

DNA: il materiale genetico

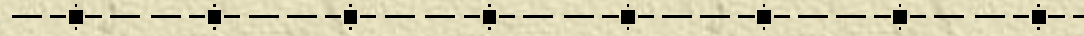
Corso di Genetica
per Scienze e Tecnologie per
l'Ambiente e la Natura

— Alberto Pallavicini —

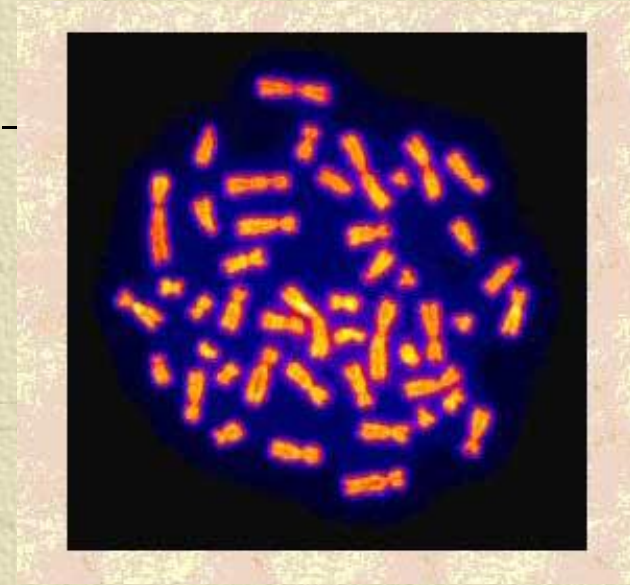
La ricerca del materiale genetico

Il materiale responsabile dei caratteri ereditari doveva avere tre caratteristiche:

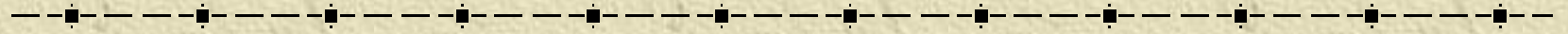
1. Possedere *l'informazione* per la struttura, la funzione, lo sviluppo della cellula.
2. Capace di *replicarsi* accuratamente.
3. Ma capace di andare incontro a *variabilità*.



- Nei cromosomi troviamo i geni.
- Controllo del fenotipo.
- Abbiamo visto come avviene la trasmissione dell'**informazione genetica**

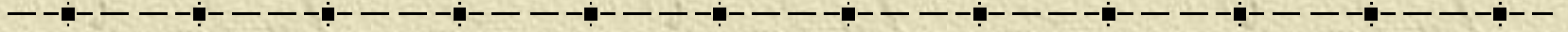


I lavori di Miesher (1869)



- Quale componente chimico dei cromosomi costituisce i geni?
- Le analisi per la conferma che si tratta del DNA sono ricerche svolte a cavallo della 2 guerra mondiale.

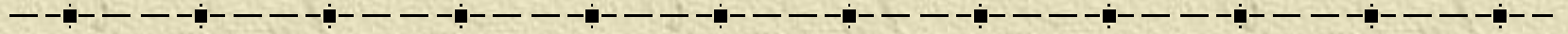
IL DNA per Miescher



NUCLEINA

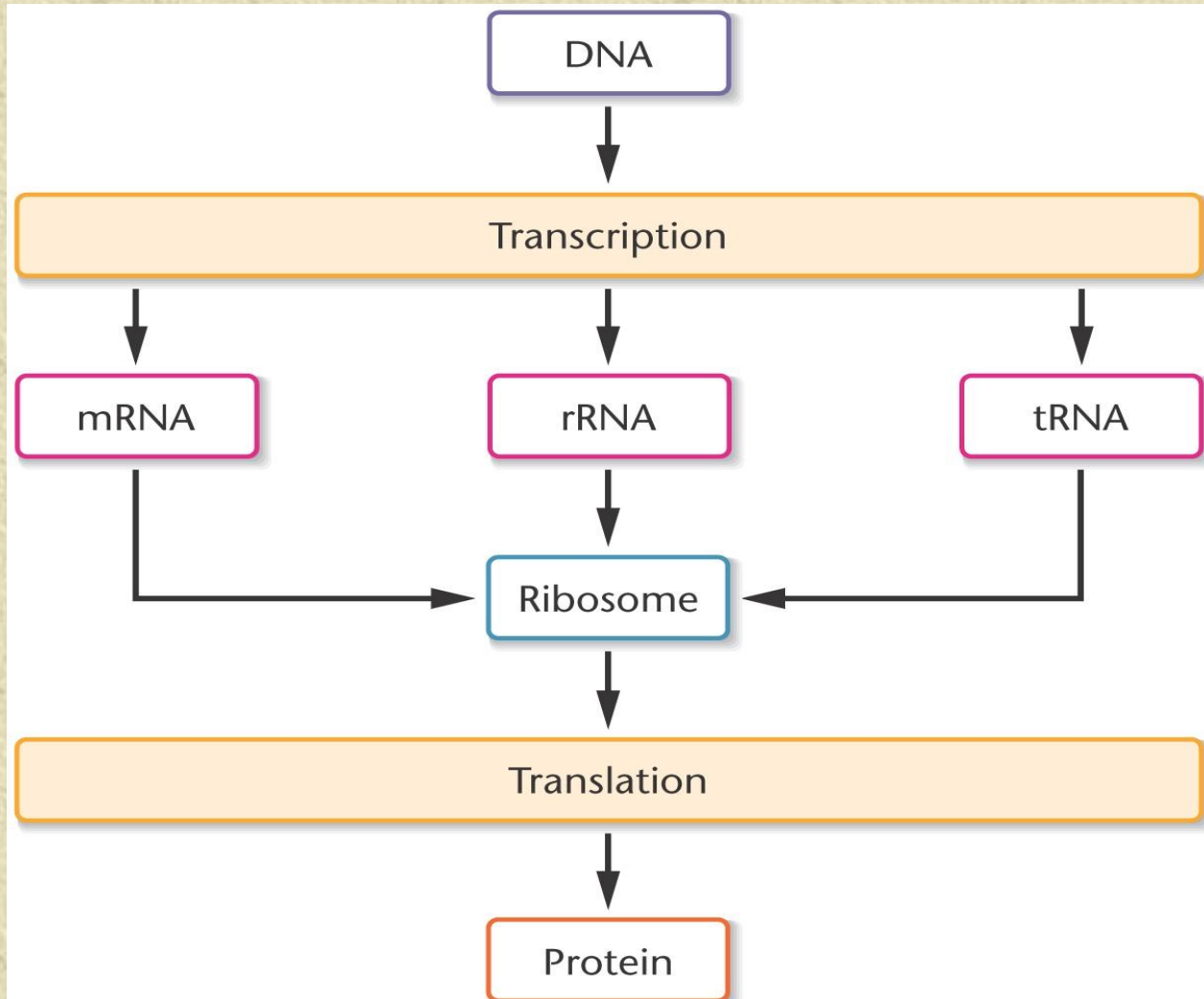


Il materiale genetico deve esibire 4 caratteristiche

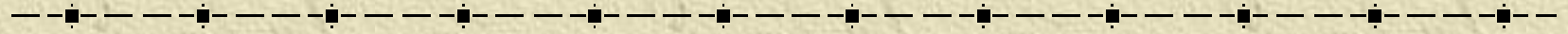


- Replicazione (ciclo cellulare)
- Immagazzinamento dell'informazione (tutte le cellule hanno lo stesso materiale genetico)
- Espressione dell'informazione (dogma centrale della genetica molecolare)
- Variazione tramite mutazione (cambio nella composizione chimica del DNA e/o riarrangiamento cromosomico)

