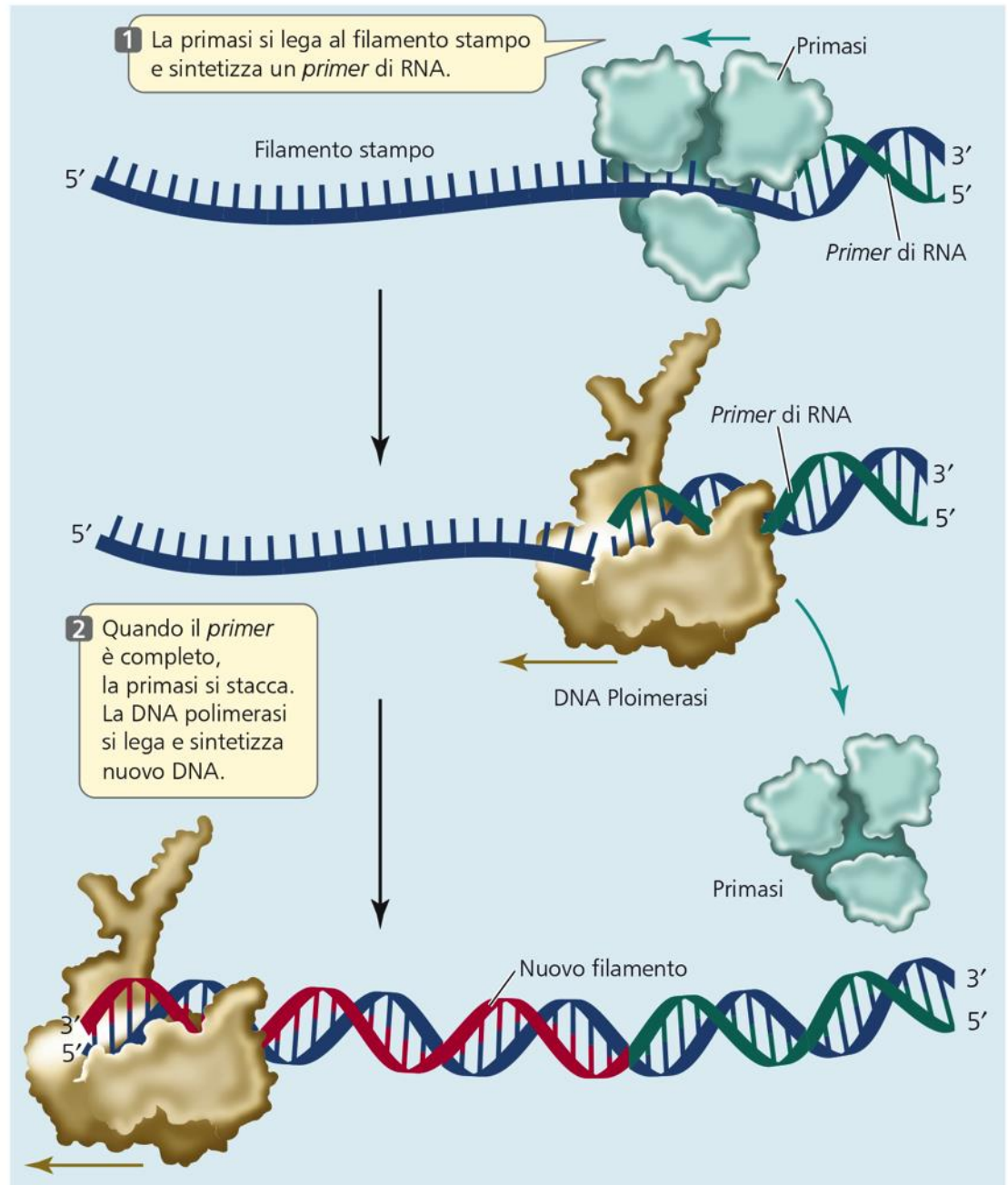
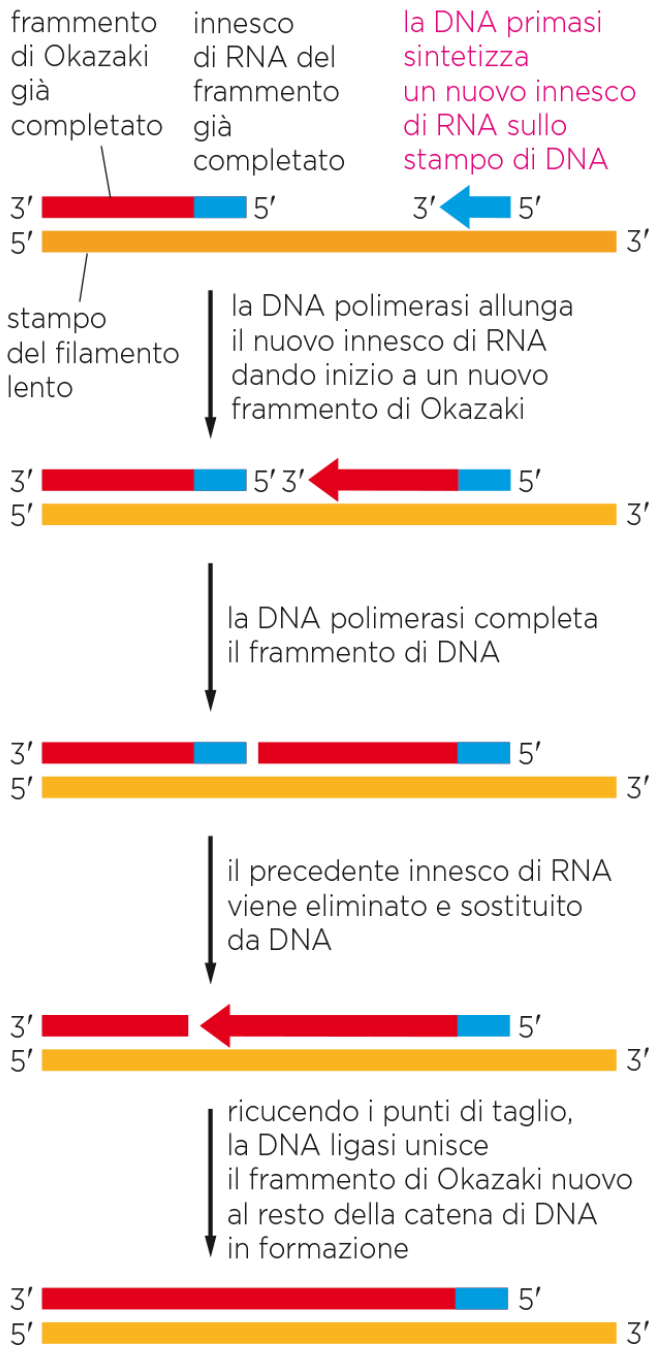
La sintesi del DNA sui due filamenti avviene in maniera diversa. Abbiamo già detto che sono antiparalleli, che la sintesi avviene in direzione 5' ► 3' e che la forza di replicazione procede, svolgendo il DNA per permettere la sintesi....

PRIMASI

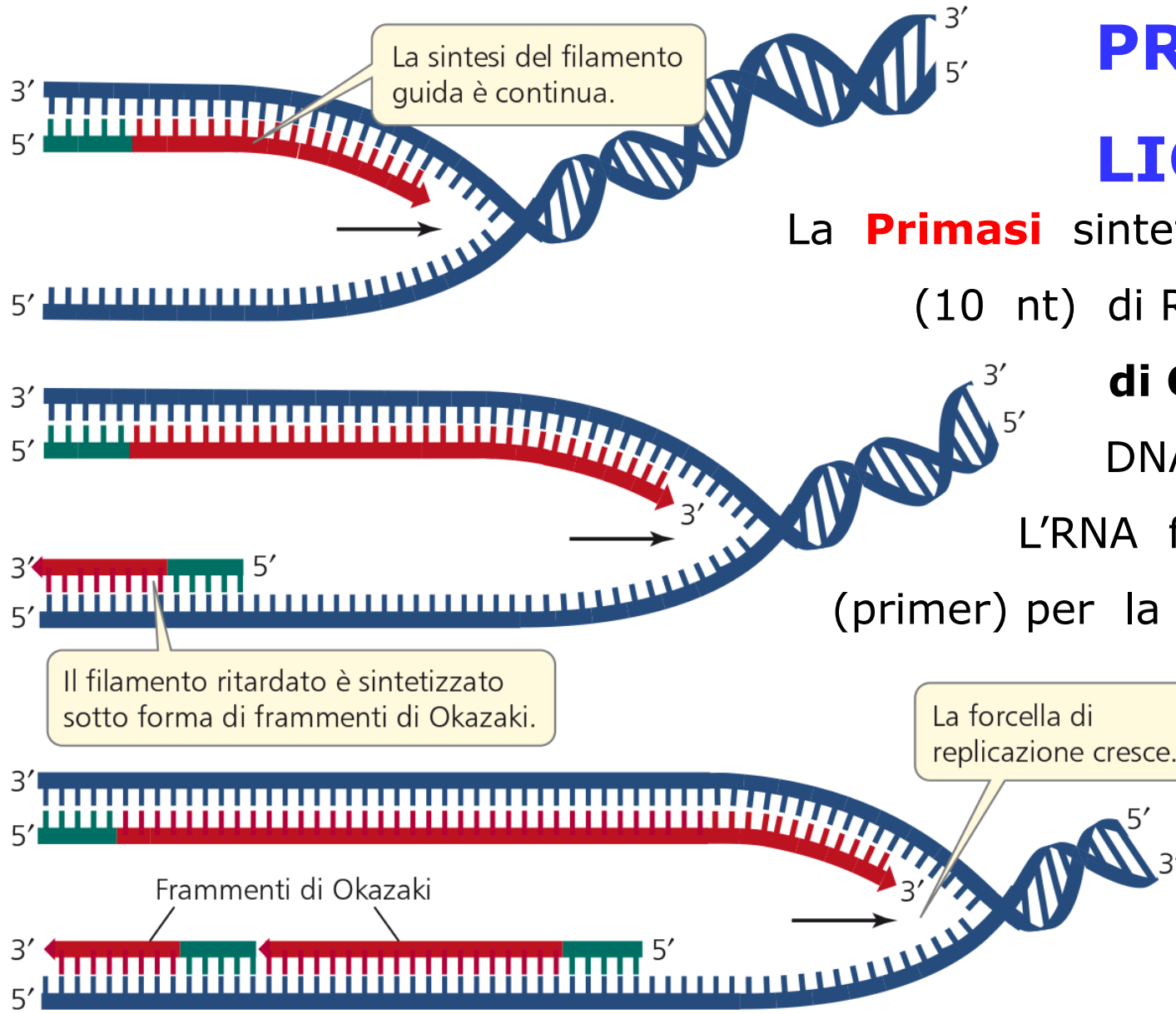
La DNA polimerasi è incapace di dare inizio a un filamento di DNA totalmente nuovo.

