

Friedrich Miescher
(1844-1895)



The laboratory located in the vaults of an old castle
where Miescher isolated nuclein (1879)

1868. Miescher isola una sostanza sconosciuta **ricca in fosforo** da nuclei di linfociti e la denomina **nucleina**. Successivamente (1920) viene dedotta la composizione chimica: **deossiribosio, fosfato e molecole basiche aromatiche contenenti azoto (adenina, citosina, guanina, timina)** nonché le proprietà acide, da cui il nome **acido deossiribonucleico o DNA**.

1928. Griffith scopre che la miscela di un ceppo di pneumococco non virulento (R) vivo con un ceppo virulento (S) ucciso dal calore induce l'infezione nel topo e porta allo sviluppo di batteri virulenti, mentre ciascuna delle due componenti da sola non lo fa.

1944. Avery e colleghi dimostrano che la sostanza del ceppo ucciso responsabile del fenomeno è il **DNA**, che quindi risulta essere chiaramente la sostanza che contiene l'**informazione genetica**

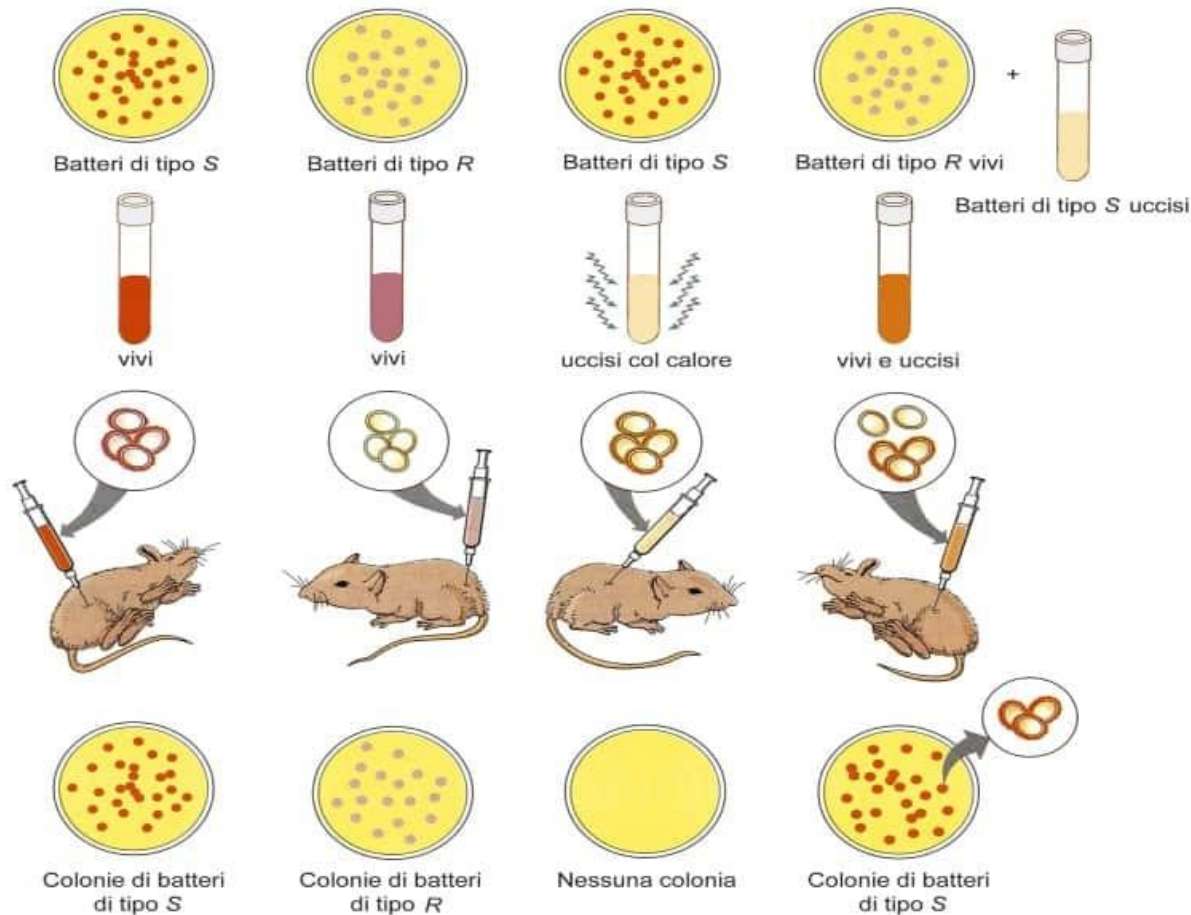
1950. Chargaff scopre che in tutti i DNA, salvo qualcuno di origine virale, la quantità in moli di **adenina** è uguale a quella di **timina** e quella di **guanina** è uguale a quella di **citosina** (**A=T, C=G**).

1952. Hershey e Chase, infettando ***E. coli*** con il **fago T2**, marcato con zolfo e fosforo radioattivi, dimostrano che lo zolfo, contenuto nella componente proteica, non entra nella cellula batterica, mentre il fosforo, contenuto nel DNA, sì. Inoltre lo zolfo radioattivo risulta sostanzialmente assente nei fagi di nuova generazione, mentre il fosforo radioattivo vi passa in buona misura.

1953. Watson e Crick, interpretando diffratogrammi a raggi X da fibra di DNA, propongono la struttura a **doppia elica** ponendo le basi per la comprensione del funzionamento dei geni a livello molecolare.

Esperimento di "trasformazione" batterica: Griffith

Pneumococco (*Streptococcus pneumoniae*)



Un principio "trasformante" converte il ceppo R in S

Oswald Avery at work in the laboratory, around 1930



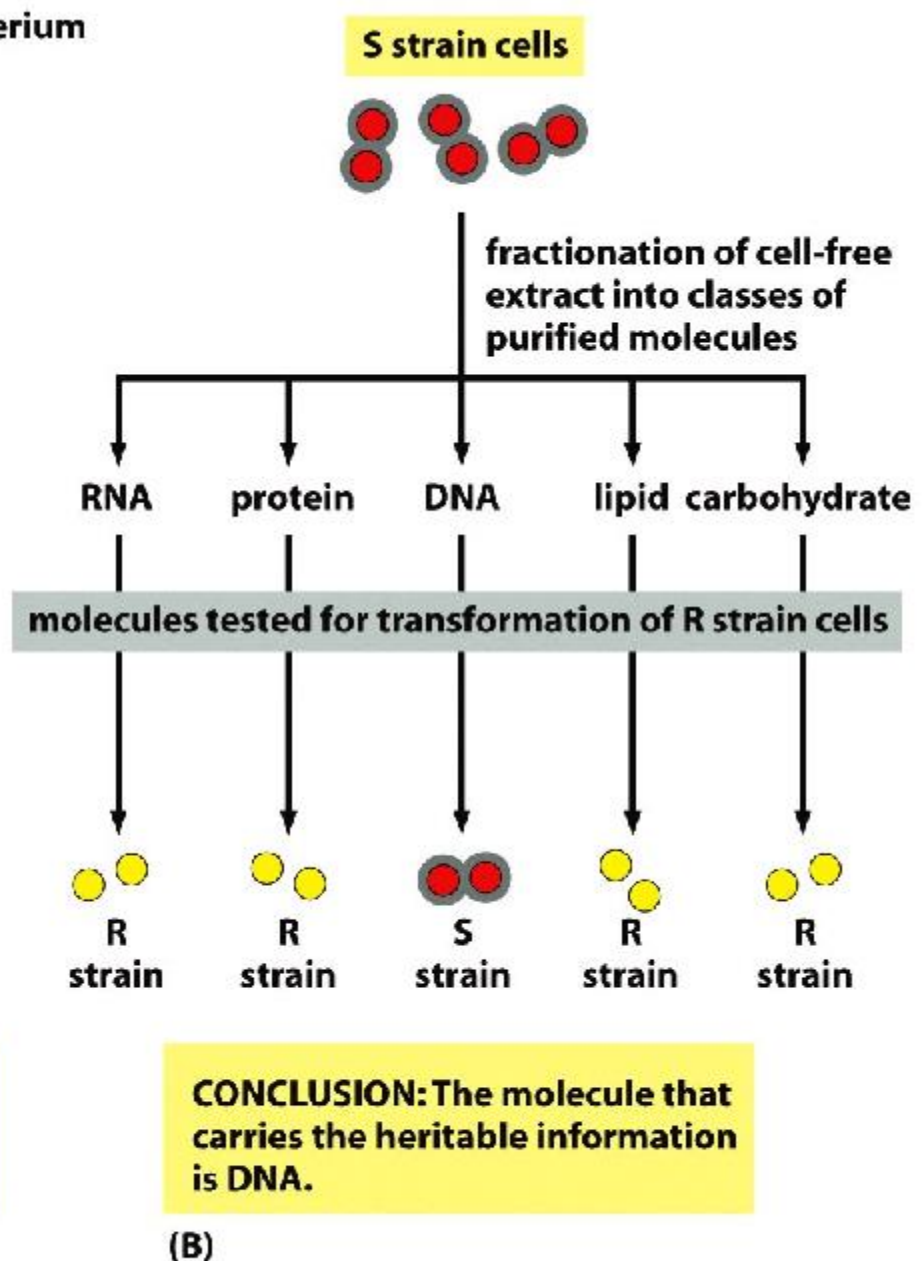
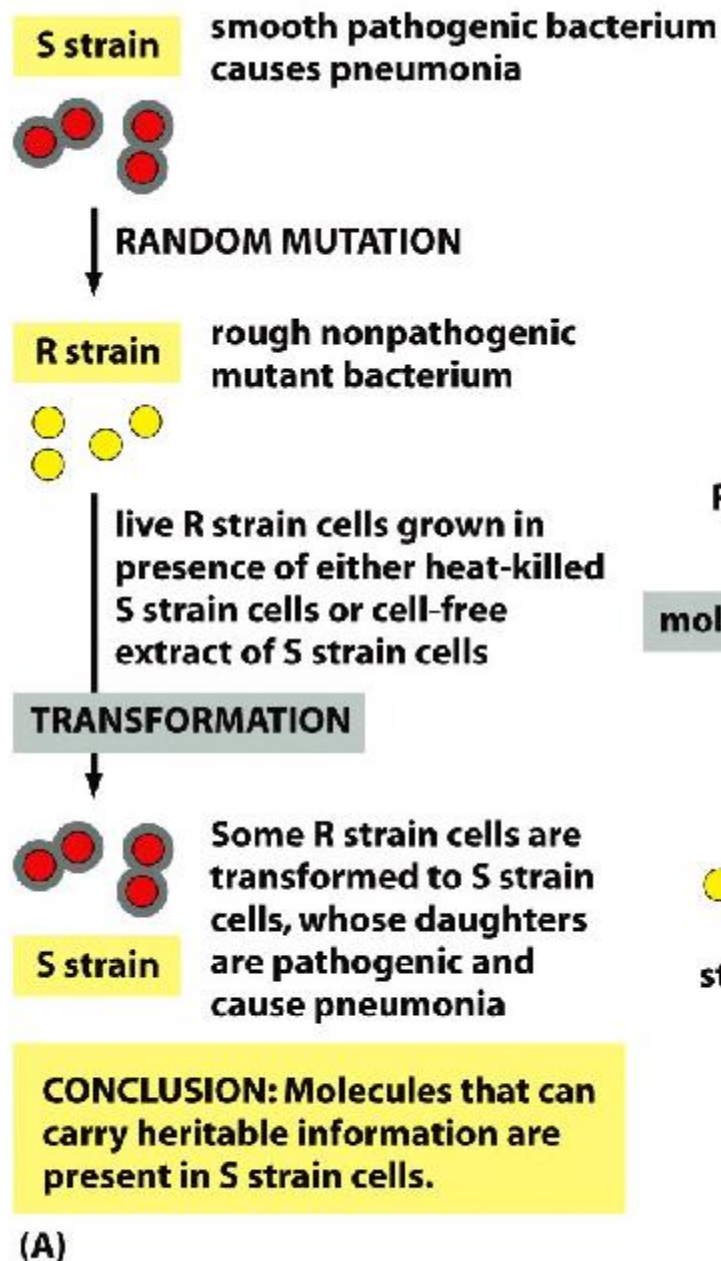
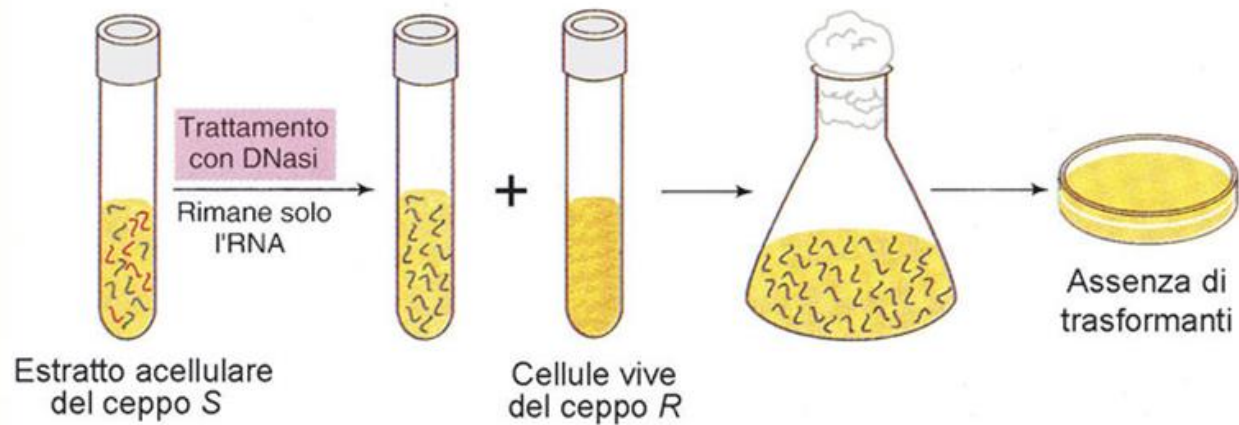
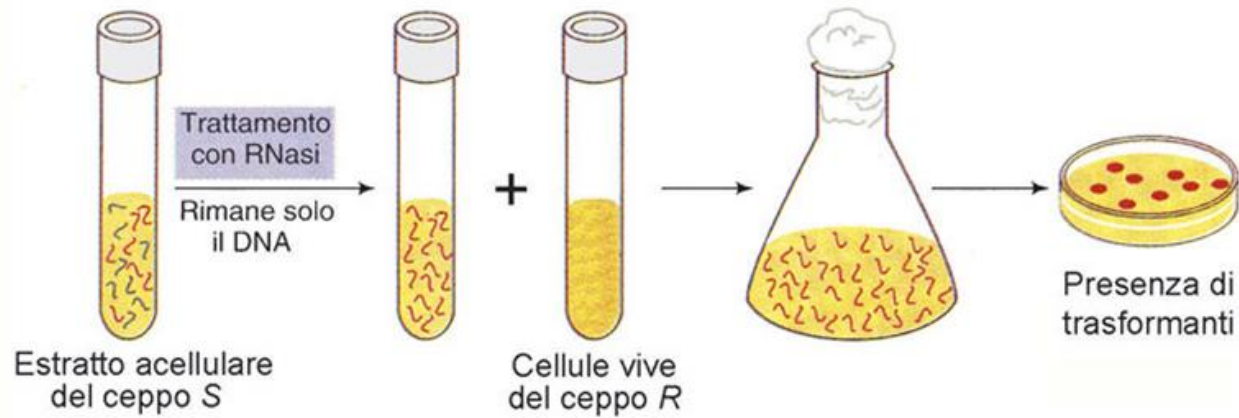