Il dogma centrale della genetica molecolare



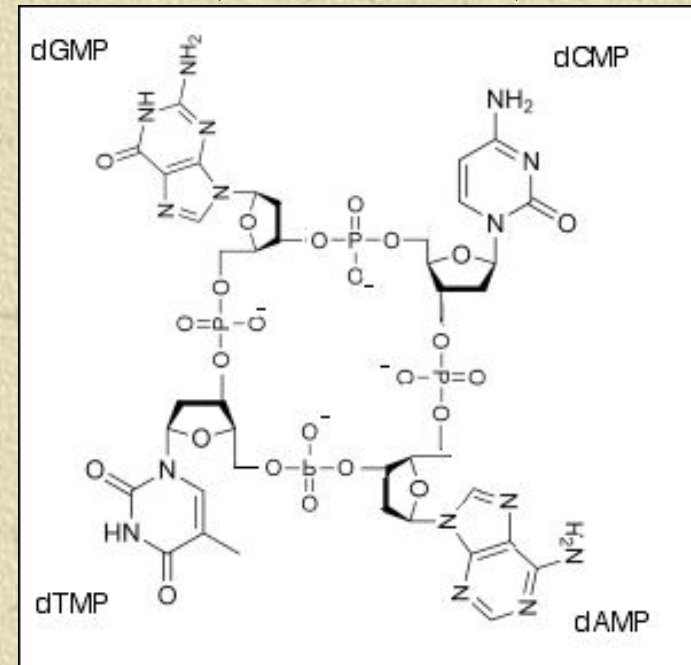
Sino al 1944: Proteine come materiale genetico



- Il materiale genetico viene trasmesso fisicamente alla progenie (sia dalla teoria dell'ereditarietà)
- Le proteine erano i candidati favoriti perchè:
 - 1) Sono abbondanti nelle cellule
 - ♦ Sino al 50% del peso secco

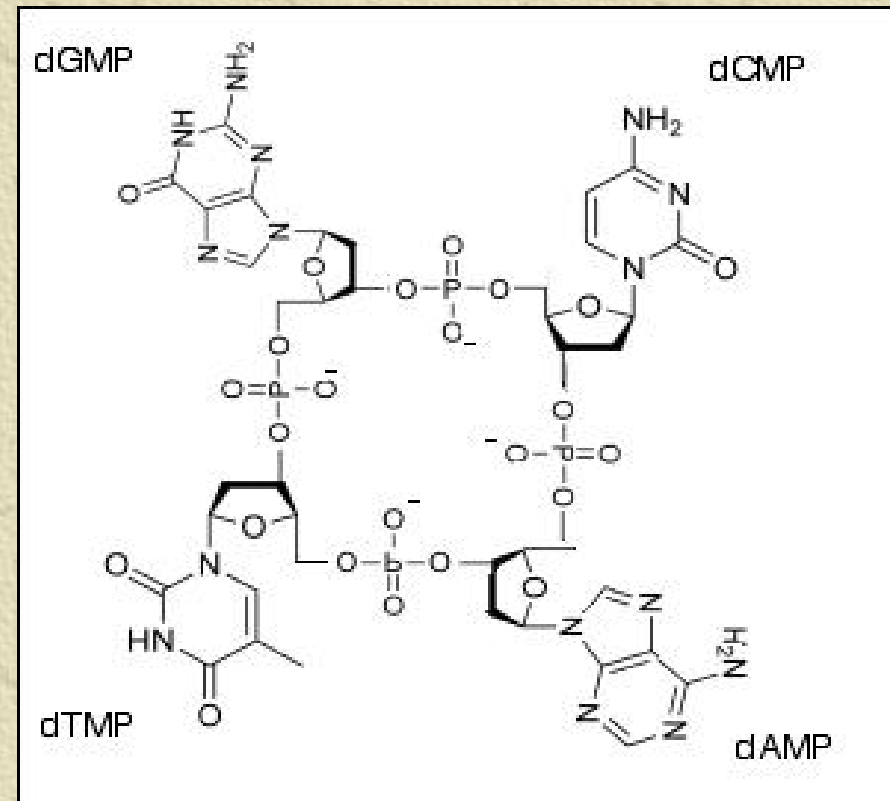
Sino al 1944: Proteine come materiale genetico

- La struttura proposta era troppo semplice per spiegare la variabilità.
- Il DNA fu inizialmente studiato da Miescher ha separato nuclei dal citoplasma (nucleina)
- Nel 1910 Levene propone l'ipotesi del tetranucleotide



Sino al 1944: Proteine come materiale genetico

- Tra il 1910 e il 1930 altre strutture furono proposte.
- Levene e la teoria tetranucleotidica
- Nel 1940 Chargaff dimostrò che il rapporto 1:1:1:1 era sbagliato



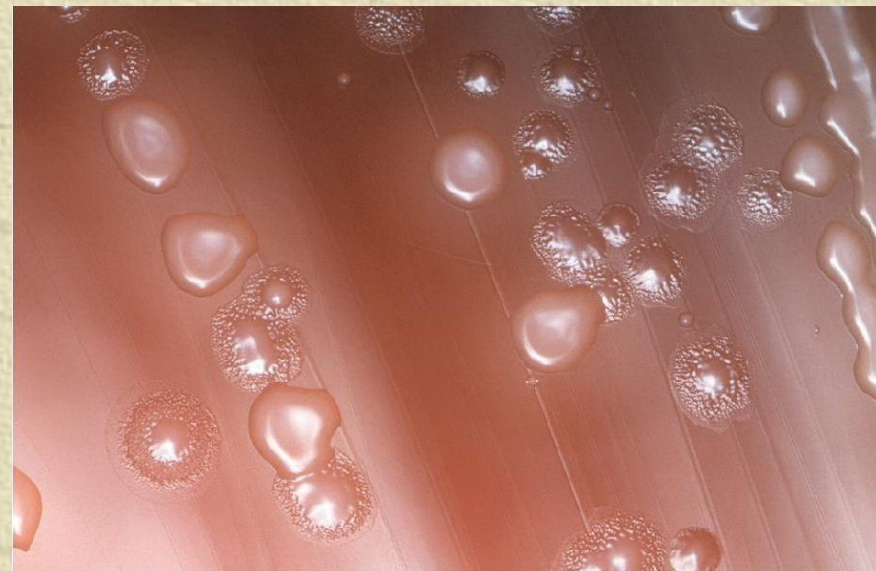
La trasformazione

Gli esperimenti di Griffith (1927)



---■---■---■---■---■---■---■---■---■---■---
Studiava il *Diplococcus pneumoniae* (*Streptococcus*)