La DNA polimerasi procede sommando nucleotidi solo ad altri nucleotidi già appaiati in un doppio filamento.





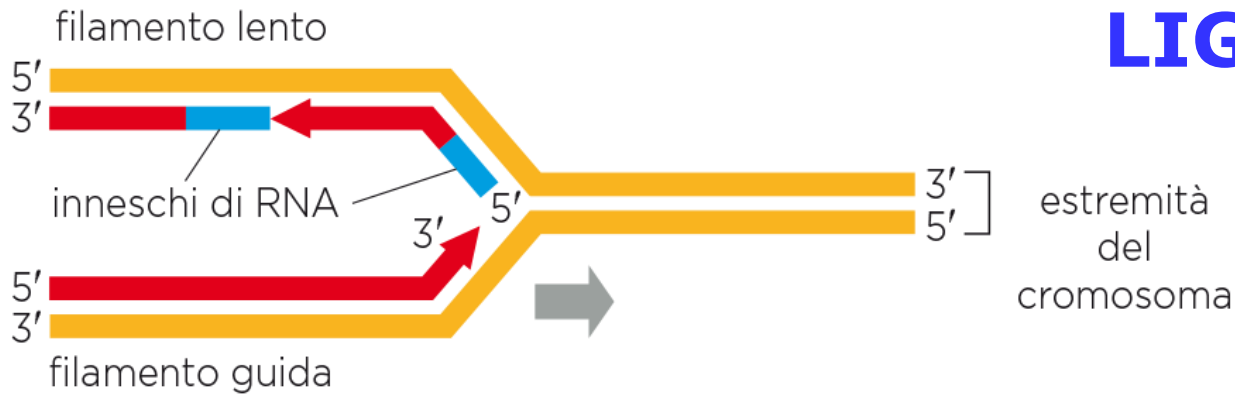
PRIMASI e LIGASI



La **Primasi** sintetizza brevi tratti (10 nt) di RNA (**Frammenti di Okazaki**) usando DNA come stampo. L'RNA fa poi da innesco (primer) per la sintesi del DNA

Complessivamente la replicazione avviene in maniera semidiscontinua. I frammenti di Okazaki saranno poi uniti dall'enzima **DNA ligasi**

LIGASI



LA FORCA REPLICATIVA RAGGIUNGE L'ESTREMITÀ DEL CROMOSOMA

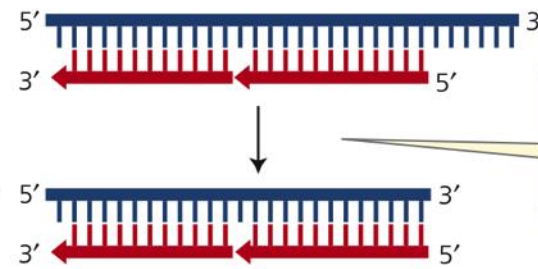
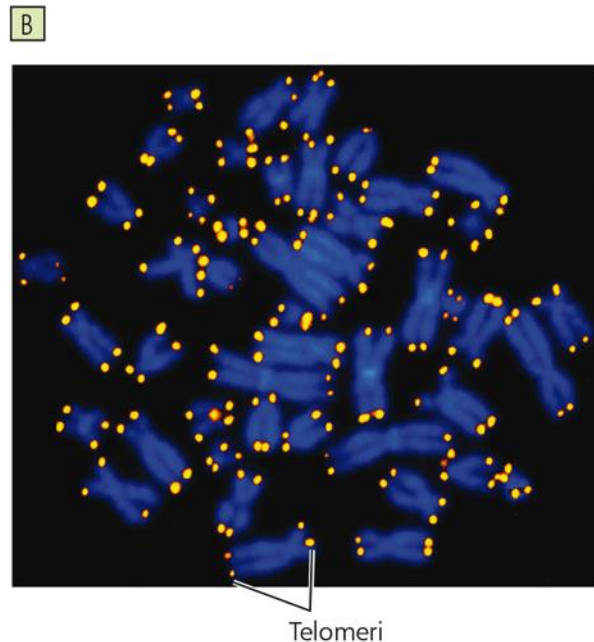
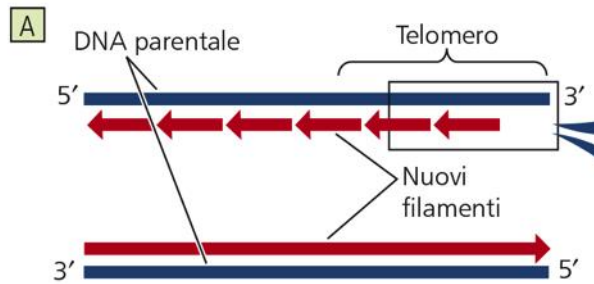


GLI INNESCHI DI RNA VENGONO RIMPIAZZATI DA DNA: GLI SPAZI VENGONO SALDATI DALLA LIGASI

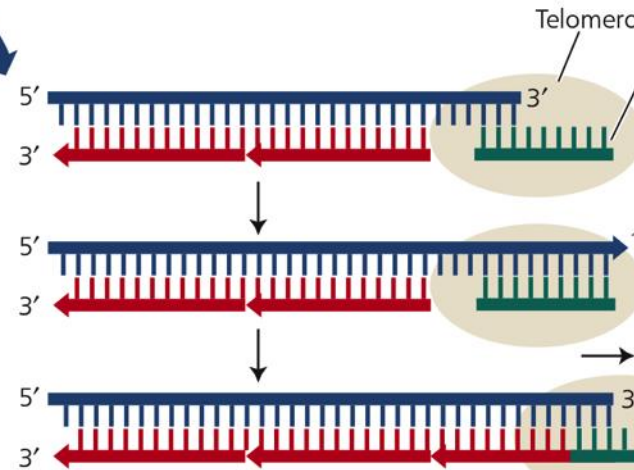


LA TELOMERASI

L'enzima telomerasi, complesso fatto di proteina e RNA, mantiene la lunghezza cromosomica aggiungendo ripetizioni telomeriche alle estremità dei cromosomi.



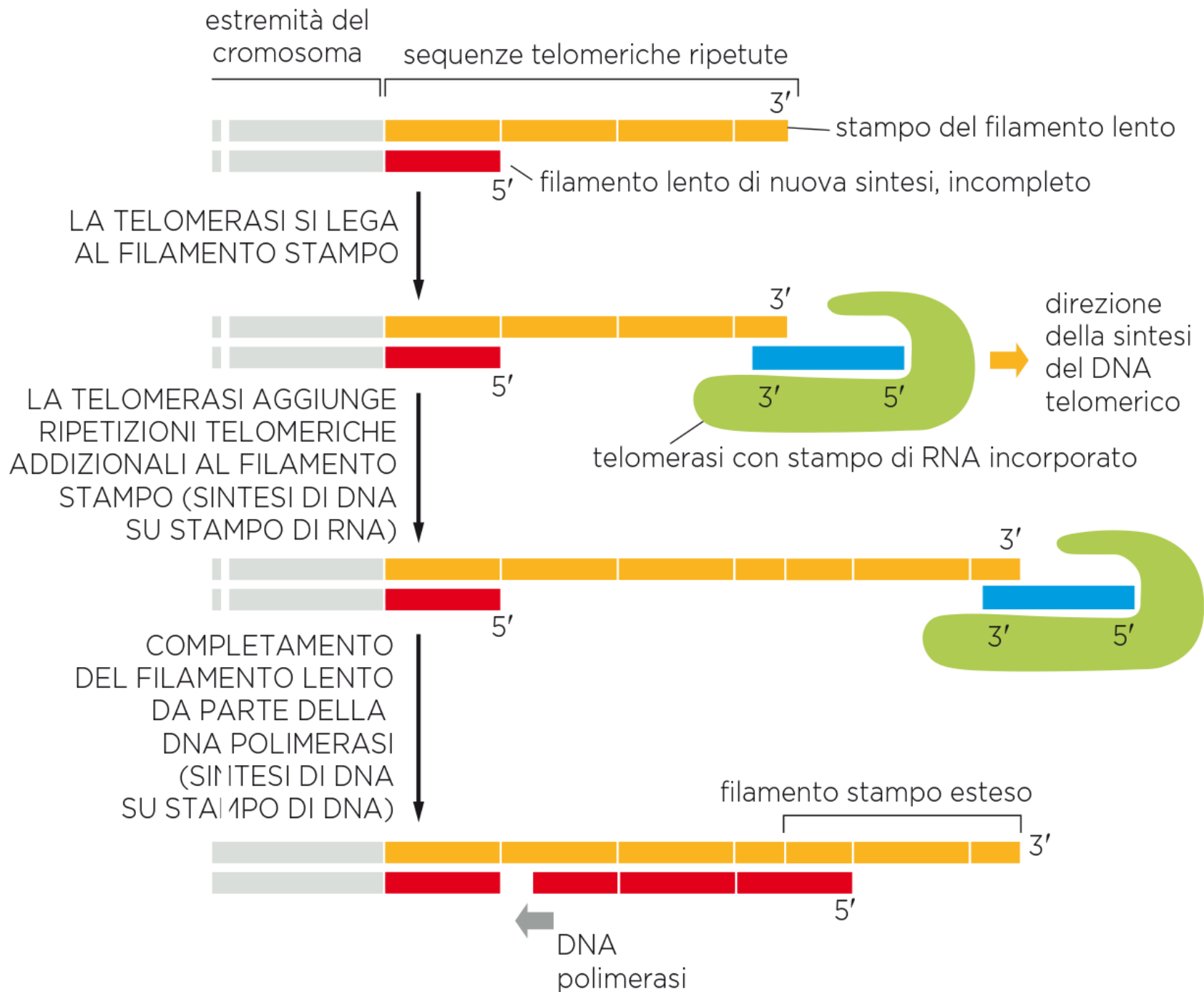
Nella maggior parte delle cellule i nucleotidi terminali non replicati vengono rimossi e il cromosoma si accorcia.