Figure 4-2 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)





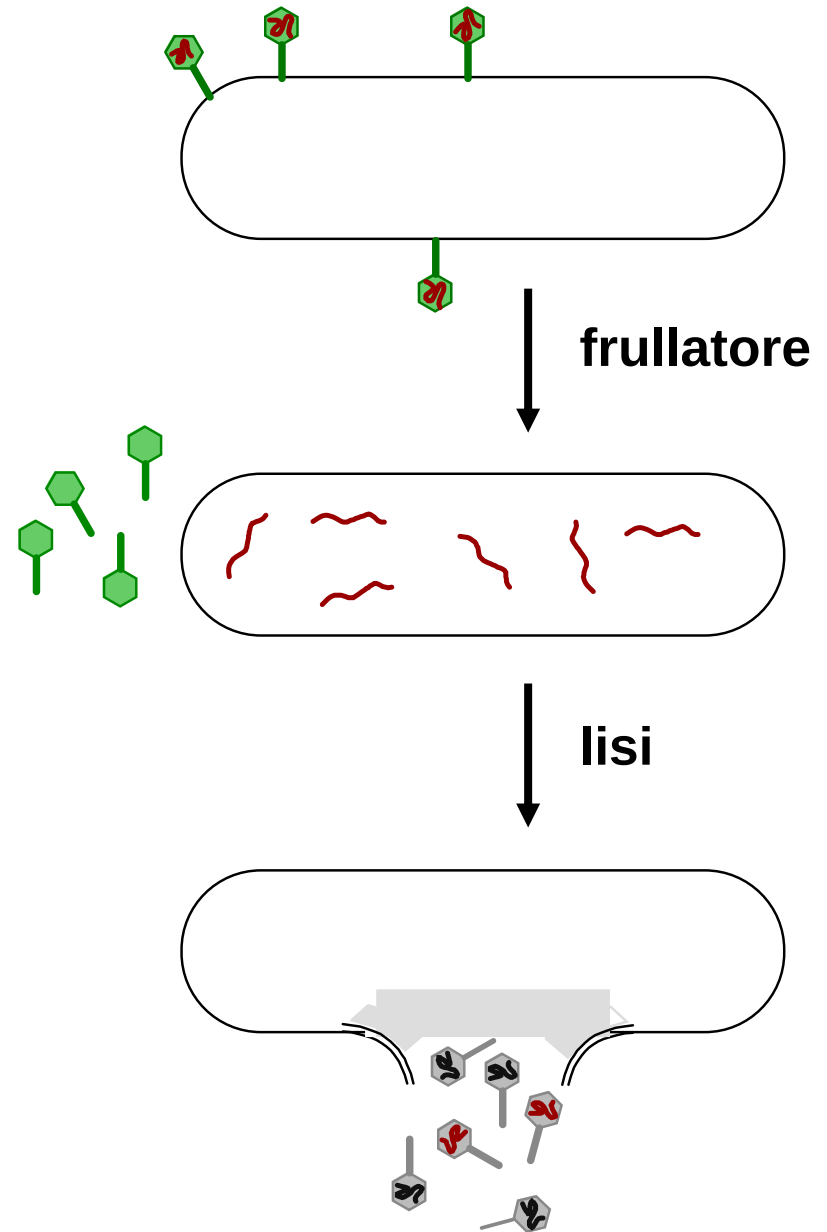
Alfred Hershey and Martha Chase (1953)

L'esperimento - Hershey e Chase, 1952

Fagi marcati con ^{32}P nel DNA
e con ^{35}S nelle proteine
infettano i batteri

I capsidi fagici contengono
l'80 % del ^{35}S mentre
i batteri infettati contengono
il 70 % del ^{32}P

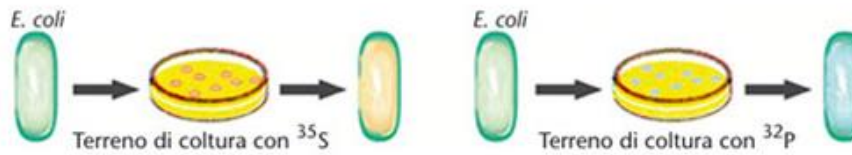
La progenie fagica
contiene il 30 % del ^{32}P
e < 1% del ^{35}S



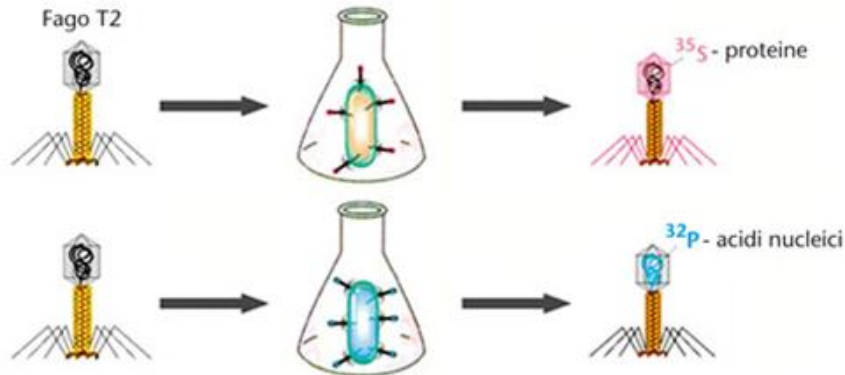
^{32}P viene trovato nei batteri e nella progenie di fagi, mentre ^{35}S non si trova nei batteri ma nei capsidi vuoti dei fagi (ghosts).

Da questo esperimento si concluse che il DNA del fago iniettato nel batterio porta l'informazione genetica per la nuova progenie di virus.