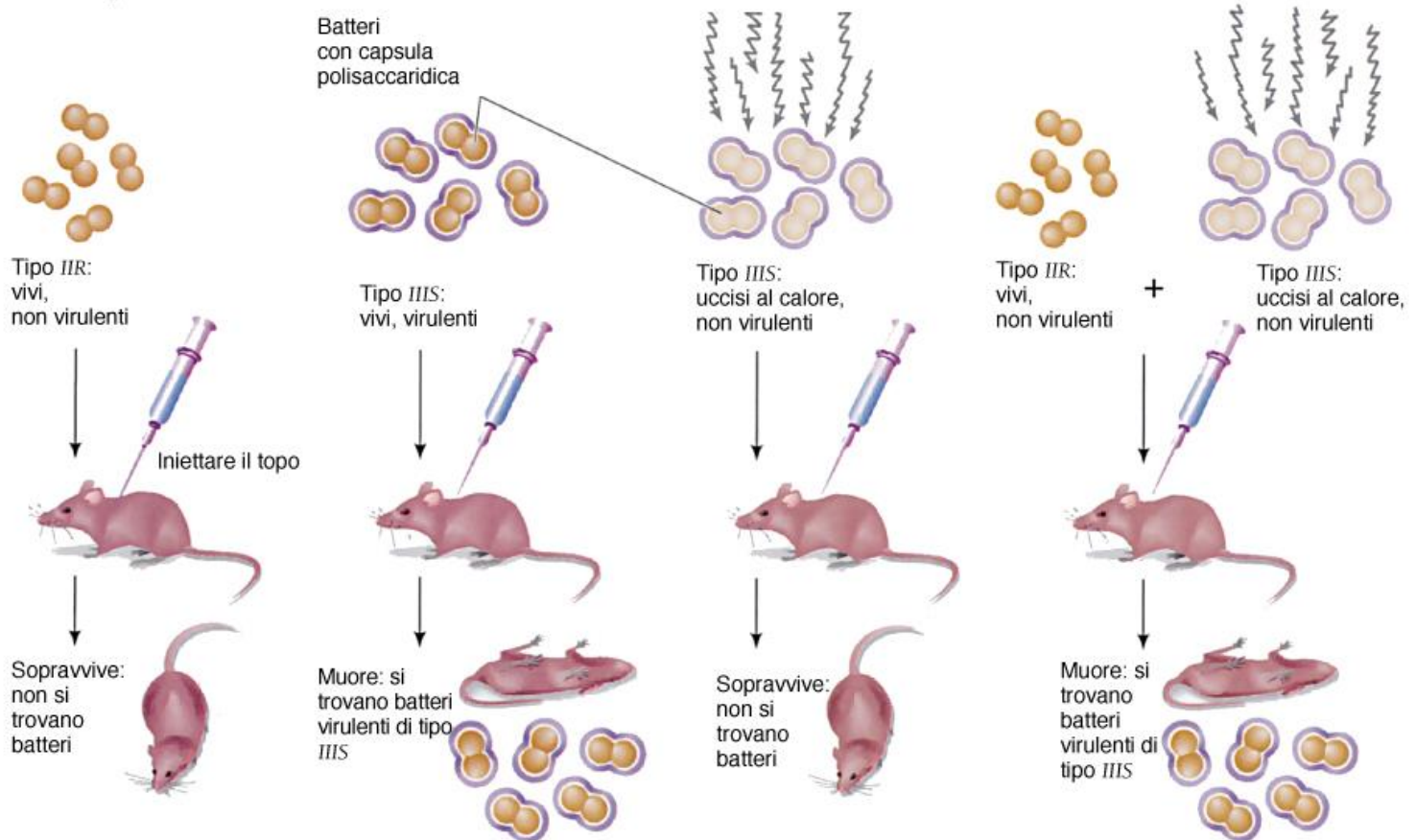
- Ceppi virulenti (S) e ceppi non virulenti (R)
- Esistono numerosi sierotipi che si differenziano dalla struttura chimica della capsula
- Sierotipo I, II, III, IV
- Usa: IIR e IIIS



L'esperimento di trasformazione di Griffith (1928)

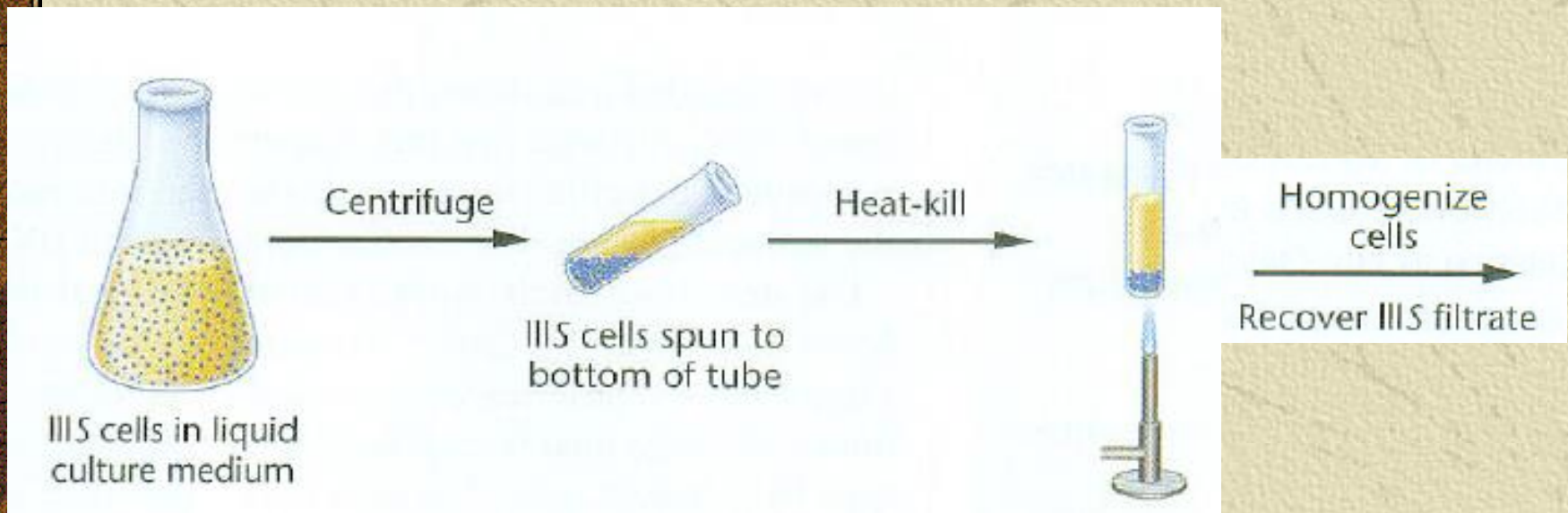
Figura 2.2

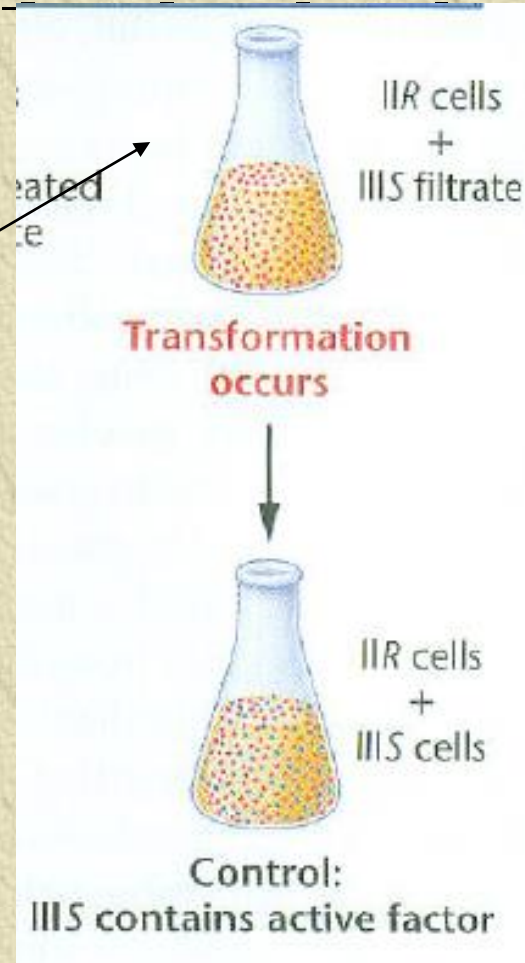
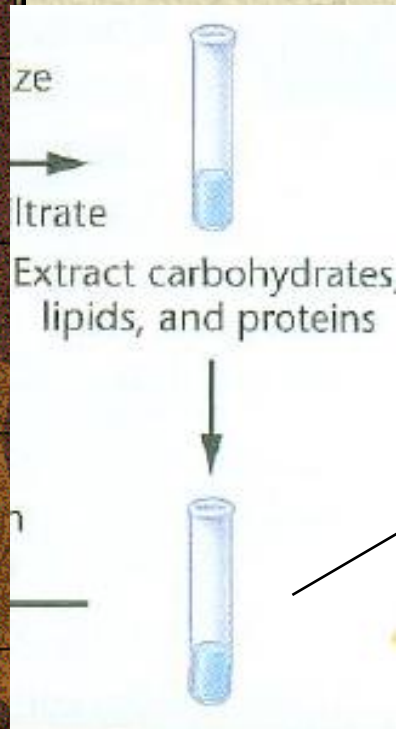
L'esperimento di trasformazione di Griffith. Topi a cui erano stati iniettati pneumococchi del tipo *IIIS* morivano, mentre topi iniettati o con batteri del tipo *IIR* o con batteri *IIIS* uccisi al calore sopravvivevano. Tuttavia, se iniettati con una miscela di batteri vivi *IIR* e *IIIS* uccisi al calore, i topi morivano.