Nelle cellule staminali l'enzima telomerasi utilizza uno stampo di RNA per estendere il telomero.

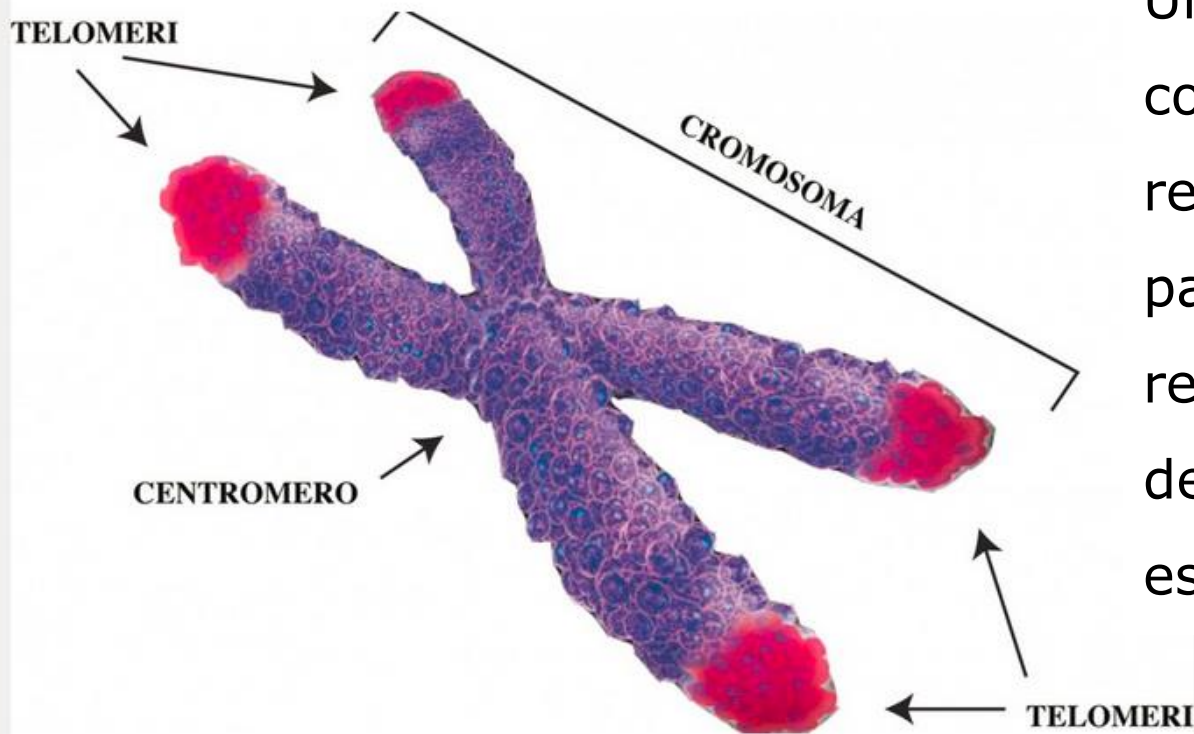
La telomerasi si sposta verso la nuova estremità terminale e la DNA polimerasi riempie lo spazio vuoto. Questo processo può essere ripetuto molte volte per allungare il telomero.

La telomerasi catalizza la sintesi di DNA usando l'RNA come stampo (TERT, trascrittasi inversa telomerica).



IL TELOMERO

Rende stabile le estremità dei cromosomi. Essi infatti rappresentano una sorta di chiusura ermetica che permette al cromosoma di mantenere inalterata la propria struttura.



Un altro importante compito è connesso alla replicazione del DNA, in particolare ai problemi relativi al completamento della replicazione alle estremità dei cromosomi



balena

GTGTGGTCTCGTGATCAAAGGCGAAAGGTGGCTCTAGAGAATCCC

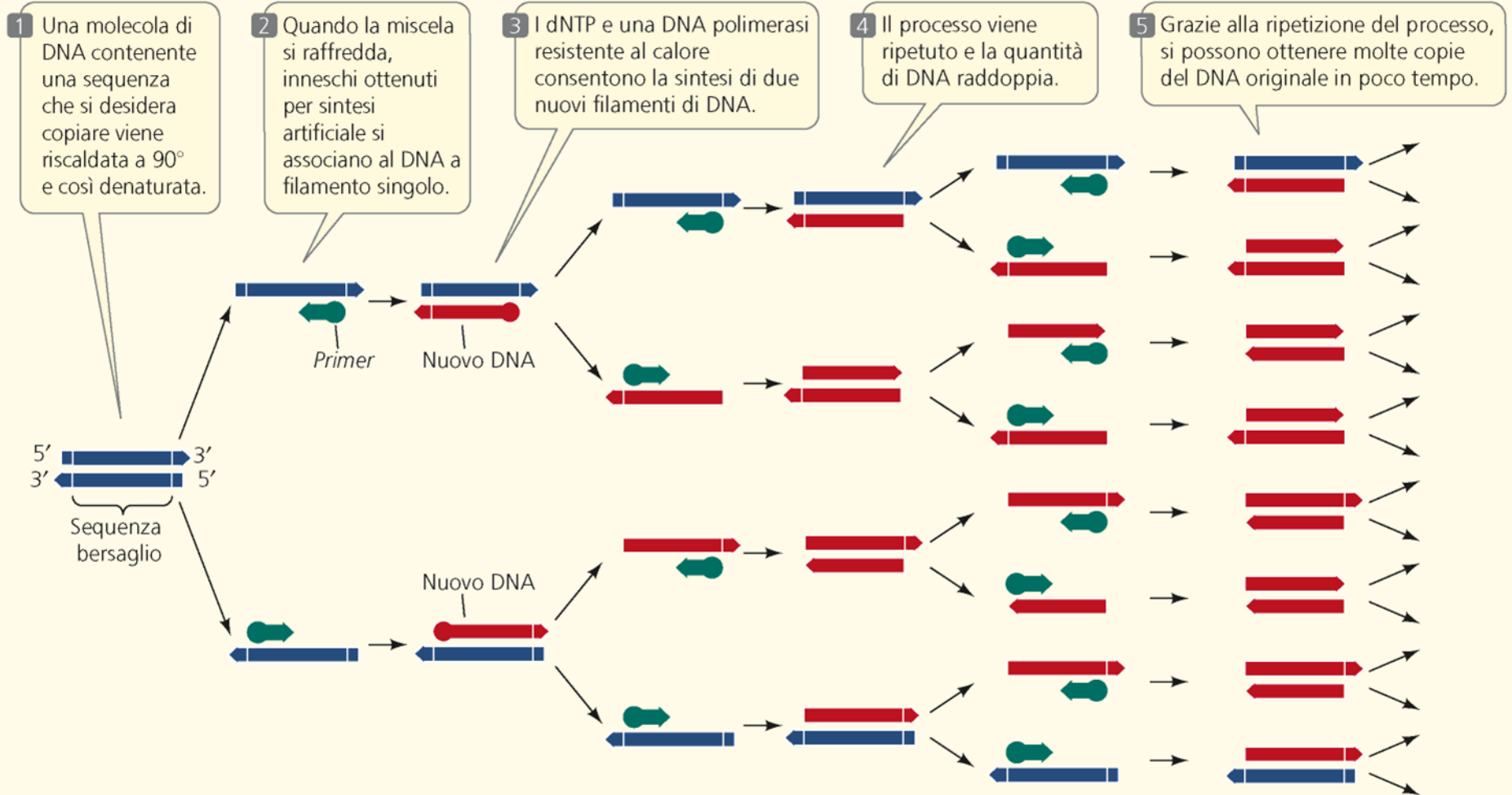
Homo sapiens

GTGTGGTCTCGCGATCAGAGGCGCAAGATGGCTCTAGAGAATCCC

**LA REAZIONE A CATENA
DELLA POLIMERASI
(PCR)**

La reazione a catena della polimerasi

La PCR



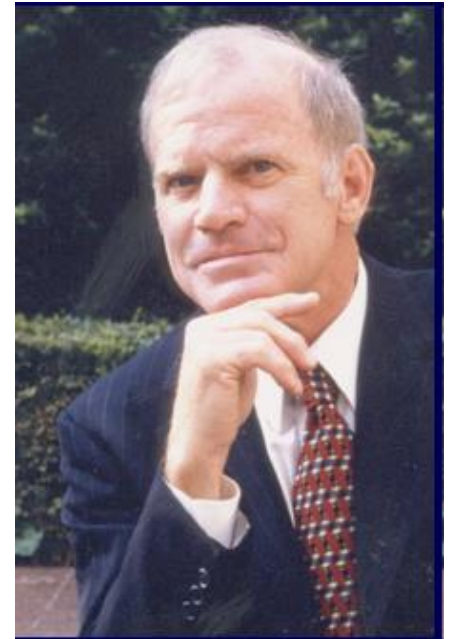
La PCR

La reazione a catena della polimerasi (**polymerase chain reaction** o PCR) è una metodica che ha rivoluzionato la Biologia molecolare.