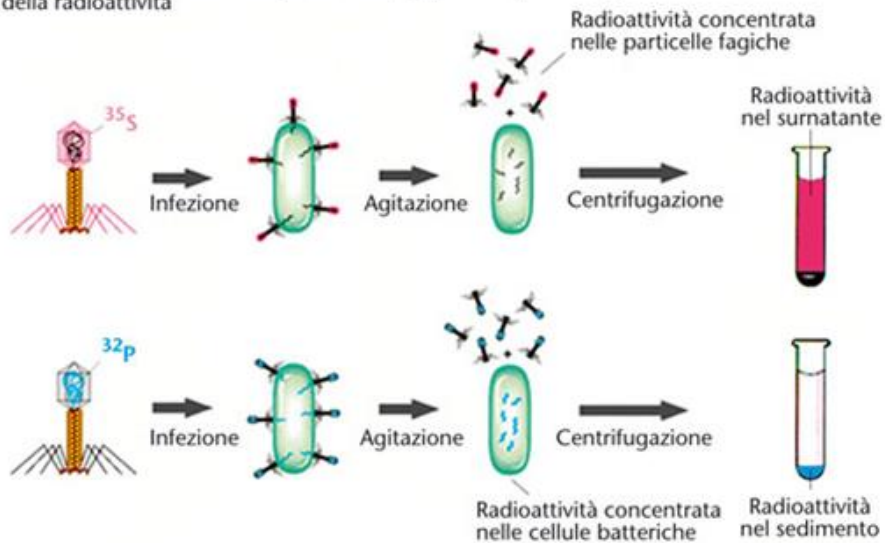
Moltiplicazione del batterio *E. coli* in presenza di radioisotopi



Infezione dei batteri radioattivi con i fagi



Infezione dei batteri con i fagi radioattivi, agitazione, centrifugazione e misurazione della radioattività



Erwin Chargaff

Per primo misurò accuratamente la percentuale dei quattro nucleotidi nel DNA



Composizione in basi del DNA di varie specie

Organismo	A	G	C	T	A/T	G/C	G+C	Py/Pu
Escherichia coli	26.0	24.9	25.2	23.9	1.08	0.99	50.1	1.04
Mycobact. tuberc.	15.1	34.9	35.4	14.6	1.03	0.99	70.3	1.00
Lievito	31.7	18.3	17.4	32.6	0.97	1.05	35.7	1.00
Bue	29.0	21.2	21.2	28.7	1.01	1.00	42.4	1.01
Maiale	29.8	20.7	20.7	29.1	1.02	1.00	41.4	1.01
Uomo	30.4	19.9	19.9	30.1	1.01	1.00	39.8	1.01

OVERVIEW OF THE HISTORY OF DNA RESEARCH



1869

Friedrich
Miescher



1878

Albrecht
Kossel



1919

Phoebus
Levene



1928

Frederick
Griffith



1943

Oswald
Avery



1950

Erwin
Chargaff



1952

Martha Chase
Alfred Hershey



1952

Rosalind
Franklin



1952

Maurice
Wilkins



1953

James Watson
Francis Crick

Maurice Wilkins
(1916 - 2004)



Watson, Crick, Wilkins: Nobel 1962

Francis Crick
(1916 - 2004)

James Watson
(1928 -)



Linus Pauling
(1901 - 1994)



Rosalind Franklin
(1920 - 1958)

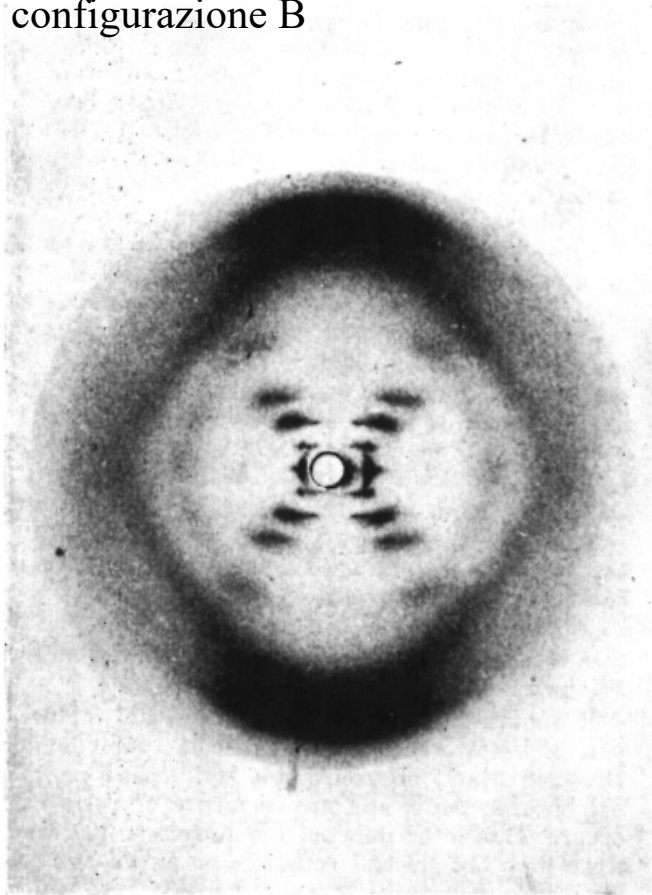


Pauling: Nobel 1954
(struttura proteine)

Franklin's X-ray
crystallographic images of
DNA enabled Watson to
deduce that DNA was helical

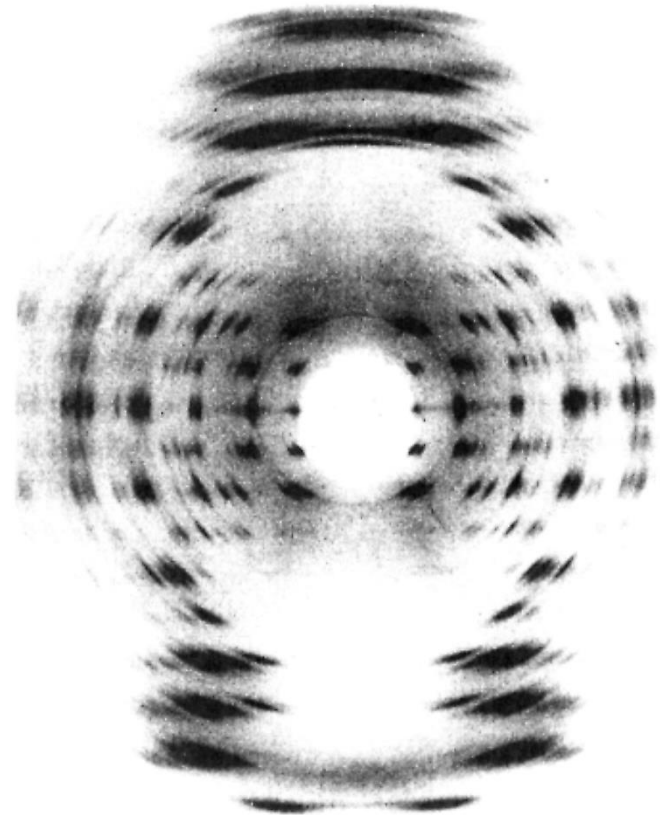
Diffrazione dei raggi X di fibre di DNA

configurazione B



Franklin R.E. & Gosling R., 1953

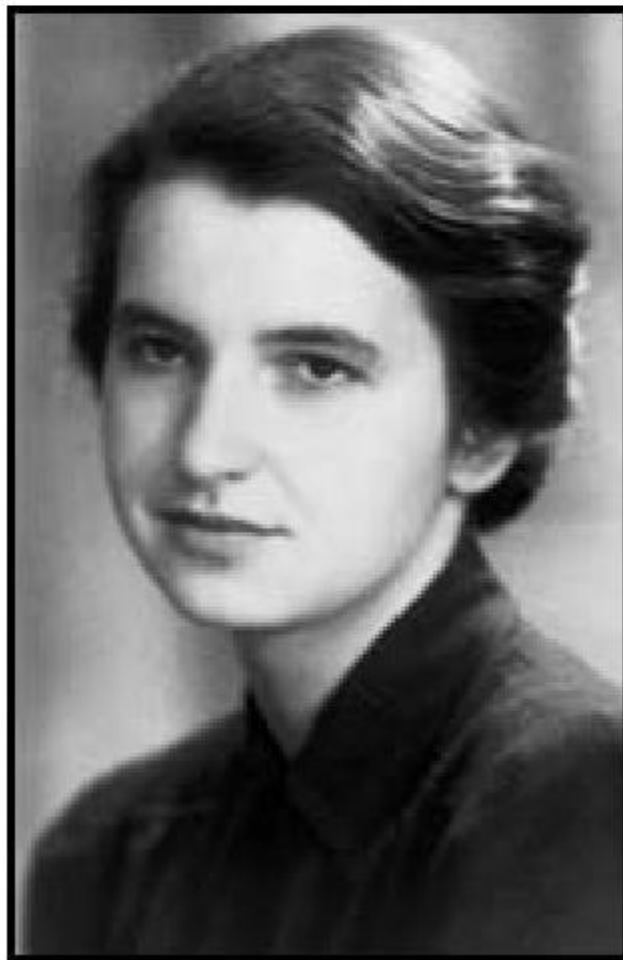
configurazione A



Wilkins M.H.F., 1956

ROSALIND FRANKLIN

1920-1958



si iscrive, nel 1938, a 18 anni al Newnham College di Cambridge.

si laurea in chimica fisica nel 1941.

1942 lavora presso l'Associazione Britannica di Ricerca per l'utilizzazione del Carbone.

■ *conseguì il dottorato in fisica e chimica nel 1945.*

■ *nel 1946 si trasferì a Parigi presso i Laboratoire Central des Services Chimiques de L'Etat, per specializzarsi nella tecnica della diffrazione ai raggi X.*



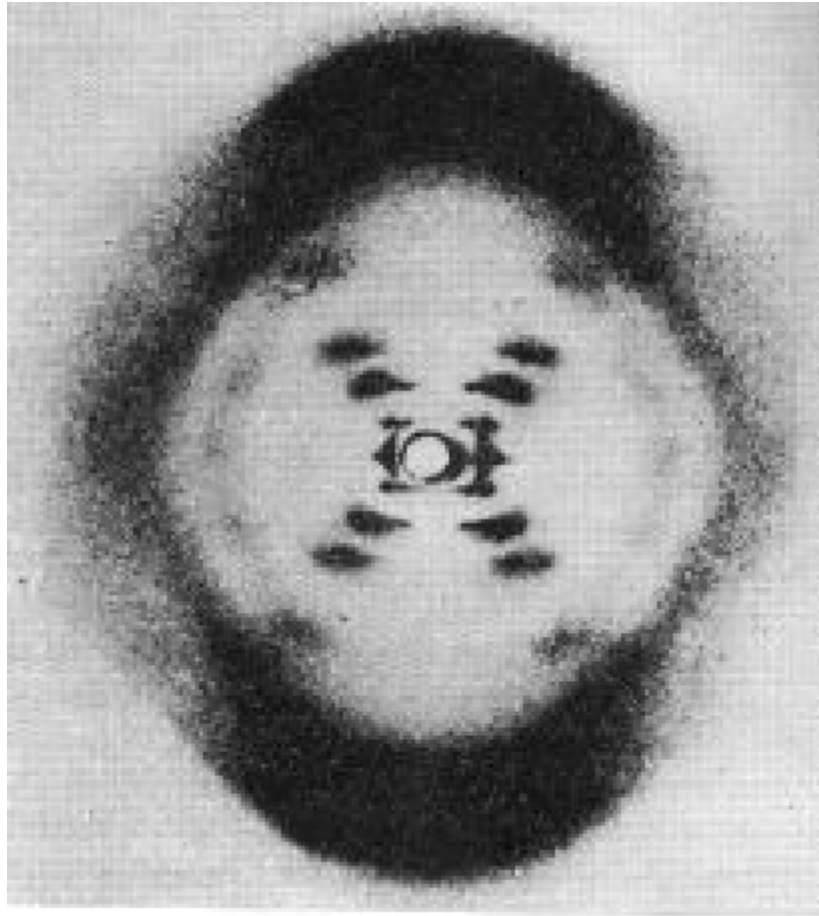
THE KING'S COLLEGE



Nel 1951, per le sue competenze, venne invitata da John Randall al Dipartimento di biofisica del King's College di Londra.