Esperimento di Avery, McLeod and McCarty (1944)

- Partono da grandi quantità di coltura (50-75 l)







Treat with
protease



IIR cells
+
Protease-treated
III S filtrate

**Transformation
occurs**



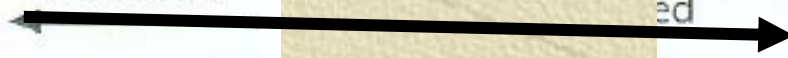
IIR cells
+
III S cells

Conclusion:

Active factor is not protein III S ce



Treat with
ribonuclease



added



IIR cells
+
RNase-treated
IIS filtrate

**Transformation
occurs**



IIR cells
+
IIS cells

Conclusion:
Active factor is not RNA Act



Treat with
deoxyribonuclease



IIR cells
+
DNase-treated
IIS filtrate

No transformation
occurs



Only IIR
cells

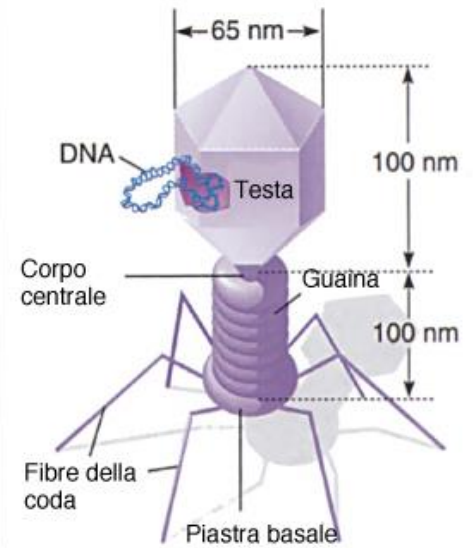
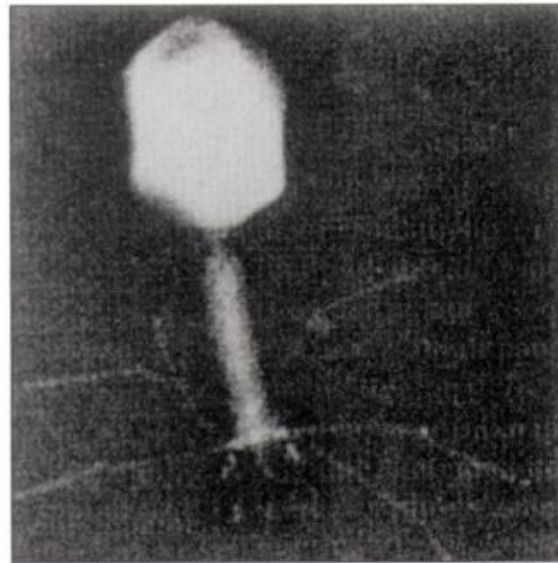
Conclusion:
Active factor is DNA

Ac

DNA come materiale genetico: l'esperimento di Hersey e Chase (1953)

Figura 2.4

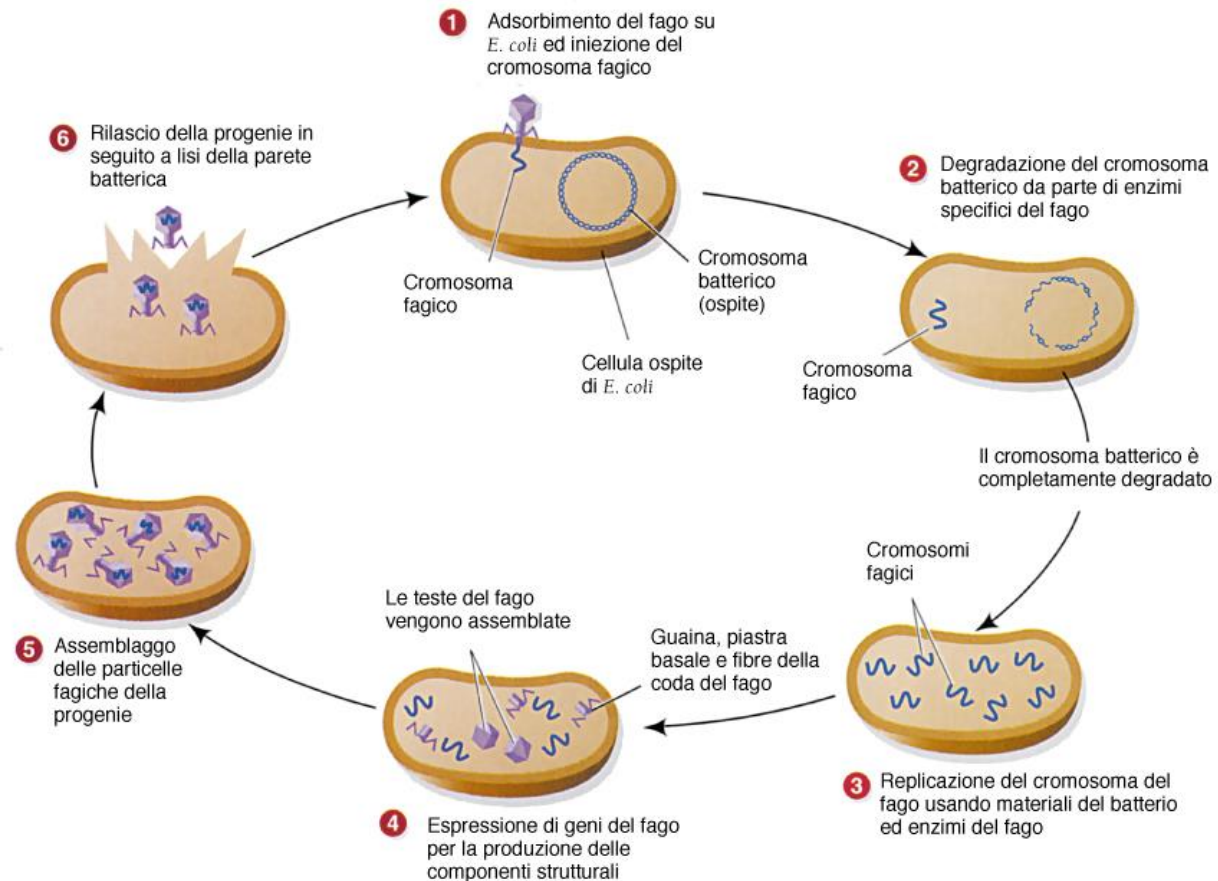
Fotografia al microscopio elettronico e schema del batteriofago T2 (1 nm = 10⁻⁹m).



DNA come materiale genetico: l'esperimento di Hersey e Chase (1953)

Figura 2.5

Ciclo litico di un fago virulento, come T2.