Fu ideata da **Kary Mullis** nel 1985 e da allora le sue applicazioni hanno interessato la ricerca biologica di base e quella applicata.

Per questa invenzione vinse il **premio Nobel** nel 1993.

Numerosi varianti della PCR trovano applicazioni in biologia molecolare, in diagnostica molecolare e in ambito forense, nell'analisi dell'espressione genica, ecc.



Cos'è la PCR

- È l'**amplificazione esponenziale** in vitro di una **specifica regione di DNA** a doppia elica, generandone una quantità sufficiente per essere analizzata (clonaggio, sequenziamento, costruzione di mappe di restrizione, ecc.).
- Richiede due oligonucleotidi (**primer**), ciascuno complementare ad una dei due filamenti di DNA da amplificare ed una **DNA polimerasi**.
- Cicli ripetuti di riscaldamento e raffreddamento amplificano la regione di DNA compresa tra i due primer, producendo grandi quantità di DNA.

TAQ polimerasi

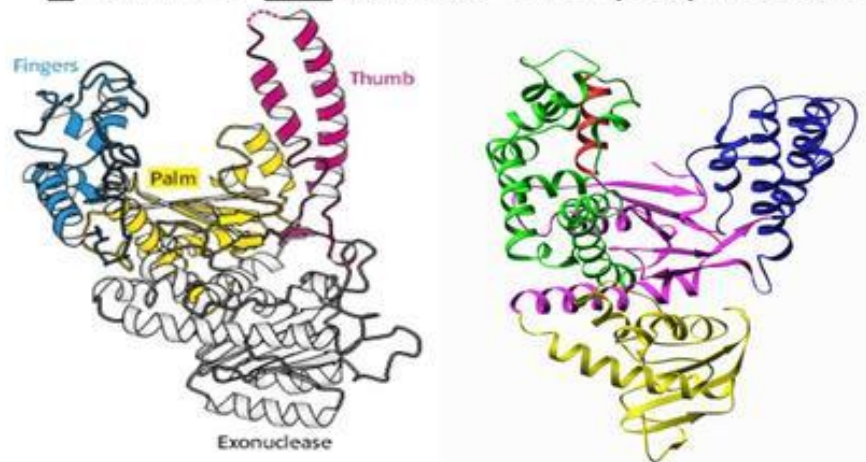
E' una DNA polimerasi estratta dal **Thermophilus aquaticus**, un batterio termofilo, e perciò è detta Taq polimerasi.

Ha il vantaggio di essere **termostabile**, quindi resistente alle temperature di denaturazione del primo step del ciclo di amplificazione.

Tale enzima interviene nella fase di estensione, cioè l'aggiunta di nucleotidi e l'allungamento dei primer di DNA.



Thermus Aquaticus DNA polymerase



Come funziona la PCR

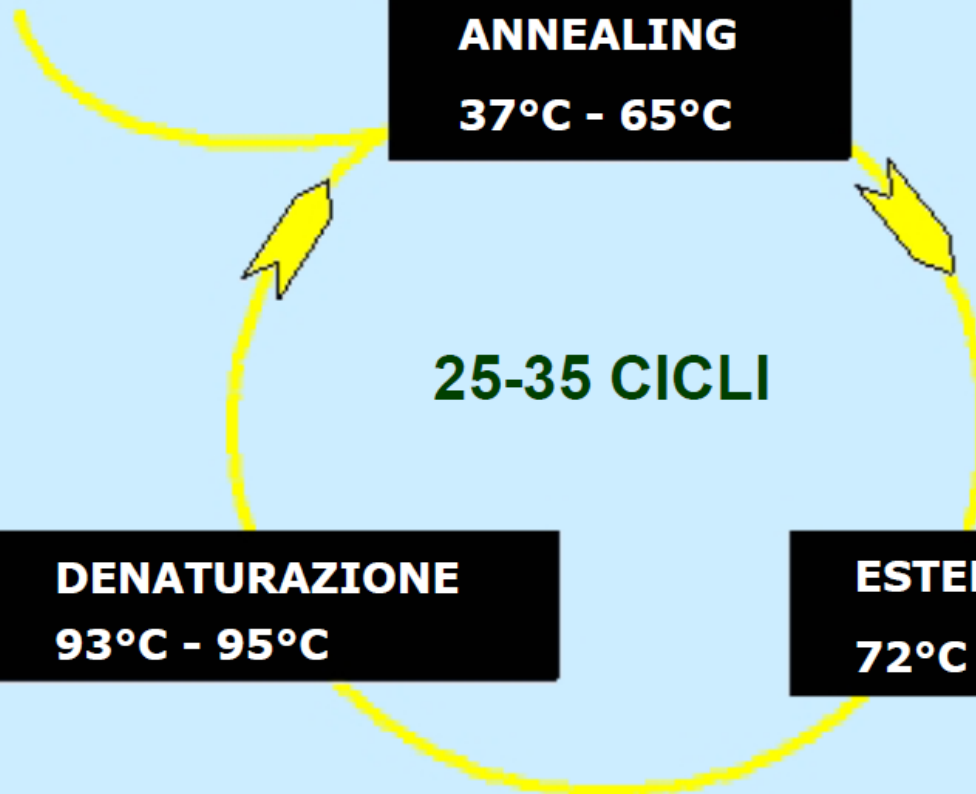
DENATURAZIONE
93°C - 95°C

ANNEALING
37°C - 65°C

25-35 CICLI

DENATURAZIONE
93°C - 95°C

ESTENSIONE
72°C



Ciclo della PCR

1. Denaturazione

30-60 secondi, 93-95 °C

durante la denaturazione la doppia elica si apre a formare singoli filamenti, e ogni reazione enzimatica cessa (ad esempio le reazioni di allungamento)

2. Annealing

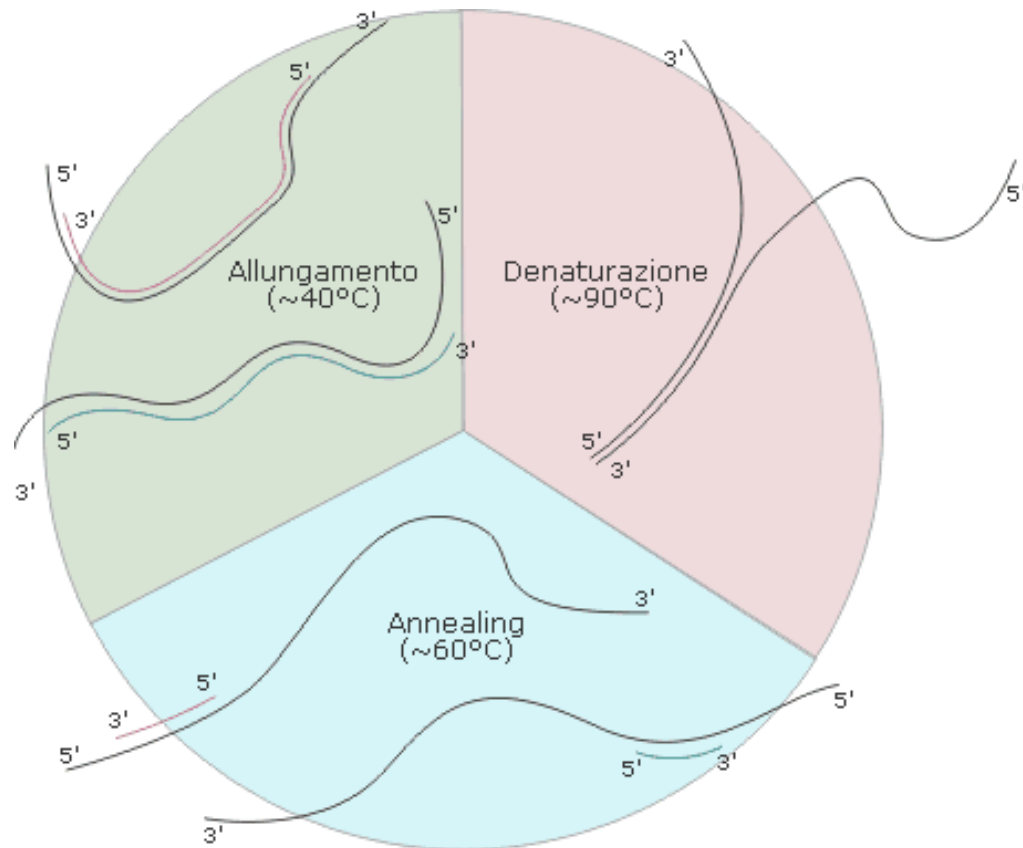
30-60 secondi, 37-65 °C (dipende dalla sequenza dei primer). Legami idrogeno si formano e si rompono continuamente tra primers e filamento stampo. Se i primers si adattano perfettamente allo stampo, i legami idrogeno sono così forti che gli inneschi rimangono attaccati

Ciclo della PCR

3. Estensione/polimerizzazione

1 minuto, 72 °C

La polimerasi aggiunge dNTP agli inneschi in direzione 5' → 3', leggendo lo stampo in direzione 3' → 5'; le basi aggiunte sono complementari al filamento stampo.