LA RICERCA SUL DNA

Nel King's College erano iniziate le ricerche sul DNA, acido desossiribonucleico, la componente principale dei cromosomi e quindi dei geni. In poco tempo, Rosalind mise a punto una tecnica innovativa che utilizzava i raggi X per fotografare i costituenti di tutti i materiali viventi e non viventi.



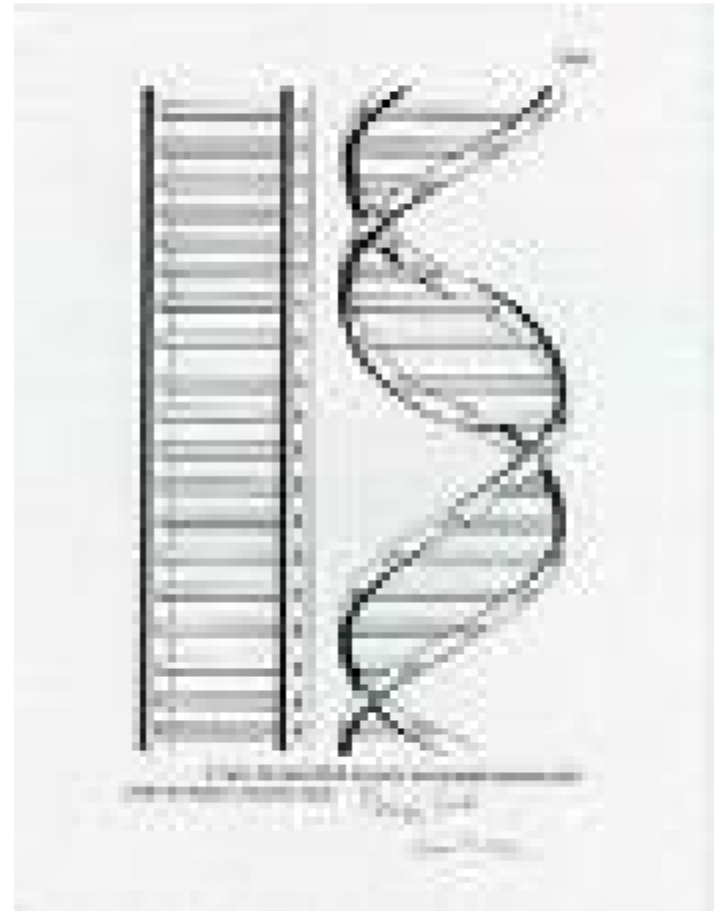
Il dispositivo consisteva in una microcamera capace di produrre fotografie ad alta definizione dei singoli filamenti del DNA. La Franklin riuscì dunque a fare la prima fotografia dello scheletro del Dna...

LA RICERCA SCIPPATA

Fu quella fotografia, insieme ai dati da lei elaborati, che permise ai suoi principali rivali, James Watson e Francis Crick, venuti segretamente in possesso del materiale, di pubblicare nel 1953 la dettagliata descrizione della molecola.

Nessun riconoscimento fu invece assegnato a Rosalind.

Nell'autunno del 1956, scoprì di avere il cancro alle ovaie, ma rifiutò di abbandonare il suo lavoro di ricerca. Morì il 16 aprile del 1958, all'età di 37 anni, forse per le eccessive esposizioni ai raggi X.



A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid
J. D. Watson and F. H. C. Crick

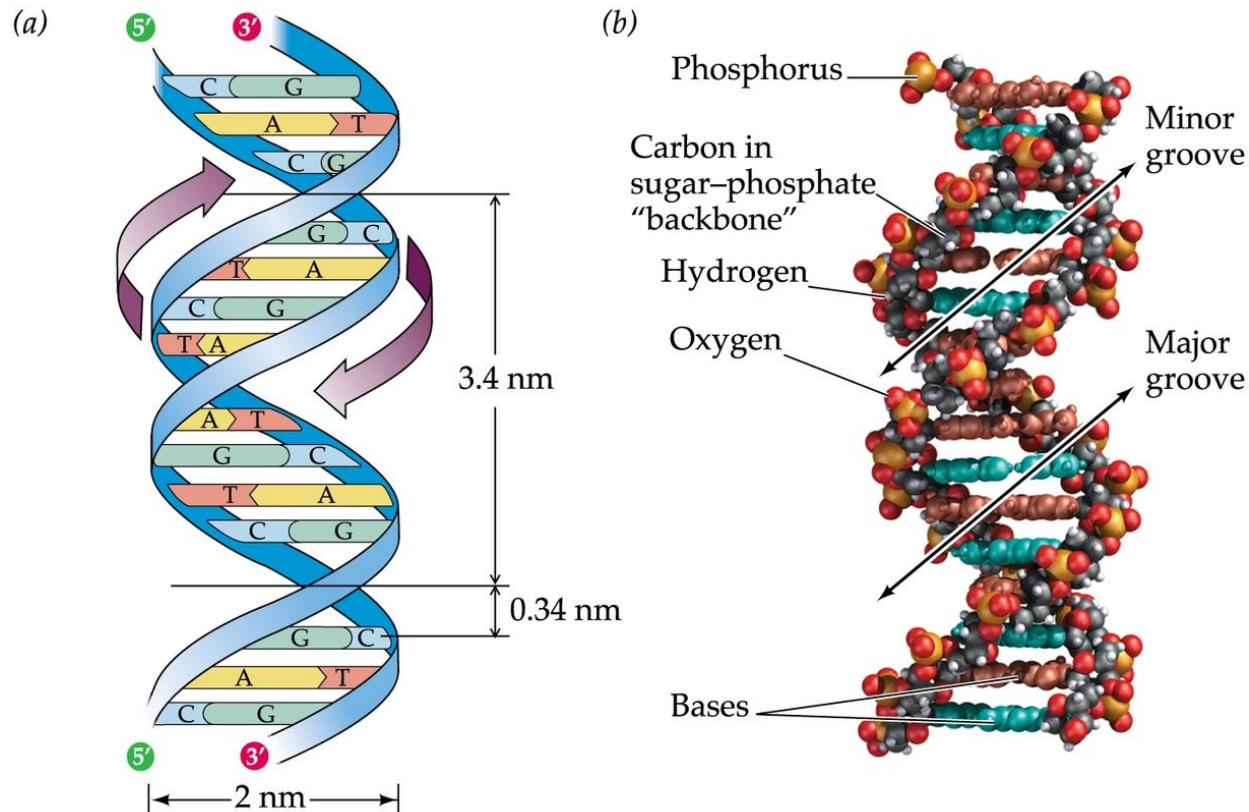
April 25, 1953 (2), *Nature* (3), 171, 737-738

We wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.).
This structure has novel features which are of considerable biological interest.

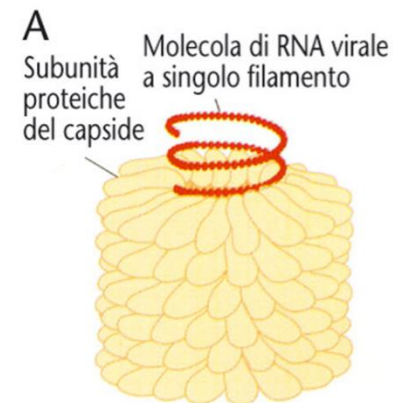
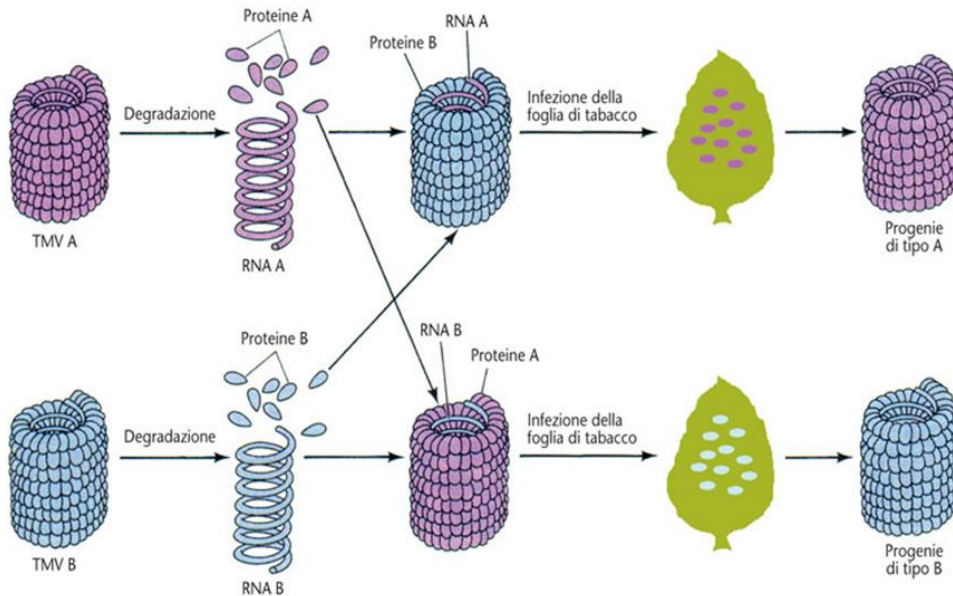
.....

It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated
immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.

Conclusion: DNA is a helical structure with distinctive regularities, 0.34 nm e 3.4 nm.



Esperimenti di Gierer e Schramm e Fraenkel-Conrat e Singer: alcuni virus hanno RNA come materiale genetico (1956-57).