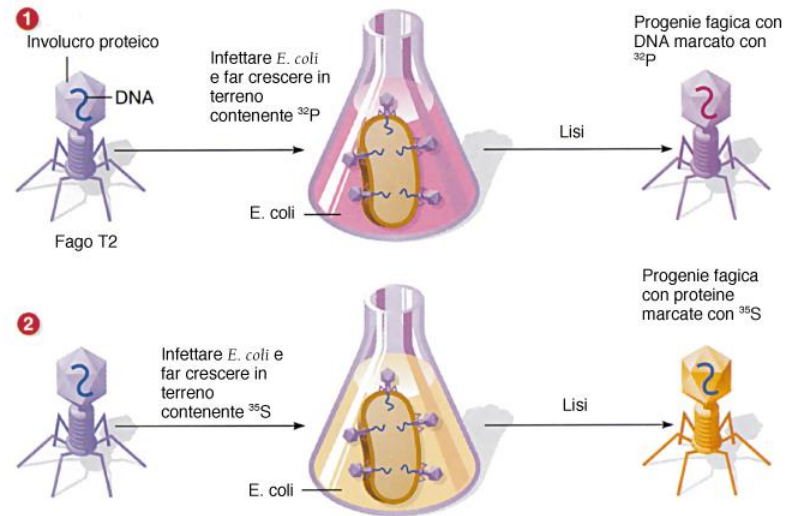


DNA come materiale genetico: l'esperimento di Hersey e Chase (1953)

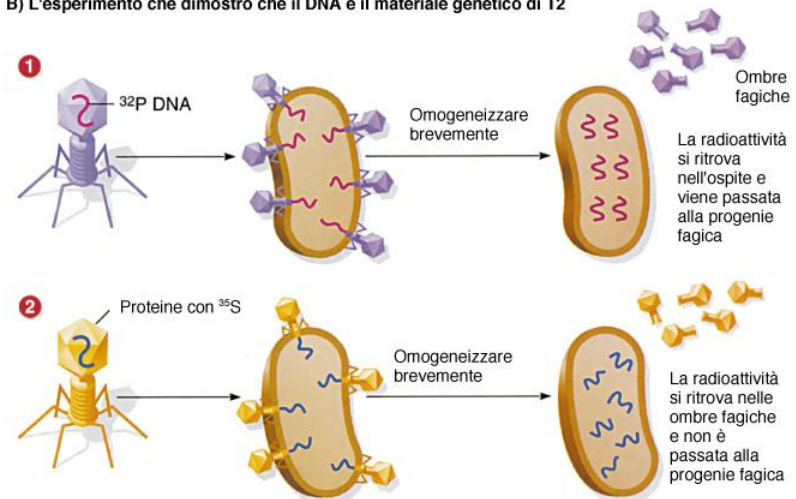
Figura 2.6

L'esperimento di Hershey-Chase. (a) La produzione di fagi T2 con (1) DNA marcato con ^{32}P oppure con (2) proteine marcate con ^{35}S ; (b) l'evidenza sperimentale che dimostra che il DNA è il materiale genetico di T2: (1) il ^{32}P si trova all'interno dei batteri ed è presente nella progenie fagica, (2) mentre lo ^{35}S non si trova all'interno dei batteri e viene rilasciato con le ombre fagiche.

a) Preparazione di batteriofago T2 marcato radioattivamente



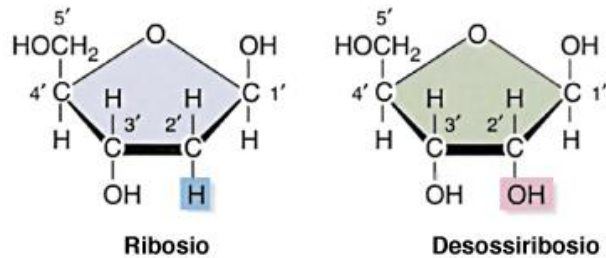
B) L'esperimento che dimostrò che il DNA è il materiale genetico di T2



La composizione e la strutture di DNA e RNA

Figura 2.9

Le strutture del ribosio e del desossiribosio, gli zuccheri pentosi dell'RNA e del DNA, rispettivamente. Viene messa in evidenza la differenza tra i due zuccheri.



La struttura delle basi azotate nel DNA e nell'RNA. I composti progenitori sono la purina (alto) e la pirimidina (basso). Le differenze tra le basi sono evidenziate.

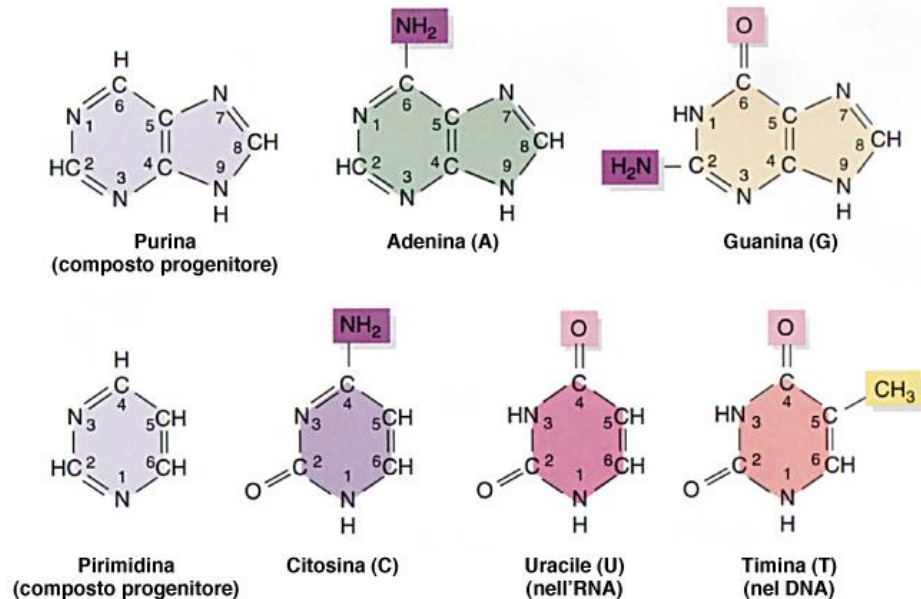
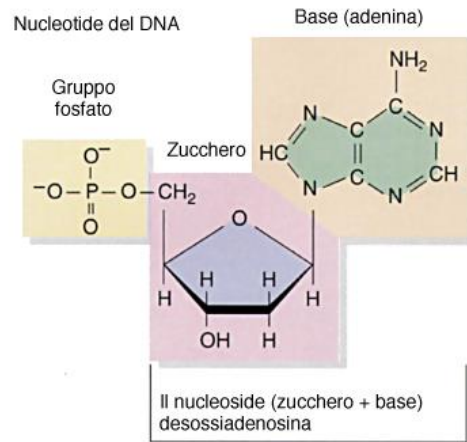


Tabella 2.1 Nomenclatura delle basi, dei nucleosidi e dei nucleotidi che costituiscono il DNA e l'RNA

		Basi: purine (Pu)		Basi: pirimidine (Py)		
		Adenina (A)	Guanina (G)	Citosina (C)	Timina (T) (solo col desossiribosio)	Uracile (U) (solo col ribosio)
DNA	Nucleoside: desossiribosio + base	Desossiadenosina (dA)	Desossiguanosina (dG)	Desossicitidina (dC)	Timidina (dT)	
	Nucleotide: desossiribosio + base + gruppo fosfato	Acido desossia- denilico o de- sossiadenosina monofosfato (dAMP)	Acido desossigua- nilico o desossi- guanosina monofosfato (dGMP)	Acido desossici- tidilico o desossi- citidina monofos- fato (dCMP)	Acido timidilico o ti- midina monofosfato (TMP)	
RNA	Nucleoside: ri- bosio + base	Adenosina (A)	Guanosina (G)	Citidina (C)		Uridina (U)
	Nucleotide: ri- bosio + base + gruppo fosfato	Acido adenilico o adenosina monofosfato (AMP)	Acido guanilico o guanosina mo- nofosfato (GMP)	Acido citidilico o citidina monofos- fato (CMP)		Acido uridilico o uridina mo- nofosfato (UMP)