ATTREZZATURA NECESSARIA

Un **termociclatore** (thermocycler) deve:

- Ripetere in maniera accurata e ciclica le tre diverse temperature di incubazione della PCR
- cambiare da una temperatura all'altra in un tempo definito (*ramping*) per tutti i campioni

E' importante conoscere le caratteristiche specifiche dello strumento utilizzato.



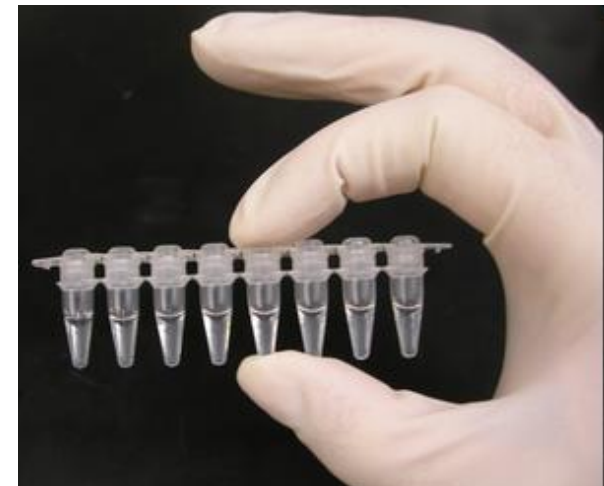
Il profilo termico della reazione

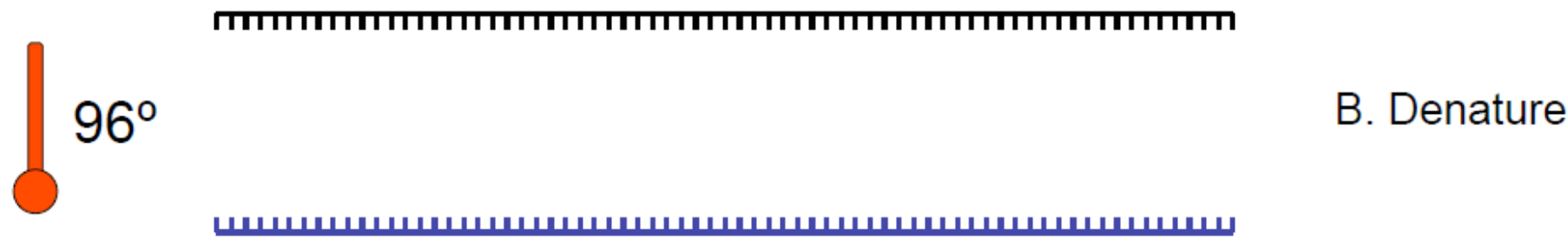
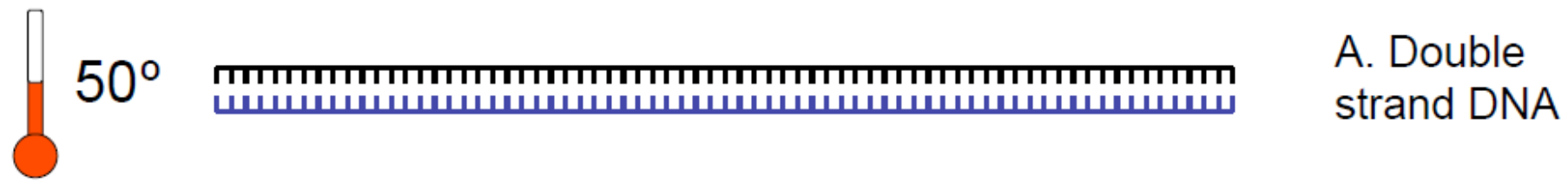
Denaturazione iniziale: è molto importante che lo stampo di DNA sia completamente denaturato (altrimenti può rinaturarsi inficiando la tappa di annealing dei primers): lo step di denaturazione iniziale è quindi solitamente più lungo: 2 - 5 min;

Primer annealing: la temperatura di annealing viene calcolata in base ad una formula poi ottimizzata in maniera empirica.

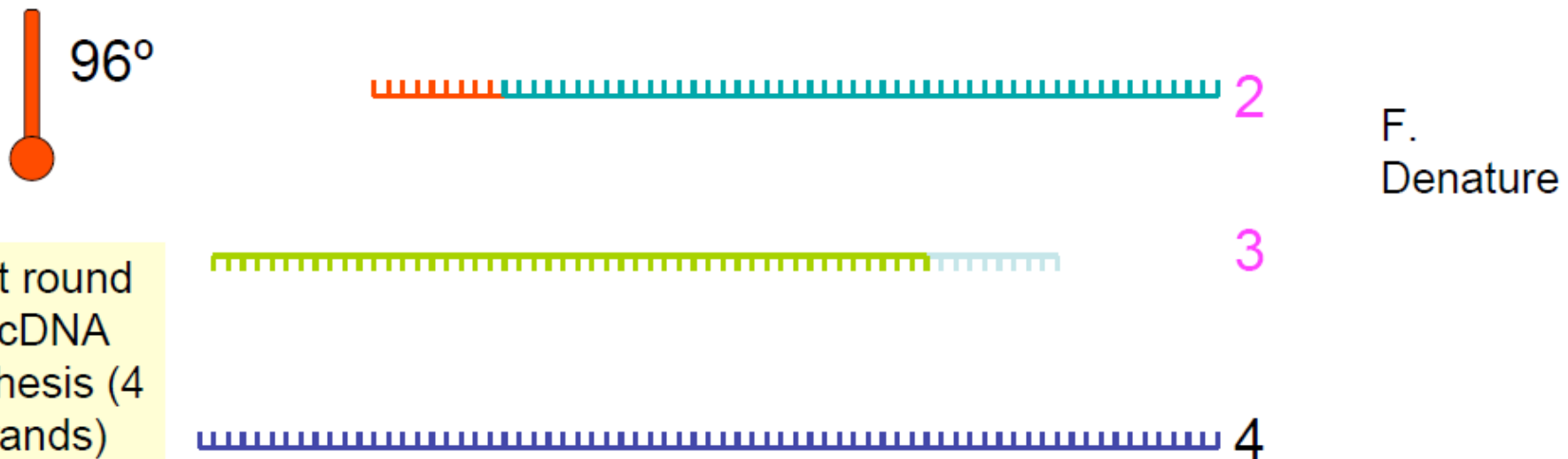
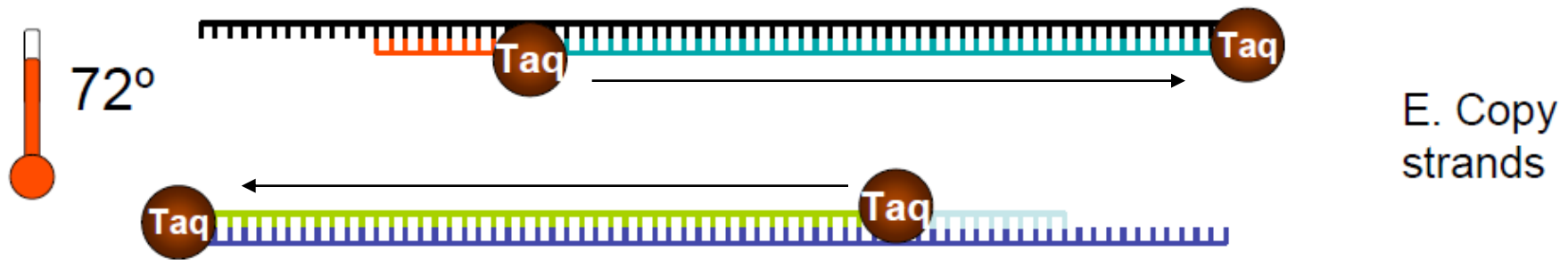
La scelta della **temperatura di annealing** è il fattore più critico per una buona riuscita della PCR:

- se troppo alta non si realizza l'annealing
- se troppo bassa l'annealing è aspecifico





PCR



PCR



50°

G. Anneal
primers



PCR



72°



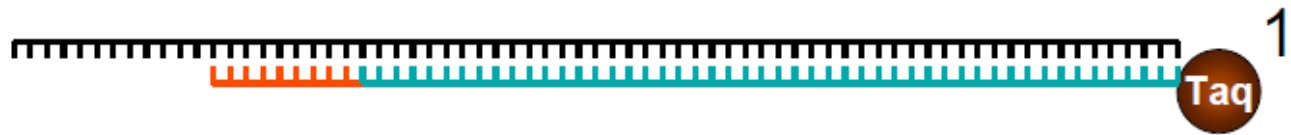
H.
Polymerase
binds



PCR



72°

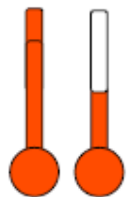


I. Copy strands

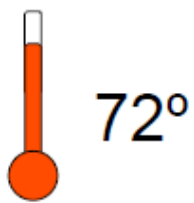


Second round of cDNA synthesis (8 strands)