II DNA

Struttura e proprietà chimico-fisiche

GLI ACIDI NUCLEICI

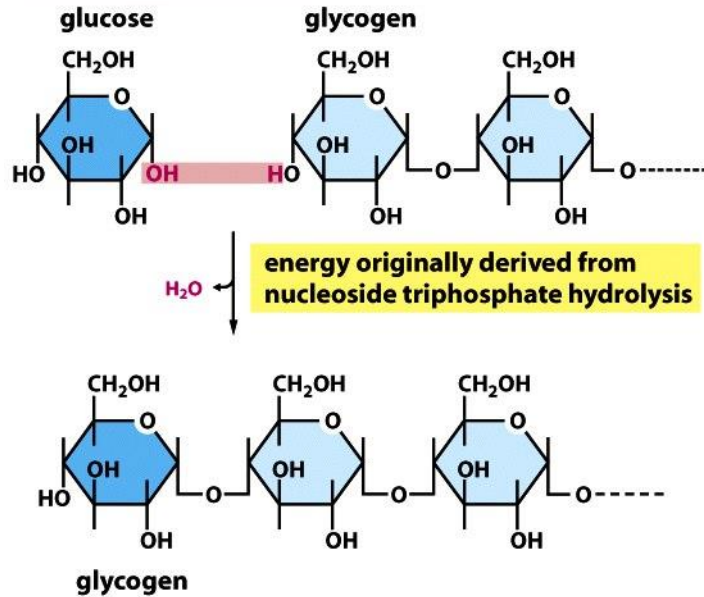
DNA acido deossi-ribonucleico

(adenina, timina, guanina, citosina, deossi-ribosio, acido fosforico)

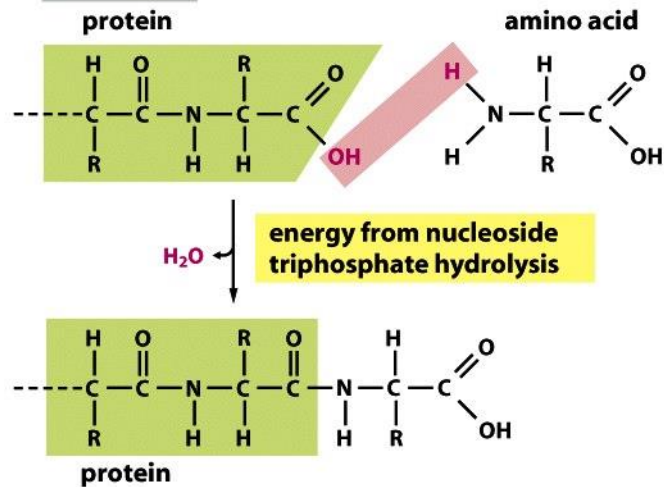
RNA acido ribonucleico

(adenina, uracile, guanina, citosina, ribosio, acido fosforico)

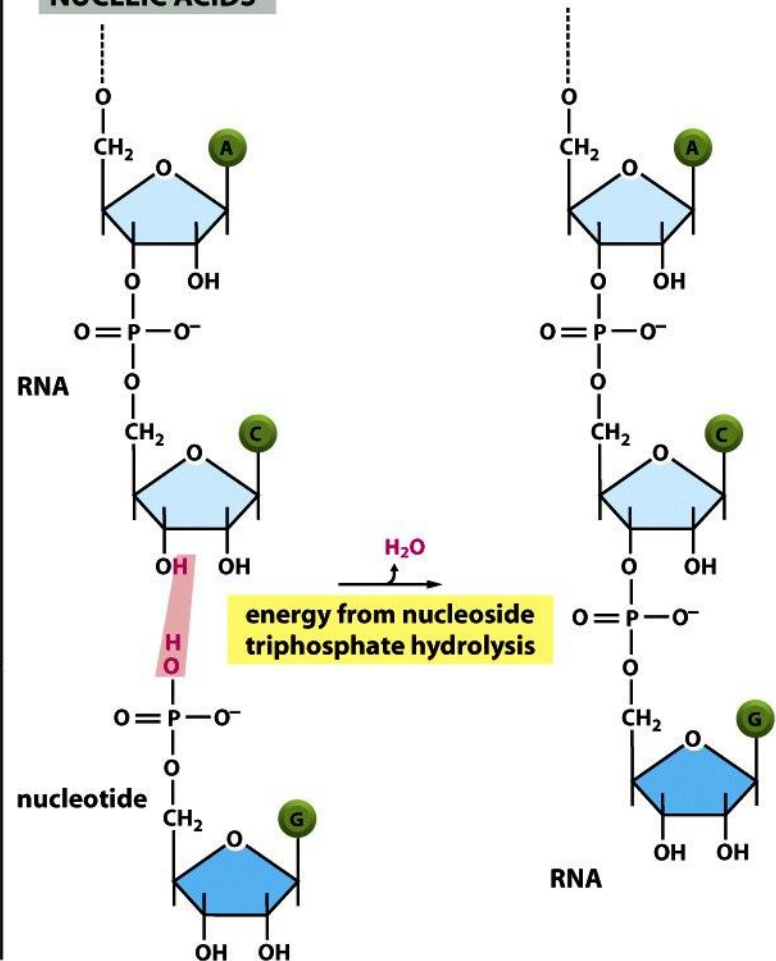
POLYSACCHARIDES



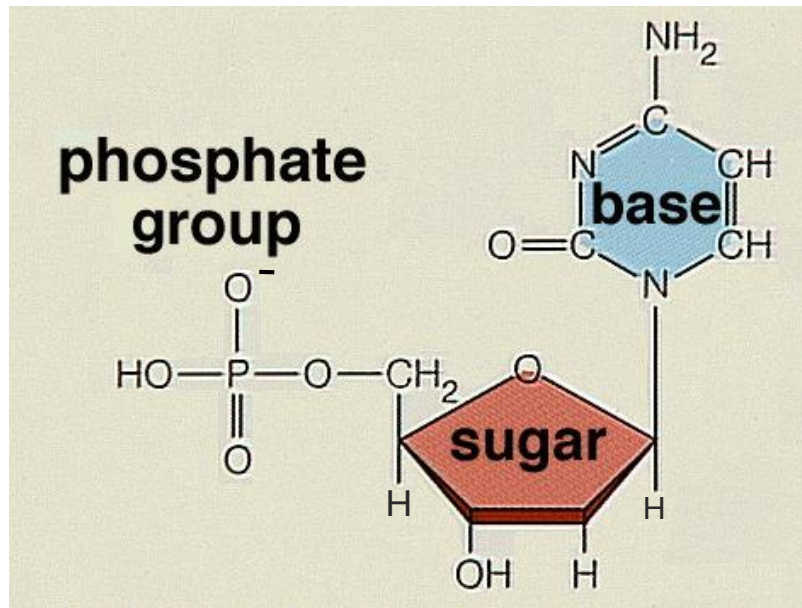
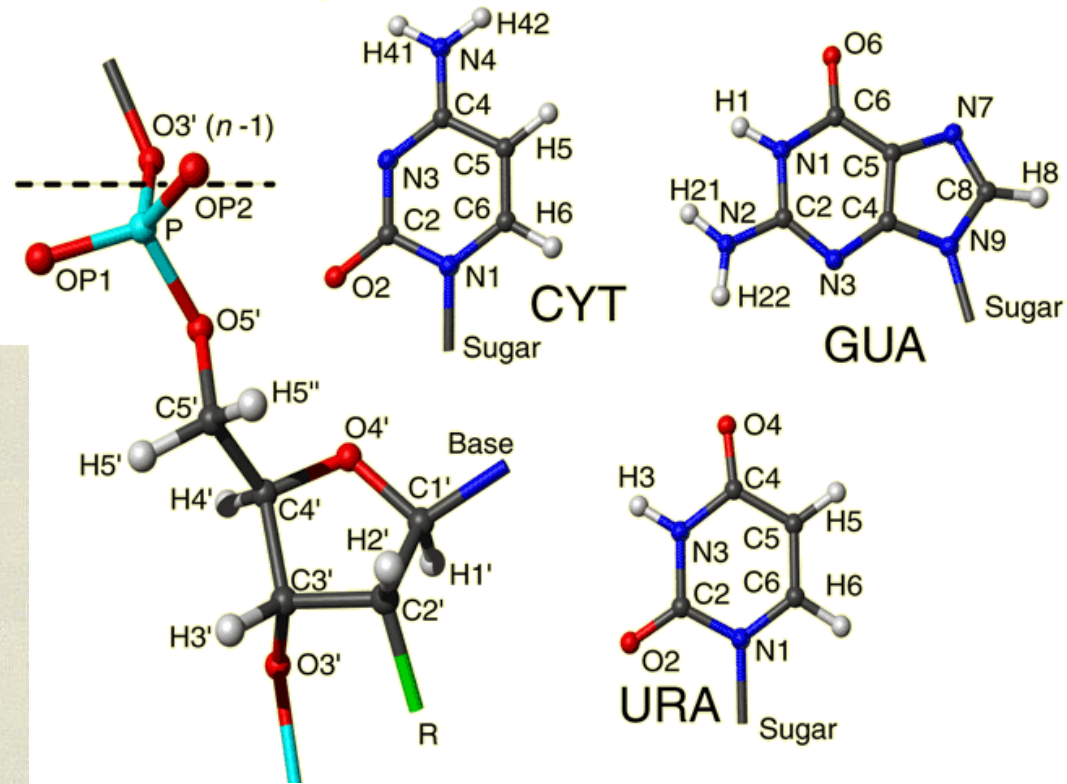
PROTEINS



NUCLEIC ACIDS



Il composto di deossiribosio e base azotata privo del fosfato prende il nome di nucleoside.



The diagram illustrates a segment of a DNA molecule's sugar-phosphate backbone. A light green wavy line represents the phosphate groups, which connect the 5' carbon of one deoxyribose sugar to the 3' carbon of the next. Four nucleotides are shown, each consisting of a nitrogenous base, a deoxyribose sugar, and a phosphate group. The bases are color-coded and labeled: Thymine (pink), Guanine (green), Cytosine (blue), and Adenine (orange). The sugar is a five-membered ring with a hydroxyl group at the 3' position and a phosphate group at the 5' position. The phosphate group is shown as a phosphorus atom double-bonded to one oxygen and single-bonded to three others, one of which is part of the sugar-phosphate linkage. The bases are attached to the 1' carbon of the sugar. The sequence of bases shown is Thymine, Guanine, Cytosine, and Adenine. The diagram is labeled 'etc.' at both ends, indicating it is a continuous chain.

etc.