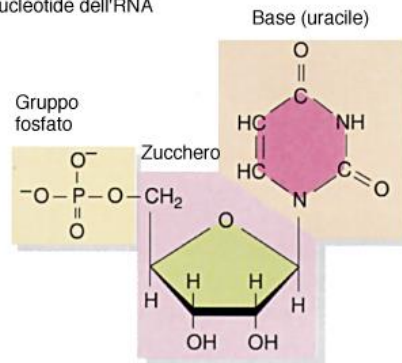
La composizione e la strutture di DNA e RNA

a) Nucleotidi del DNA e dell'RNA



Il nucleotide (zucchero + base + gruppo fosfato)
desossiadenosina 5' monofosfato

Nucleotide dell'RNA



Il nucleotide (zucchero + base + gruppo fosfato)
uridina 5' monofosfato o acido uridilico

b) Catena polinucleotidica di DNA

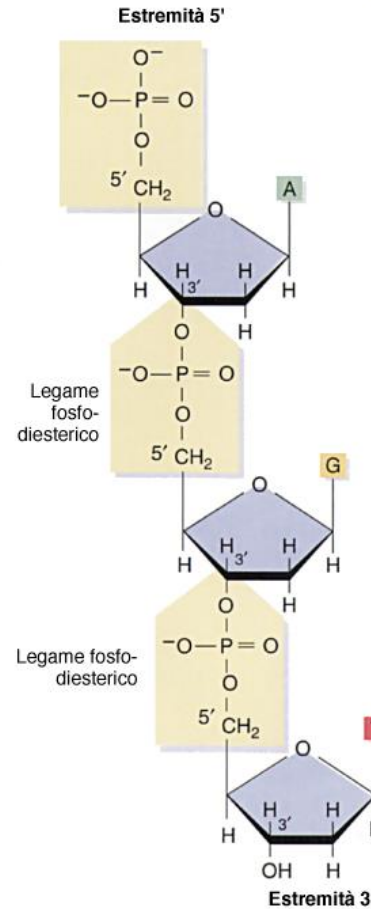


Figura 2.11

La struttura chimica di DNA ed RNA. (a) Strutture fondamentali dei nucleosidi (zucchero più base) e dei nucleotidi (zucchero più base più gruppo fosfato) del DNA e dell'RNA. In figura, i gruppi fosfato sono arancioni, gli zuccheri rossi e le basi marroni. (b) Un segmento di una catena polinucleotidica, in questo caso un singolo filamento di DNA. Le molecole di desossiribosio sono legate mediante legami fosfodiesterici tra il carbonio 3' di uno zucchero ed il carbonio 5' dello zucchero successivo.

La scoperta della doppia elica del DNA

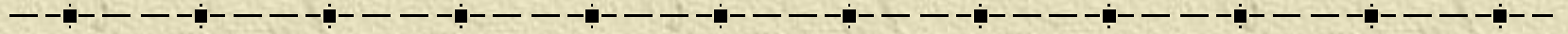
Studi sulla composizione della basi: Erwin Chargaff

La purine sono uguali alle pirimidine, anzi $A=T$ e $G=C$

Composizione in basi del DNA proveniente da differenti organismi

<i>Origine del DNA</i>	<i>Percentuale delle diverse basi nel DNA</i>				<i>Rapporti</i>		
	A	T	G	C	A/T	G/C	Py/Pu
<i>Escherichia coli</i>	26,0	24,9	25,2	23,9	1,08	0,99	1,04
Lievito	31,7	18,3	17,4	32,6	0,97	1,05	1,00
Bue	29,0	21,2	21,2	28,7	1,01	1,00	1,01
Maiale	29,8	20,7	20,7	29,1	0,92	1,00	1,01
Uomo	30,4	19,9	19,9	30,1	1,01	1,00	1,01
Mais	25,6	25,3	24,5	24,6	1,01	1,00	1,04

La scoperta della doppia elica del DNA



Studi di diffrazione dei raggi X: Rosalind Franklin e Maurice Wilkins

Il DNA ha una struttura ad elica e presenta due periodicità distinte si 0,34 nm e 3,4 nm lungo l'asse della molecola

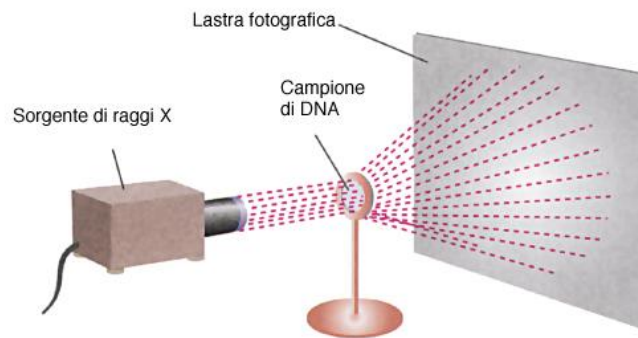
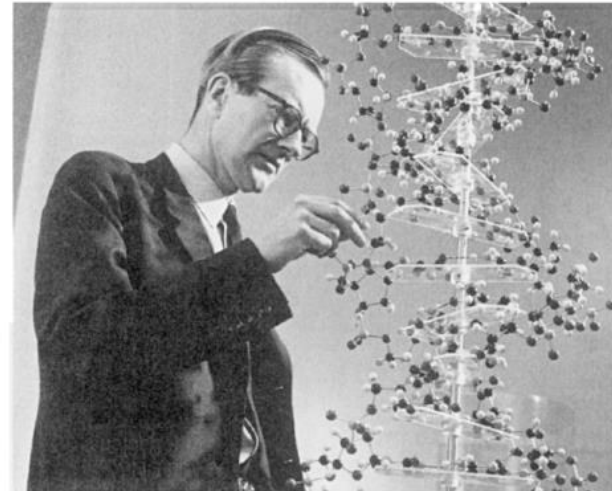
La scoperta della doppia elica del DNA

Figura 2.13

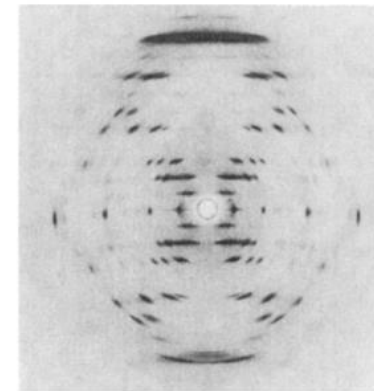
Analisi del DNA mediante diffrazione dei raggi X. (a) Rosalind Franklin e Maurice H. F. Wilkins (fotografato nel 1962, quando ricevette il Premio Nobel insieme a Watson e Crick). (b) Lo schema di diffrazione dei raggi X del DNA che Watson e Crick utilizzarono per sviluppare il loro modello a doppia elica. Le aree scure che formano una figura ad X al centro della fotografia indicano la natura ad elica del DNA. Le mezzelune scure in alto ed in basso nella fotografia indicano la distanza di 0,34 nm tra le coppie di basi.



a)



b)



Schema di diffrazione dei raggi X

La scoperta della doppia elica del DNA

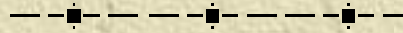


Figura 2.14

Struttura molecolare del DNA. (a) Modello spaziale tridimensionale del DNA come preparato da Watson e Crick. (b) Rappresentazione stilizzata della doppia elica del DNA.