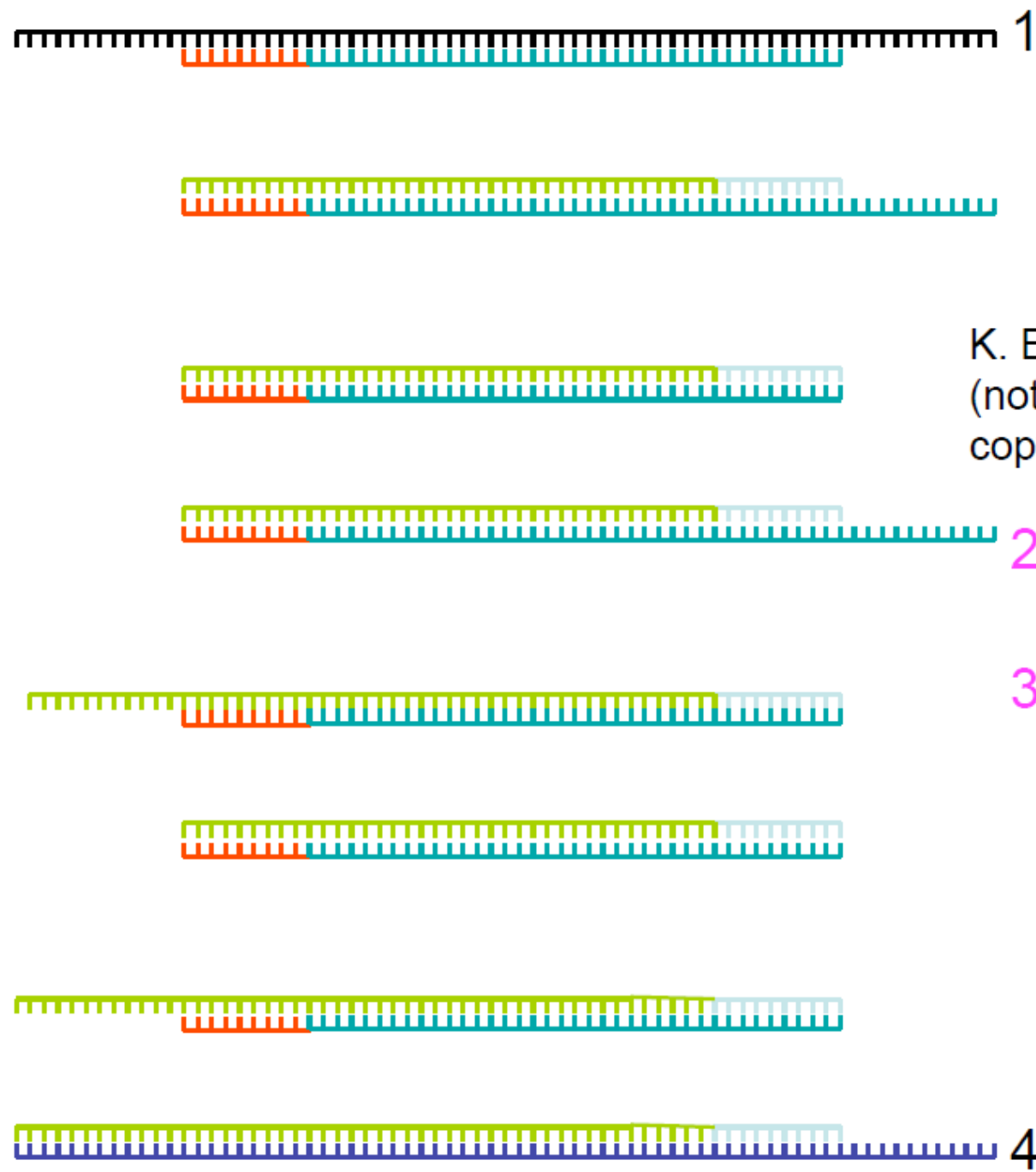




J.
Denature at 96°
Anneal primers
at 50°



72°



1

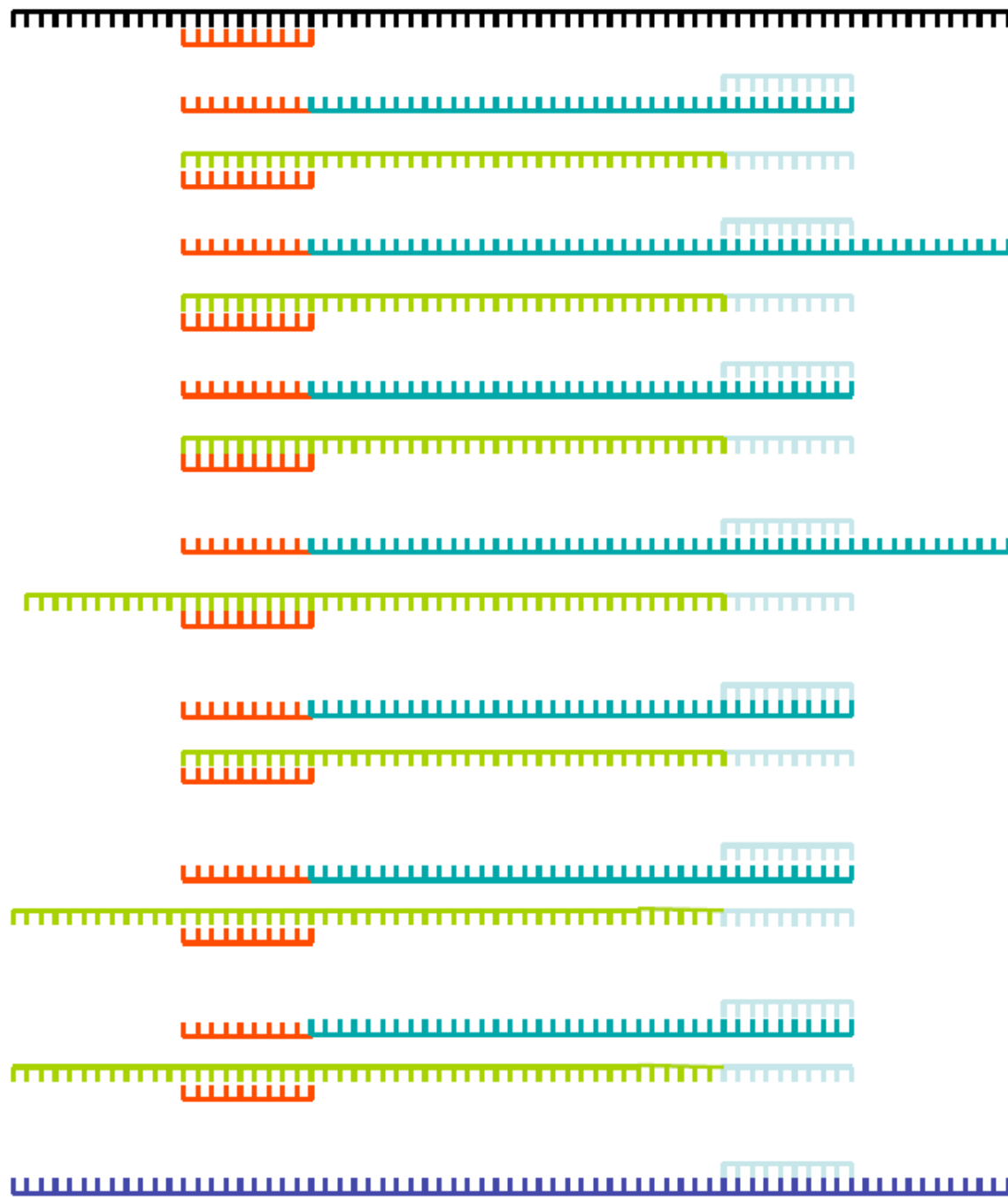
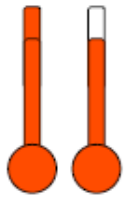
2

3

4

K. Bind polymerase (not shown) and copy strands

Third round of cDNA synthesis (16 strands)