CC1=CNC(=O)NC1=O Thymine

NC1=NC2=C(N1)N=CN=C2=O Guanine

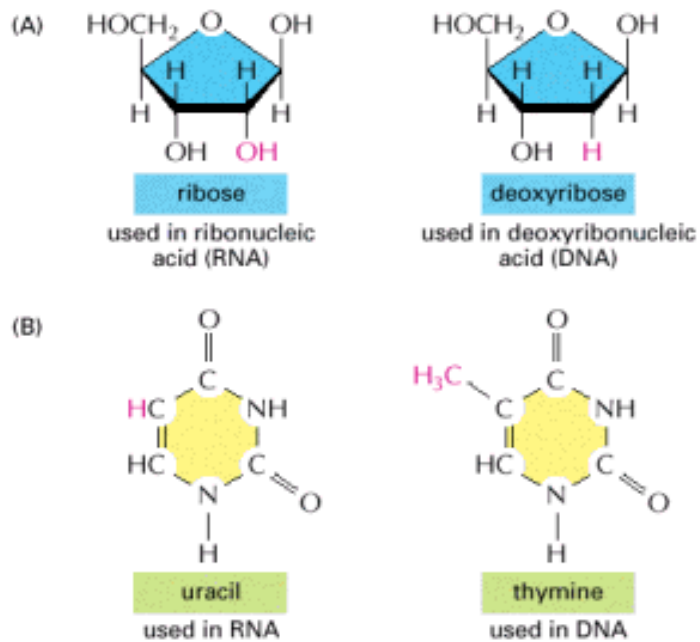
NC1=NC(=O)NC=C1 Cytosine

NC1=NC=NC2=C1N=CN2 Adenine

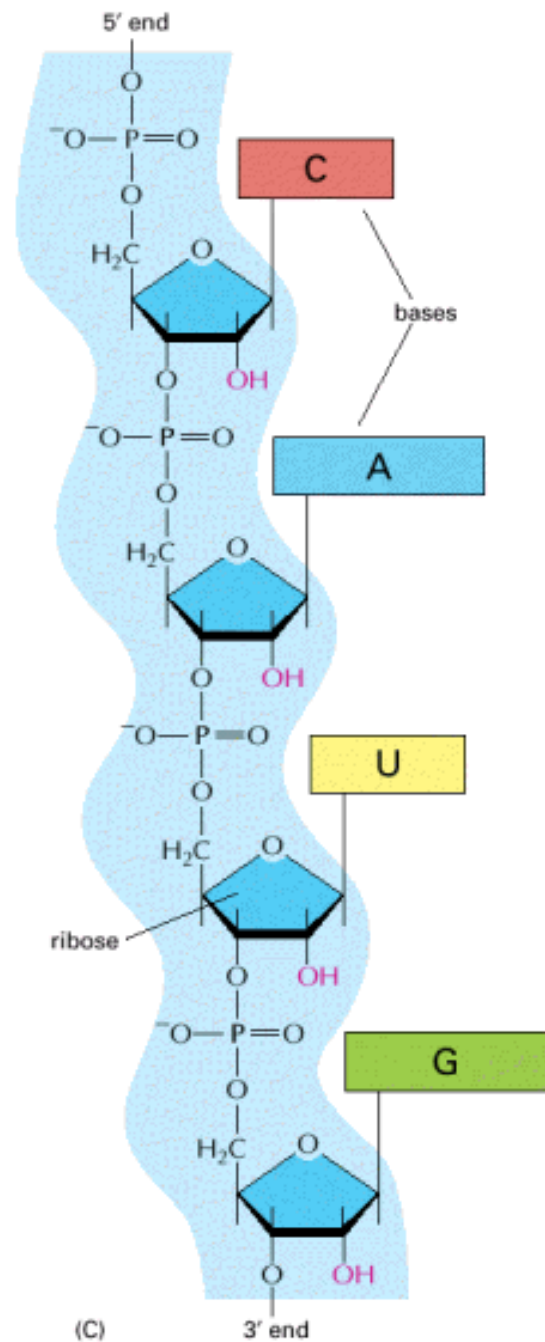
etc.

Figure 28-18. The conformation of a nucleotide is determined by the seven indicated torsional angles.

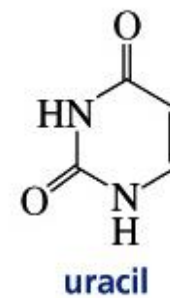
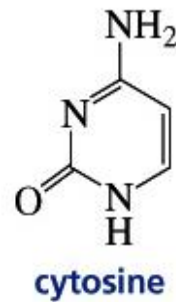
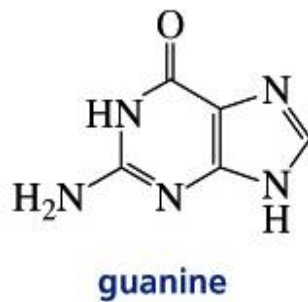
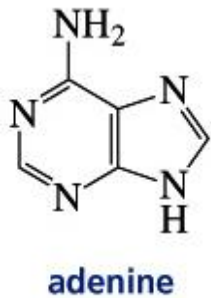
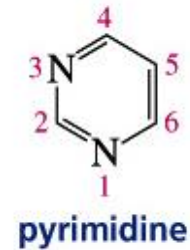
In un'unità ripetitiva, da fosforo a fosforo, ci sono sei singoli legami covalenti, dotati quindi di una certa libertà di rotazione, a cui si aggiunge il legame N-glicosidico, pure singolo. Ciò rende possibile al DNA di assumere più conformazioni.



Un segmento di catena di RNA e le sue fondamentali differenze chimiche dal DNA: il ribosio al posto del deossiribosio, l'uracile al posto della timina.

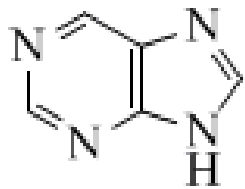


LE BASI AZOTATE

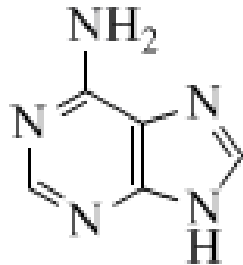


Adenina, guanina, citosina e timina si trovano nel DNA

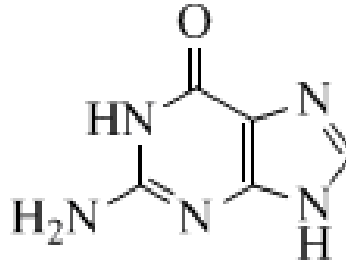
Adenina, guanina, citosina e uracile si trovano nell' RNA



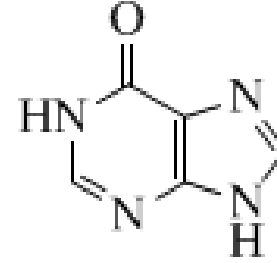
purine
1



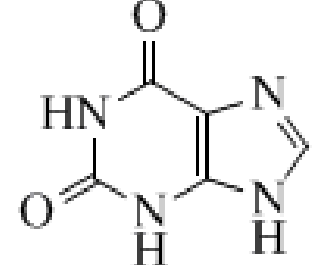
adenine
2



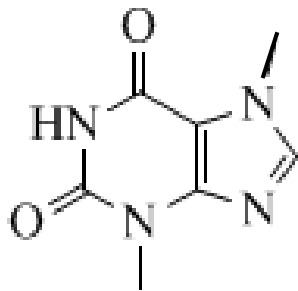
guanine
3



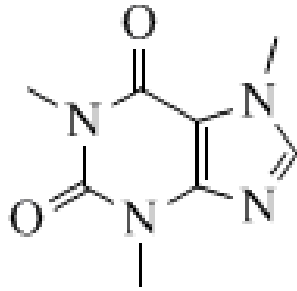
hypoxanthine
4



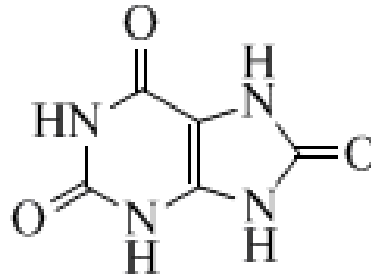
xanthine
5



theobromine
6



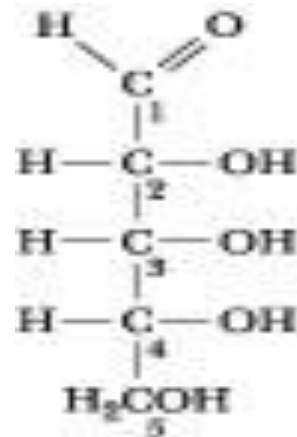
caffeine
7



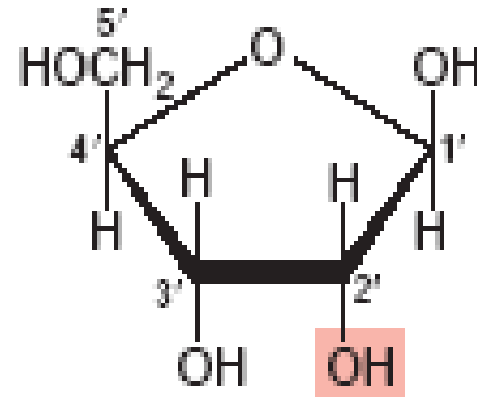
uric acid
8

Vari derivati della purina
si trovano in natura,
ma solo alcuni negli
acidi nucleici