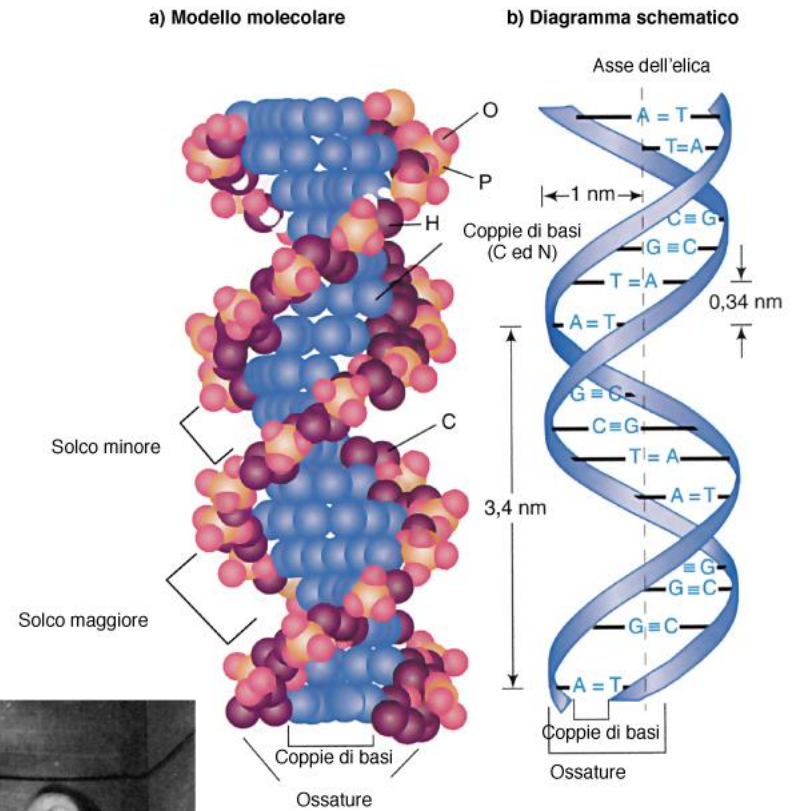
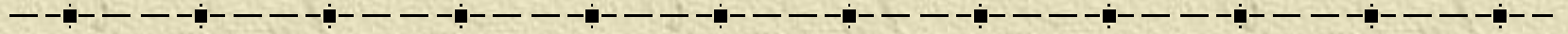


Figura 2.12

James Watson (sinistra) e Francis Crick (destra) nel 1993 per la celebrazione del quarantesimo anniversario della scoperta della struttura del DNA e nel 1953 con il modello della struttura del DNA.



La scoperta della doppia elica del DNA



1. La molecola di DNA consiste di due catene polinucleotidiche avvolte l'una intorno all'altra in una doppia elica destrorsa.
2. Le due catene sono antiparallele cioè sono orientate in direzioni opposte (5'-3' e 3'-5').
3. Gli scheletri fosfato sono esterni mentre le basi azotate sono orientate verso l'asse centrale.
4. Le basi dei filamenti opposti sono unite tra loro da legami idrogeno e sono possibili solo due coppie A-T e C-G.
5. Le coppie di basi sono distanziate di 0,34 nm e un giro completo dell'elica richiede 3,4 nm (10 coppie per giro).

La scoperta della doppia elica del DNA

6. A causa del tipo di legame tra le basi, le impalcature zuccherofosfato della doppia elica non possono essere sempre alla stessa distanza (solco maggiore e minore).

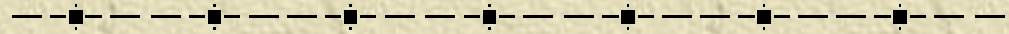


Figura 2.16
Modelli spaziali di diverse forme del DNA. (a) A-DNA. (b) B-DNA. (c) Z-DNA.

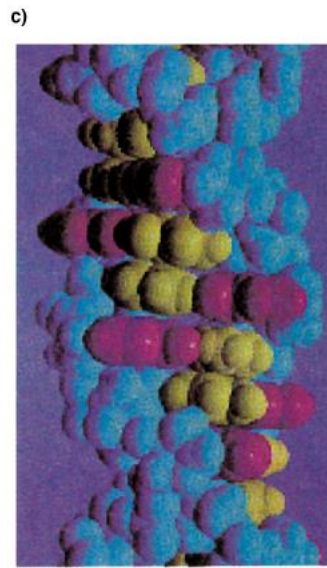
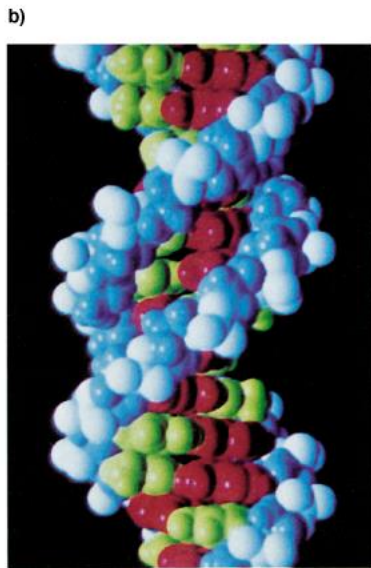
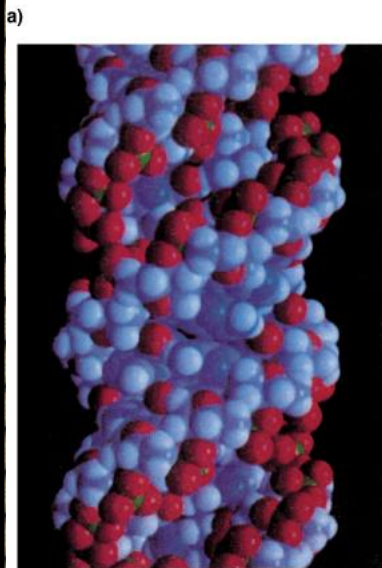
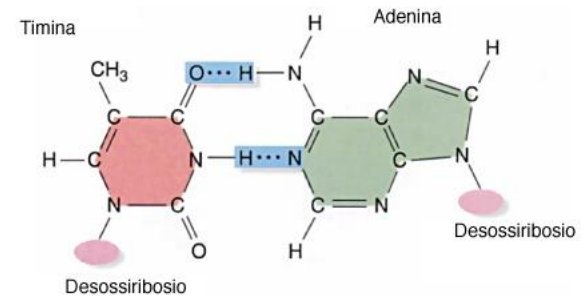


Figura 2.15

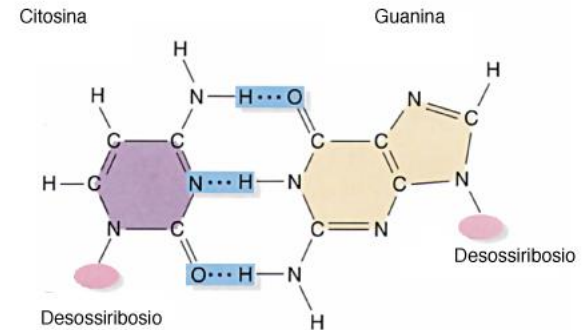
Struttura delle coppie complementari delle basi del DNA.

In entrambi i casi una purina si appaia con una pirimidina. (a) Le basi adenina e timina, che si appaiano mediante due legami idrogeno. (b) Le basi guanina e citosina, che si appaiano mediante tre legami idrogeno.

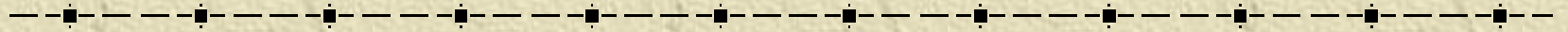
a) Coppia di basi adenina-timina
(doppio legame idrogeno)



a) Coppia di basi guanina-citosina
(triplo legame idrogeno)



L'organizzazione del DNA nei cromosomi



Il DNA di una cellula è organizzato in strutture fisiche chiamate **cromosomi**.

Il cromosoma, o l'insieme di cromosomi, che contiene tutto il DNA posseduto da un organismo viene chiamato **genoma**.