1

L.
Denature at 96°
Anneal primers
at 50°

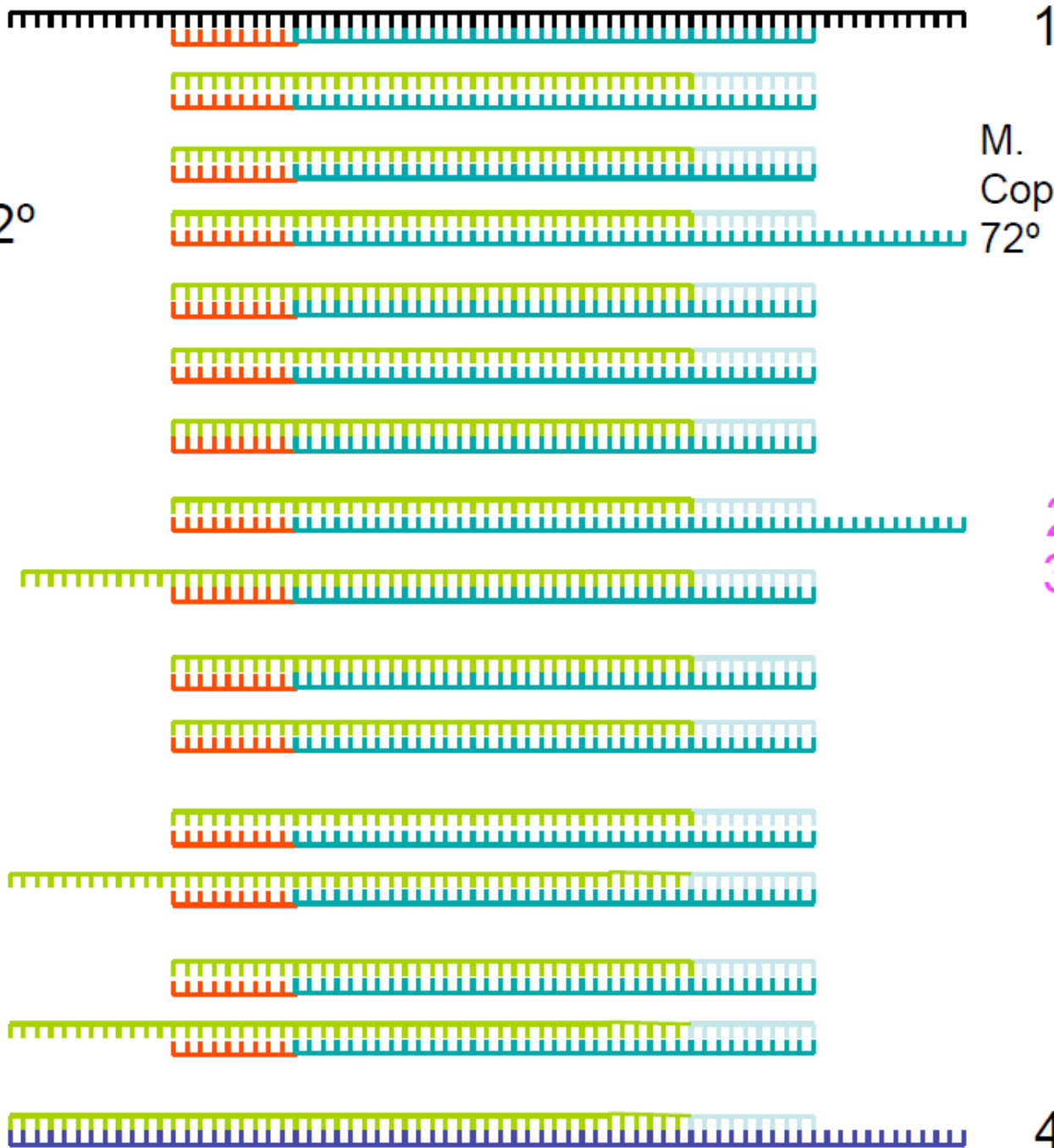
2

3

4



72°



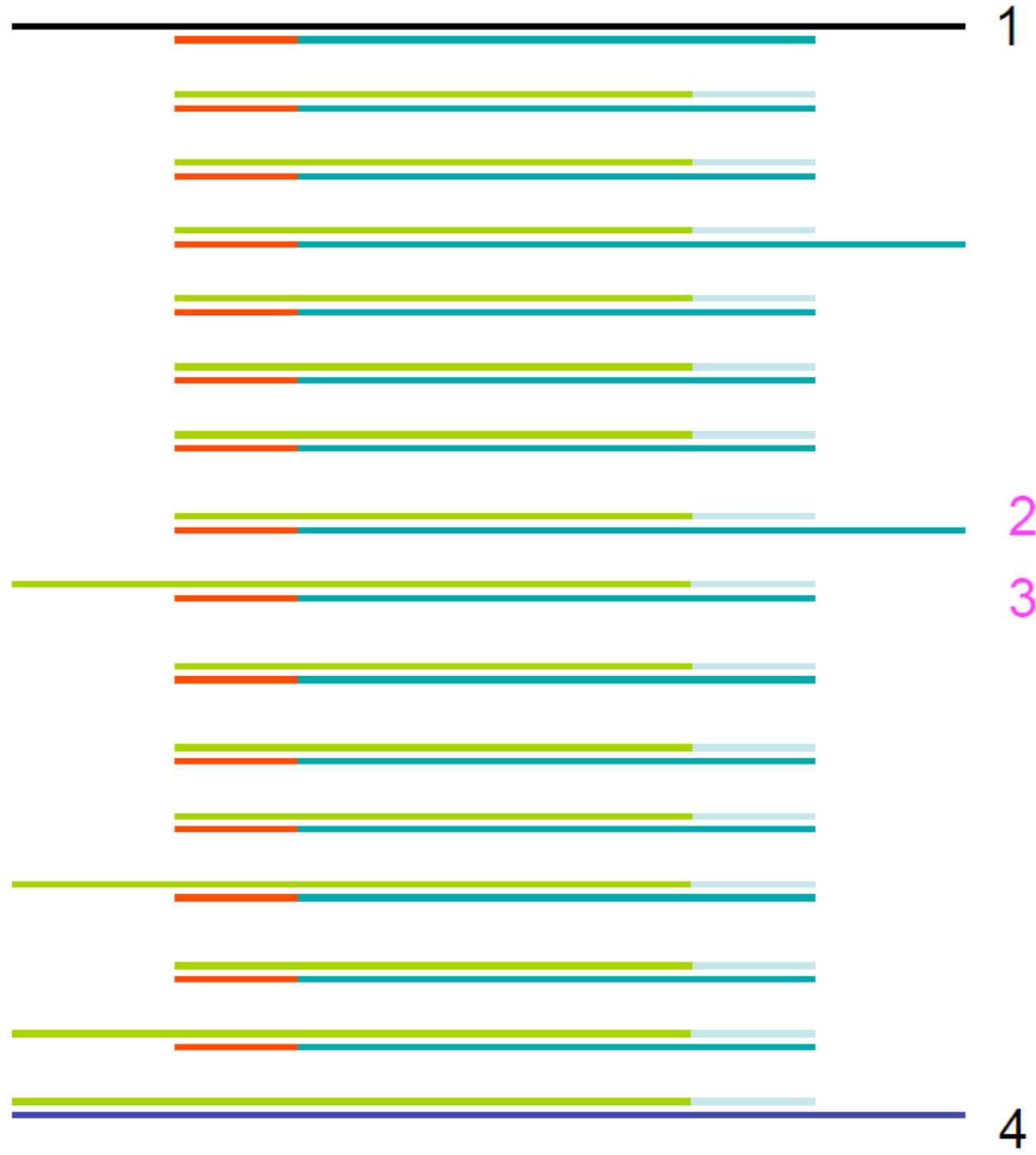
M.
Copy strands at
72°

Fourth
round of
cDNA
synthesis
(32
strands)