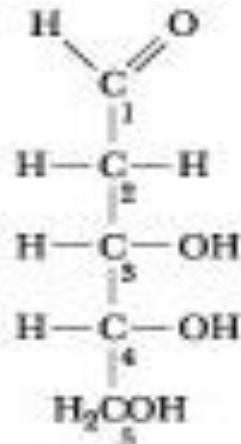
IL MONOSACCARIDE



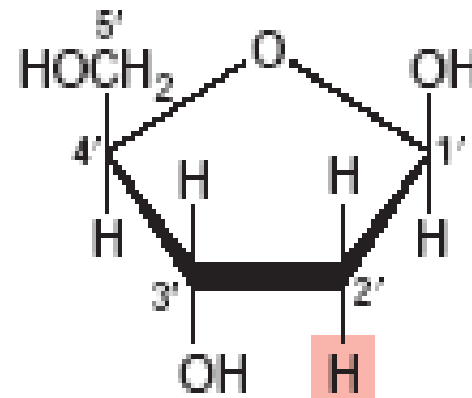
D-Ribose



Ribose



2-Deoxyribose



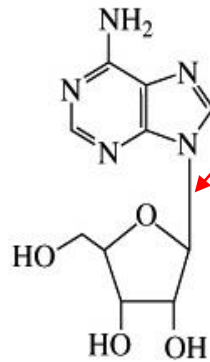
2-Deoxyribose

I NUCLEOSIDI = BASE + ZUCCHERO

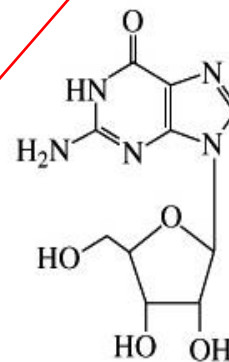
Legame β -glicosidico

Ribosio

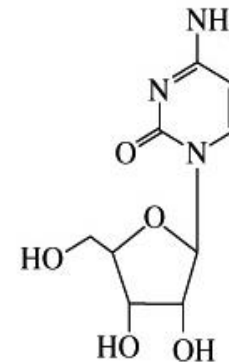
Ribonucleosidi



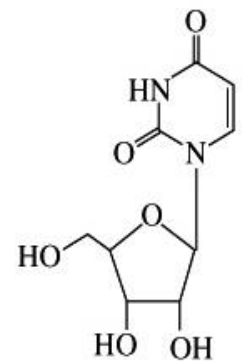
adenosine



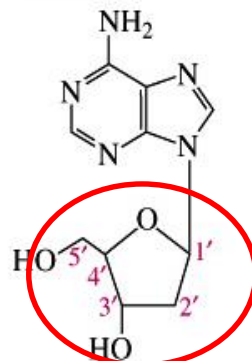
guanosine



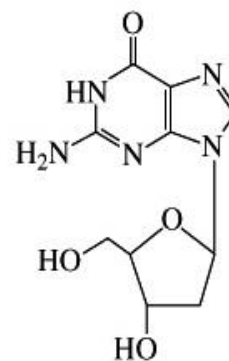
cytidine



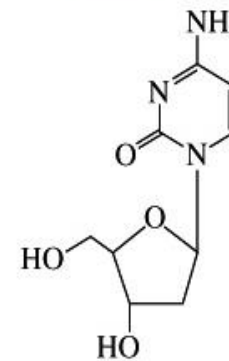
uridine



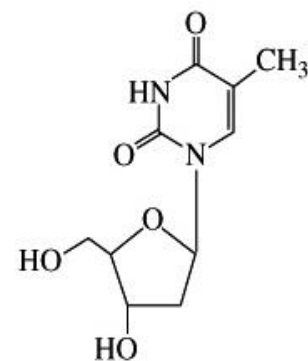
2'-deoxyadenosine



2'-deoxyguanosine



2'-deoxycytidine



thymidine

Desossiribosio

Deossi-ribonucleosidi

Basi, nucleosidi e nucleotidi

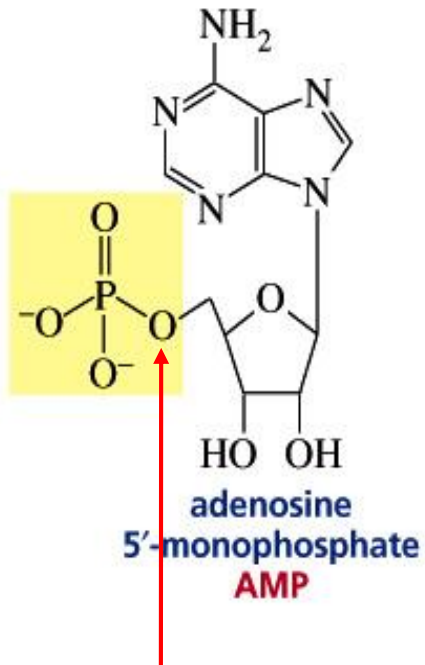
Base	Nucleoside	Nucleotide (estere fosforico)	RNA	DNA
Adenina	Adenosina	Adenosina-5'-fosfato (Acido adenilico)	AMP	dAMP
Guanina	Guanosina	Guanosina-5'-fosfato (Acido Guanilico)	GMP	dGMP
Citosina	Citidina	Citidina-5'-fosfato (Acido citidilico)	CMP	dCMP
Timina	Timidina	Timidina-5'-fosfato (Acido timidilico)		dTMP
Uracile	Uridina	Uridina-5'-fosfato (Acido uridilico)	UMP	

		Purine		Pirimidine		
		Adenina (A)	Guanina (G)	Citosina (C)	Timina (T)	Uracile (U)
DNA	Nucleoside: deossiribosio + base	Deossiadenosina (dA)	Deossiguanosina (dG)	Deossicitidina (dC)	Timidina (dT)	
	Nucleotide: deossiribosio + base + gruppo fosfato	Acido deossia- denilico o deos- siadenosinamo- nofosfato (dAMP)	Acido deossigua- nilico o deossi- guanosina mo- nofosfato (dGMP)	Acido deossiciti- dilico o deossici- tidina monofosfa- to (dCMP)	Acido timidilico o timidina monofosfato (TMP)	
RNA	Nucleoside: ribosio + base	Adenosina (A)	Guanosina (G)	Citidina (C)		Uridina (U)
	Nucleotide: ribosio + base + gruppo fosfato	Acido adenilico o adenosina mo- nofosfato (AMP)	Acido guanilico o guanosina monofosfato (GMP)	Acido citidilico o citidina monofos- fato (CMP)		Acido uridilico o uridina monofos- fato (UMP)

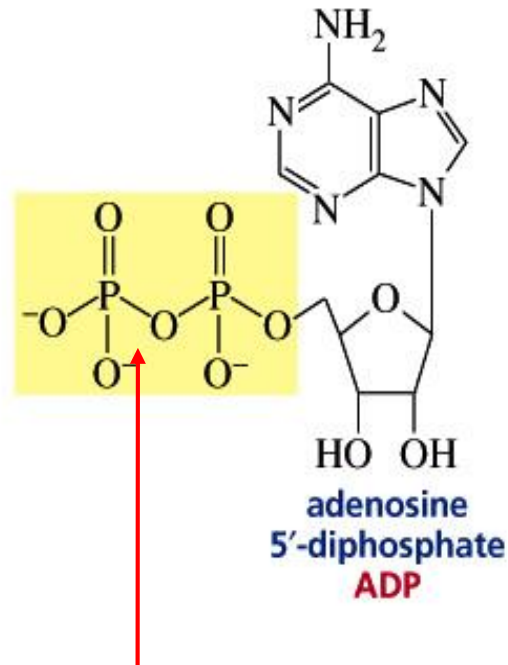
Nomenclatura IUPAC per le basi e i nucleosidi degli acidi nucleici.

Simbolo	Base		Nucleoside
A	Adenine		Adenosine
C	Cytosine		Cytidine
G	Guanine		Guanosine
T (U)	Thymine (Uracil)		Thymidine (Uridine)
R	puRine	A ◦ G	
Y	pYrimidine	C ◦ T (U)	
S	Strong	C ◦ G	
W	Weak	A ◦ T (U)	
K	Keto-enolic	G ◦ T (U)	
M	aMino-iminic	A ◦ C	
B	non A	C ◦ G ◦ T (U)	
D	non C	A ◦ G ◦ T (U)	
H	non G	A ◦ C ◦ T (U)	
V	non T (non U)	A ◦ C ◦ G	
N	any	A ◦ C ◦ G ◦ T (U)	
I	Hypoxanthine		Inosine
<i>O* (5mC)Not off.</i>	<i>5-methylcytosine</i>		<i>5-methyl-cytidine</i>

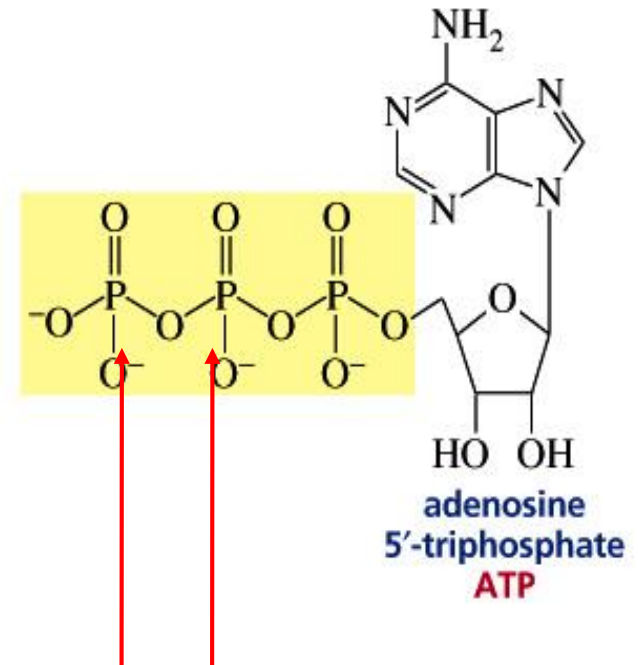
AMP, ADP e ATP



Legame estereo

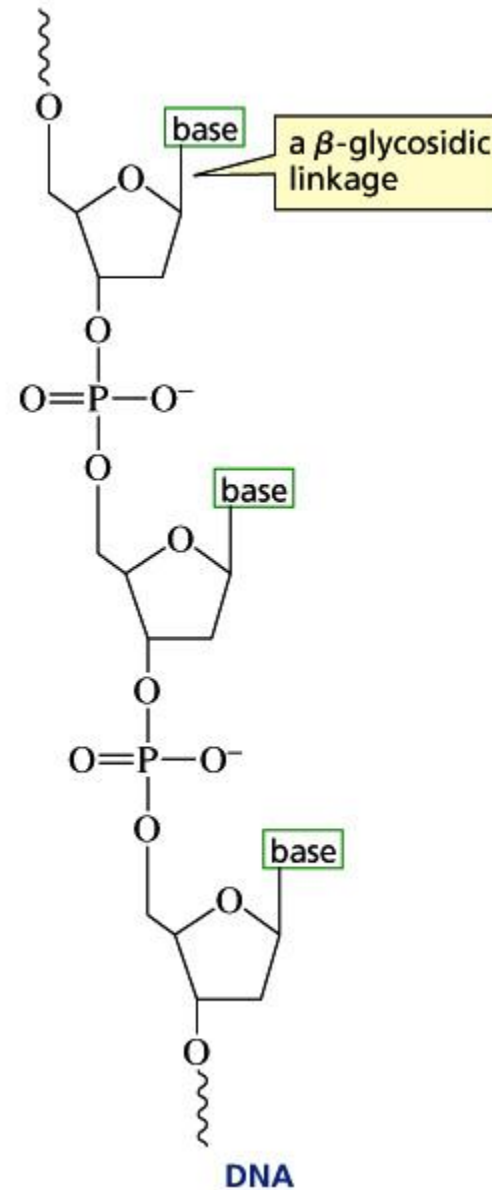
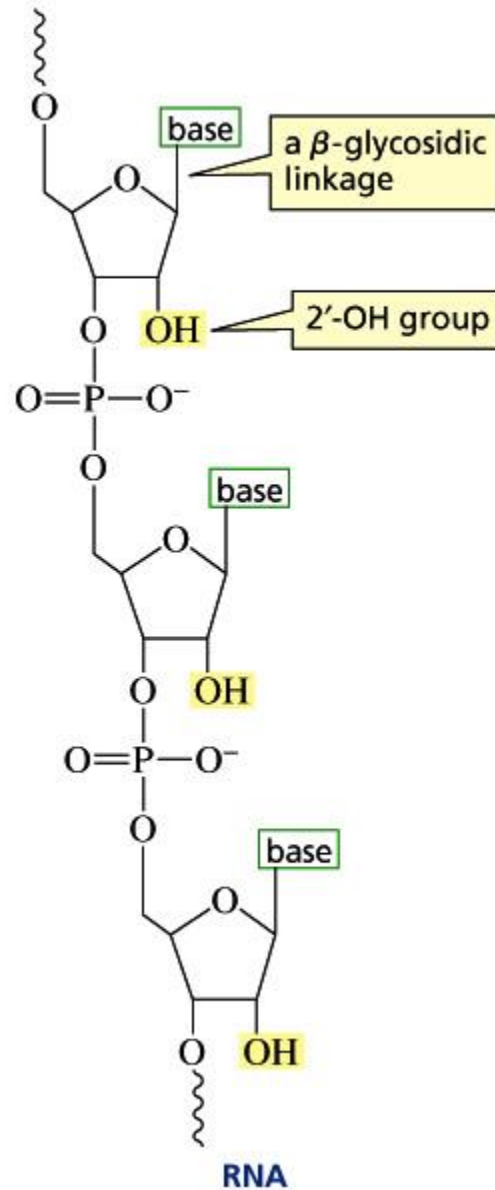


Legame fosfoanidridico



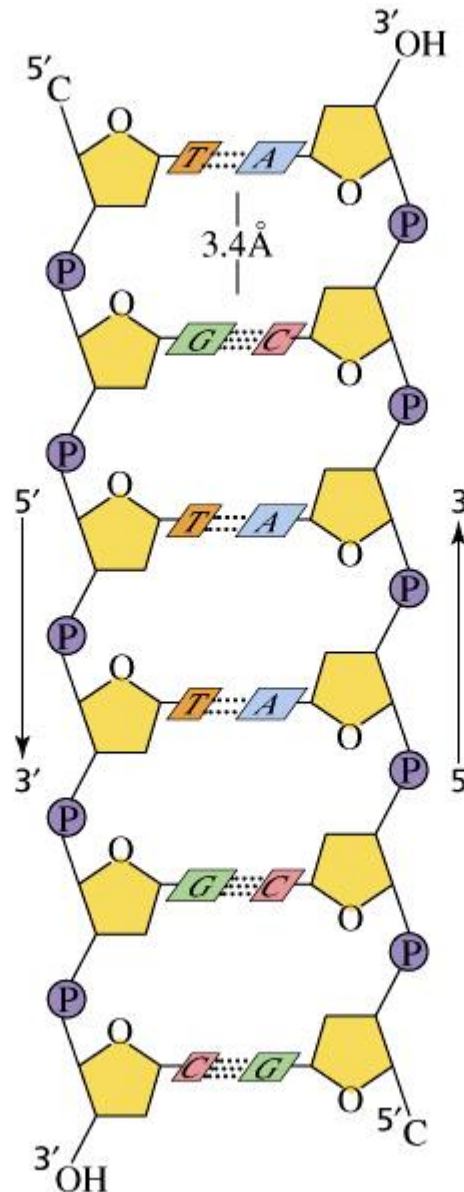
Legami fosfoanidridici

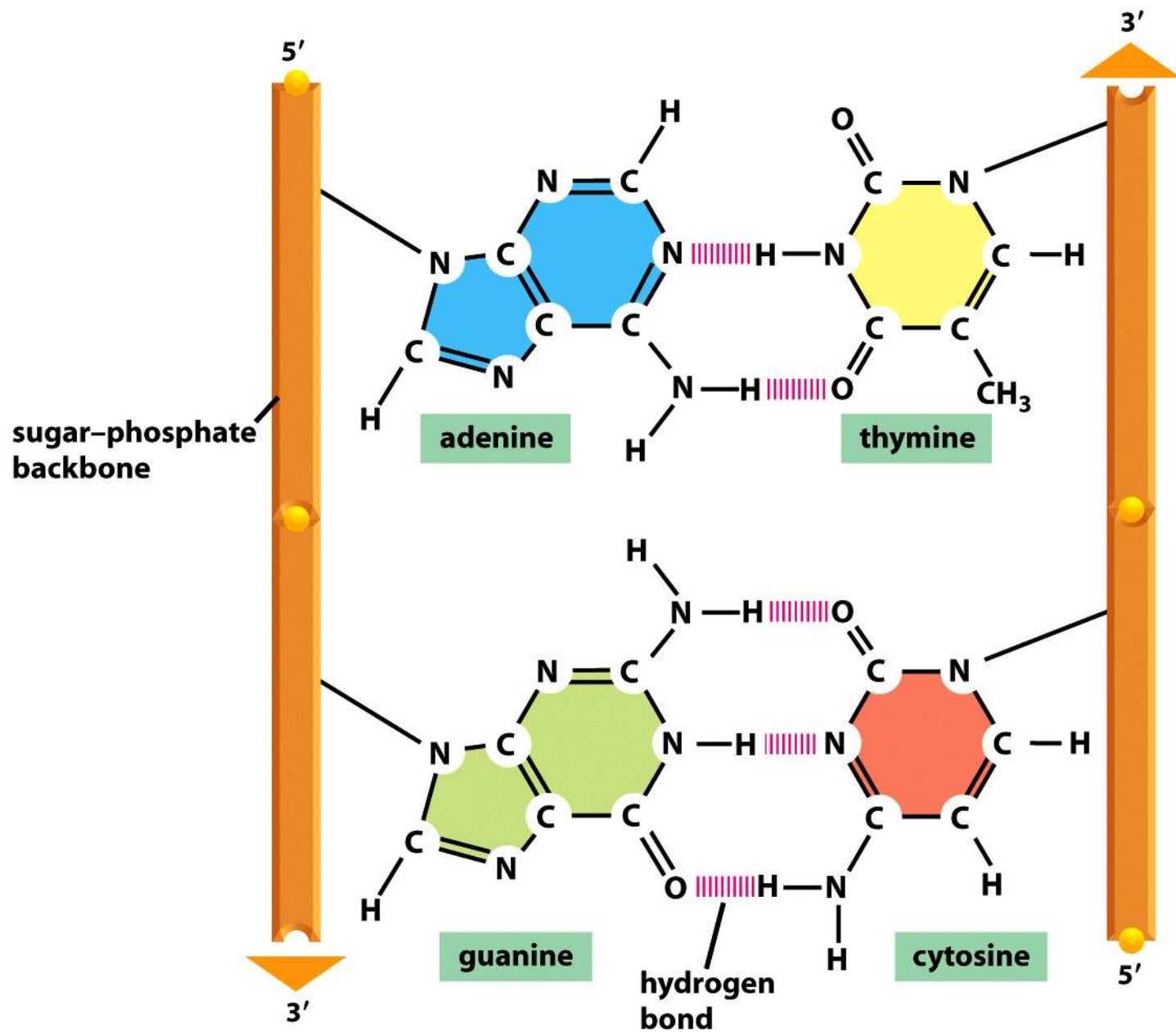
GLI ACIDI NUCLEICI sono POLINUCLEOTIDI



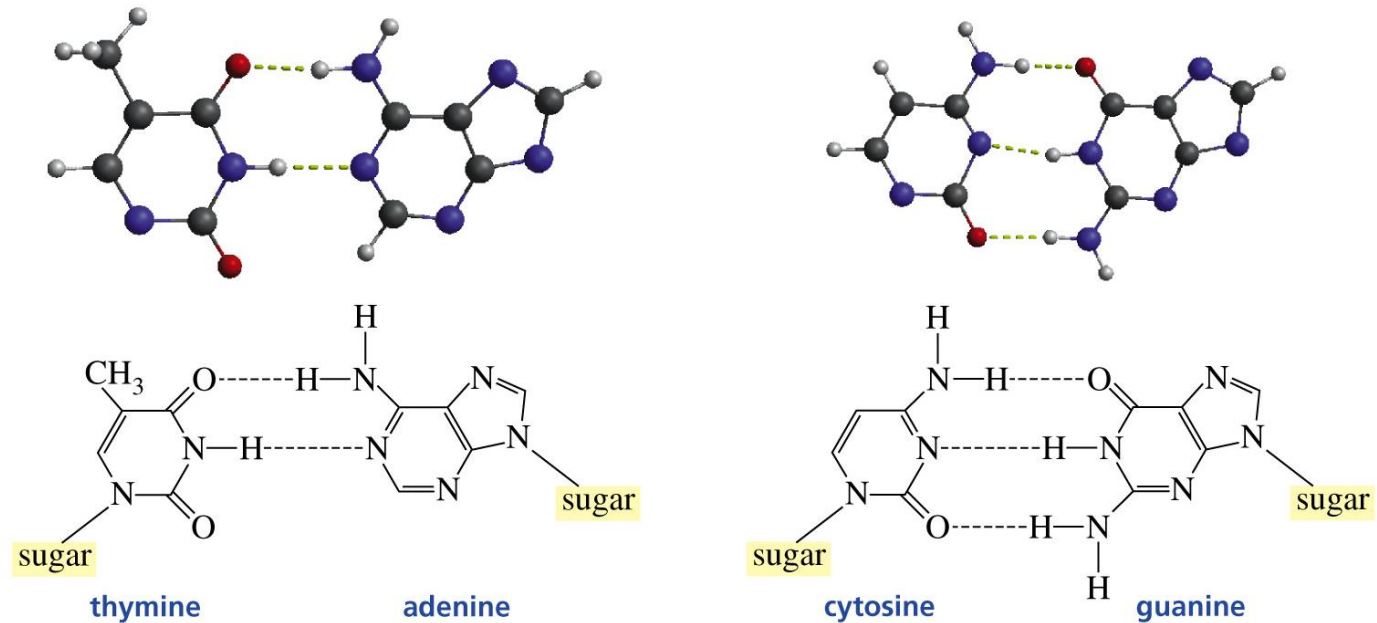
L'ACCOPPIAMENTO DELLE BASI NEL DNA

**Nel DNA i 2
filamenti
polinucleotidici
sono
antiparalleli!**



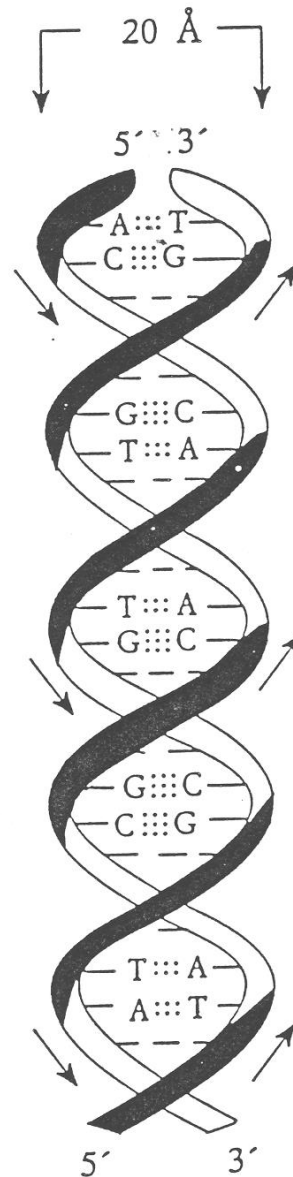


I LEGAMI IDROGENO FRA LE BASI STABILIZZANO LA STRUTTURA DEL DNA



DNA (acido deossi-ribonucleico)

(due filamenti polinucleotidici antiparalleli avvolti ad α -elica)



34 Å

Giro completo dell'elica

Nel caso della struttura a doppia elica del DNA le **interazioni deboli** più significative sono:

- a) le interazioni di van der Waals e quelle idrofobiche nell'**impilamento** delle coppie di basi al centro della doppia elica;
- b) i legami idrogeno **tra le basi** di ciascuna coppia; la loro importanza sta essenzialmente nel fatto che solo se si esplicano fra basi complementari generano **coppie isomorfe**, cioè con la stessa geometria, prerequisito per lo sviluppo di una struttura elicoidale regolare (Struttura secondaria);
- c) le interazioni elettrostatiche, repulsive **tra le cariche negative dei gruppi fosfato** di ciascuna delle due catene, e attrattive con gli ioni piccoli positivi eventualmente presenti nel mezzo.

Stabilizzano la doppia elica:

- **Legami idrogeno;**
- **Interazioni di impilamento-stacking- legami deboli che stabilizzano l'elica: orbitali π greco delle basi (mantengono minimo il contatto con l'acqua);**
- **Interazioni idrofobiche interne;**
- **Forze di Van der Waals.**

Destabilizzano la doppia elica:

Le interazioni elettrostatiche dovute principalmente ai gruppi fosfato carichi negativamente che modificano le interazioni intra- ed intercatena.

Ioni carichi positivamente, proteine e poliammine possono neutralizzare la repulsione mutua delle cariche negative e contribuire alla stabilità della doppia elica.