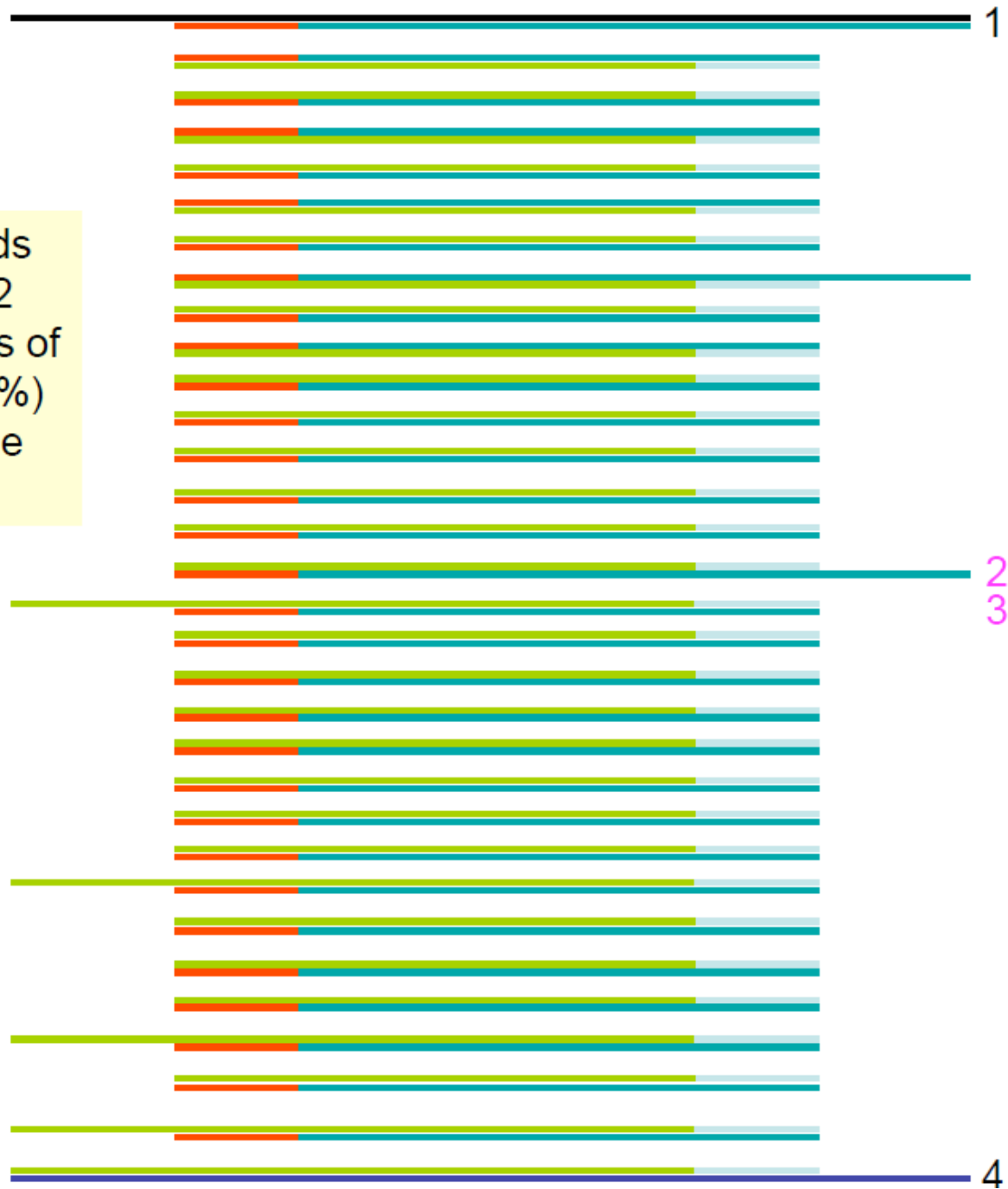
2
3

4

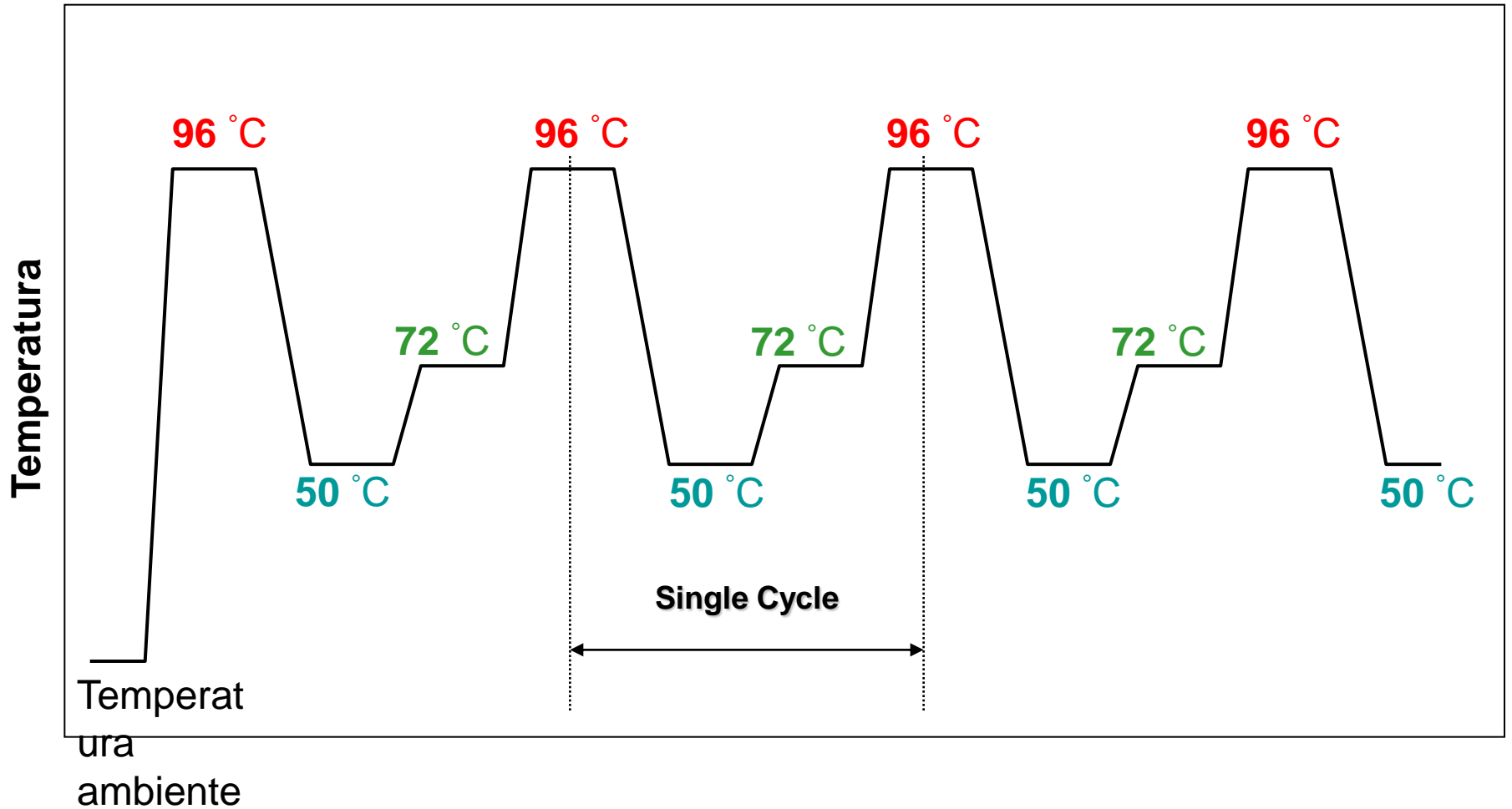
cDNA strands (32) are now shown as lines



After 5 rounds
there are 32
double strands of
which 24 (75%)
are are same
size



CICLO della PCR



■ Denaturazione

■ Annealing

■ Estensione

ELETTROFORESI

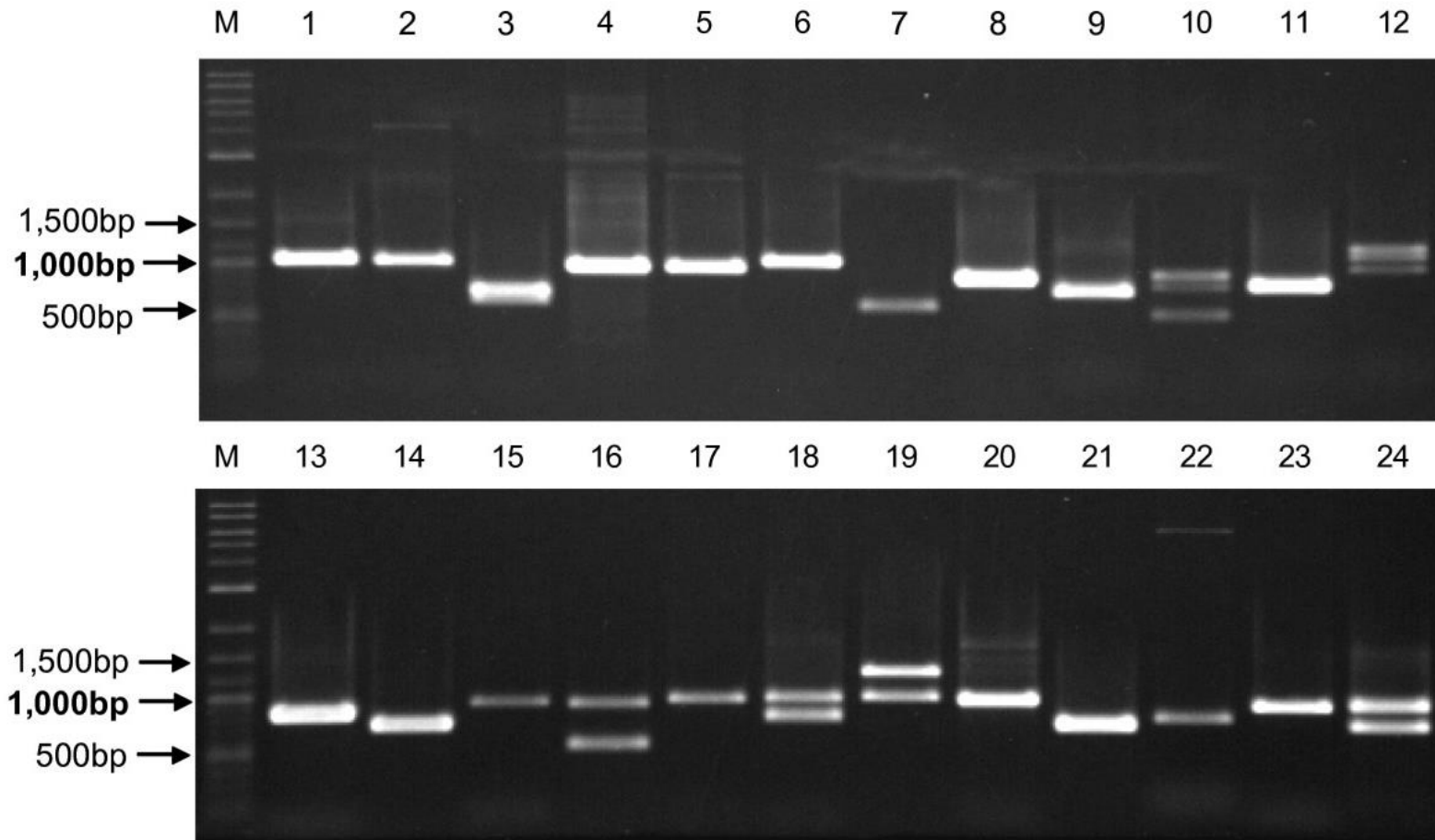
Tecnica che permette di visualizzare e separare acidi nucleici e proteine

Principio: i frammenti di DNA, sottoposti ad un campo elettrico, migrano attraverso un materiale selettivo (es. gel di agarosio) che li separa in base alle dimensioni (peso molecolare/lunghezza); frammenti più piccoli migrano attraverso le maglie del gel più velocemente, quelli più grandi si muovono più lentamente.



PCR e sue applicazioni (1)

- nelle tecniche di ingegneria genetica
- nella evoluzione molecolare
- nelle analisi di laboratorio
- nella diagnostica molecolare
- in ambito forense
- nelle scienze ambientali



PCR e sue applicazioni (2)

Numerosi varianti della PCR base trovano applicazioni, tra l'altro, nella ricerca di base, in diagnostica molecolare e in ambito forense.

- Consulenza Genetica e Ricerca;
- Ricerca mutazioni;
- Diagnosi prenatale malattie ereditarie;
- Determinazione del sesso;
- Determinazione dei portatori in famiglie a rischio e popolazioni;
- Marcatura sonde;
- Genetica delle popolazioni;
- Presenza e tipizzazione patogeni;
- Tipizzazione tumori e attivazione oncogeni;
- Monitoraggio e progressione tumori;
- Attecchimento trapianti;