Cromosomi virali

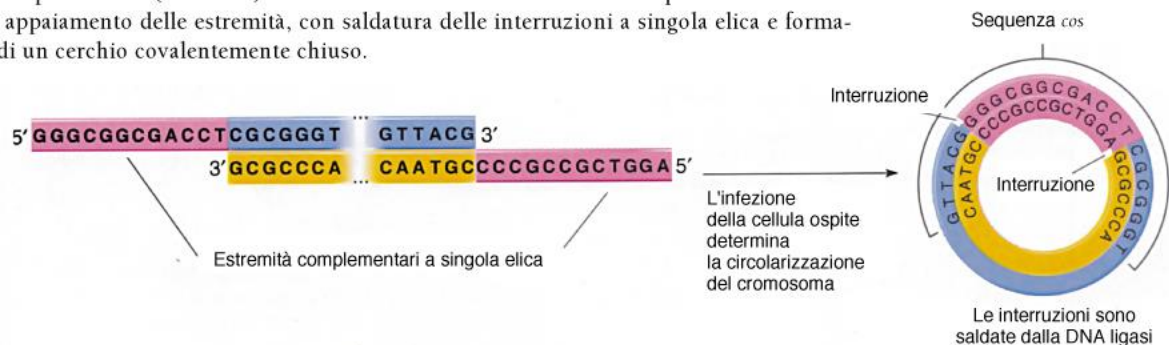
T-pari= singolo cromosoma lineare a doppio filamento

ϕ X174= singolo cromosoma circolare a singolo filamento

λ = singolo cromosoma lineare (incapsidato) e circolare (durante l'infezione) a doppio filamento

Figura 2.20

La struttura del cromosoma di λ varia secondo gli stadi dell'infezione litica di *E. coli*. Parti del cromosoma di λ che mostrano la sequenza nucleotidica delle due estremità a singola elica complementari ("coesive") e il cromosoma divenuto circolare dopo l'infezione mediante appaiamento delle estremità, con saldatura delle interruzioni a singola elica e formazione di un cerchio covalentemente chiuso.



Cromosomi procarioti

Contengono generalmente un singolo cromosoma costituito da DNA a doppia elica, circolare.

A volte posseggono dei cromosomi più piccoli che se non essenziale per la vita viene definito *plasmidio*.

Le dimensioni sono variabili:

Borrelia burdogferi = 1 cromosoma lineare (0,91 Mb) e 17 piccoli cromosomi lineari e circolari (0,53 Mb).

Agrobacterium tumefaciens = 1 cromosoma circolare (3 Mb) e un cromosoma lineare (2,1 Mb).

Methanococcus jannaschii = 3 cromosomi circolari (1,66 Mb, 58 kb e 16 kb)

Cromosomi procarioti

Nei batteri e negli Archea il cromosoma è organizzato nel **nucleoide**. Non separato dal resto della cellula da una membrana (prokarion).

Se si lisa gentilmente una cellula di *E. coli* il suo DNA risulta estremamente compatto. La lunghezza totale del DNA è 1000 volte la lunghezza della cellula!

Come tutto questo DNA si adatta all'interno del nucleoide?

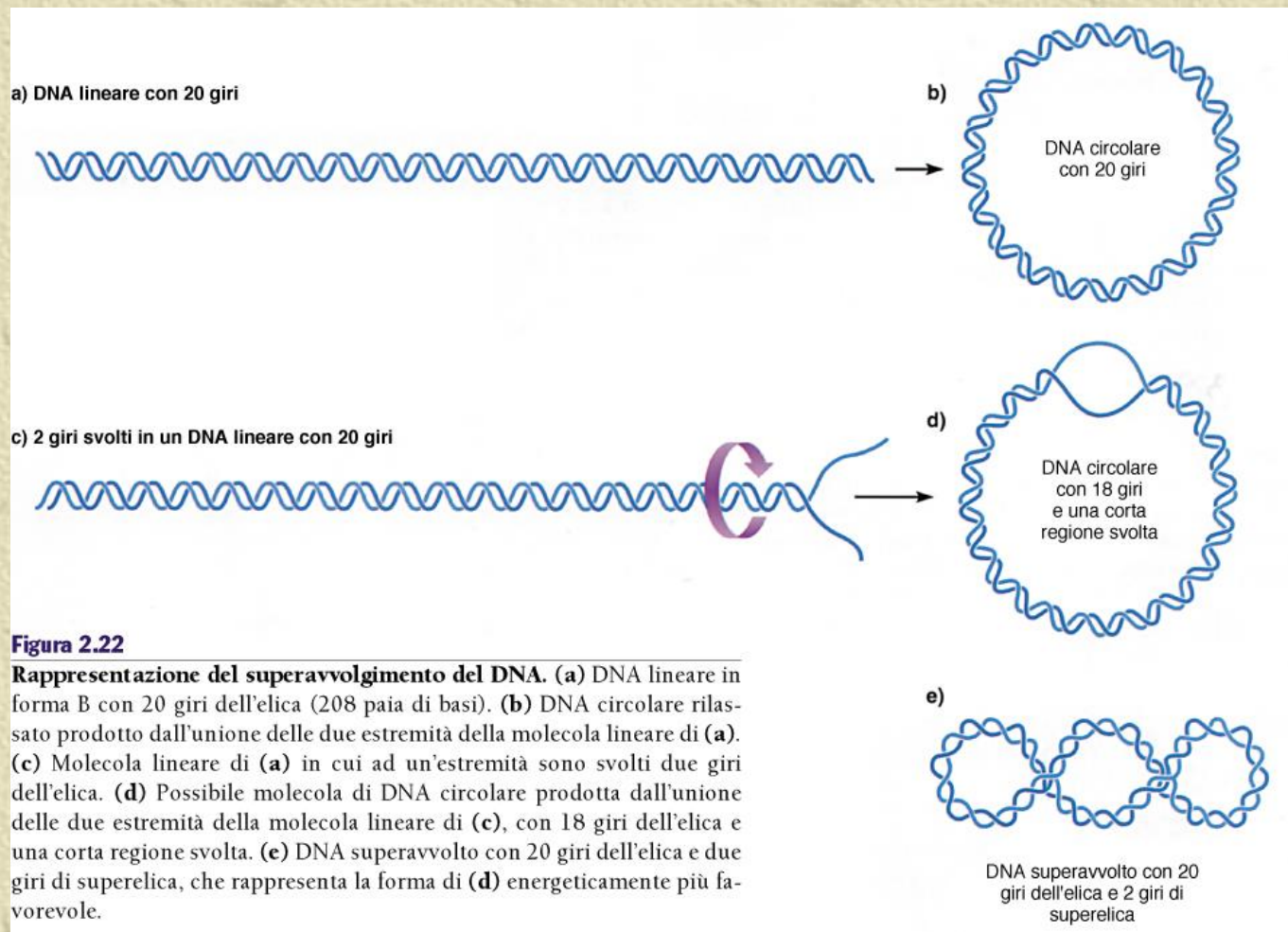
Figura 2.21

Cromosoma rilasciato da una cellula lisata di *E. coli*.



Cromosomi procarioti

Il DNA è **superavvolto...**



Cromosomi procarioti

L'entità e il tipo di superavvolgimento del DNA sono determinati dalle **topoisomerasi**.

Oltre al superavvolgimento esiste anche un'organizzazione in **domini ad ansa**.

Figura 2.23

Fotografie al microscopio elettronico di una molecola di DNA circolare che illustrano gli stati rilassato e superavvolto. (a) DNA rilassato (non superavvolto). (b) DNA superavvolto. Entrambe le molecole sono mostrate allo stesso ingrandimento.

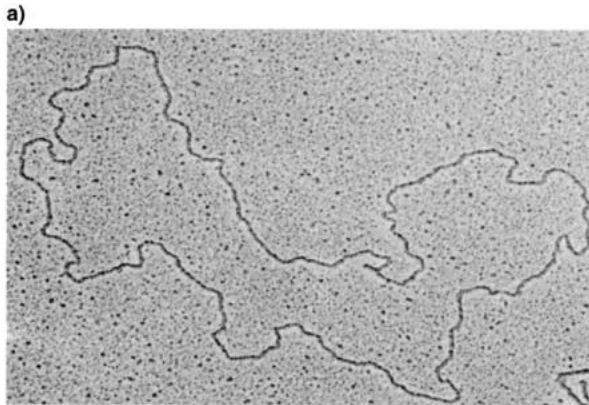
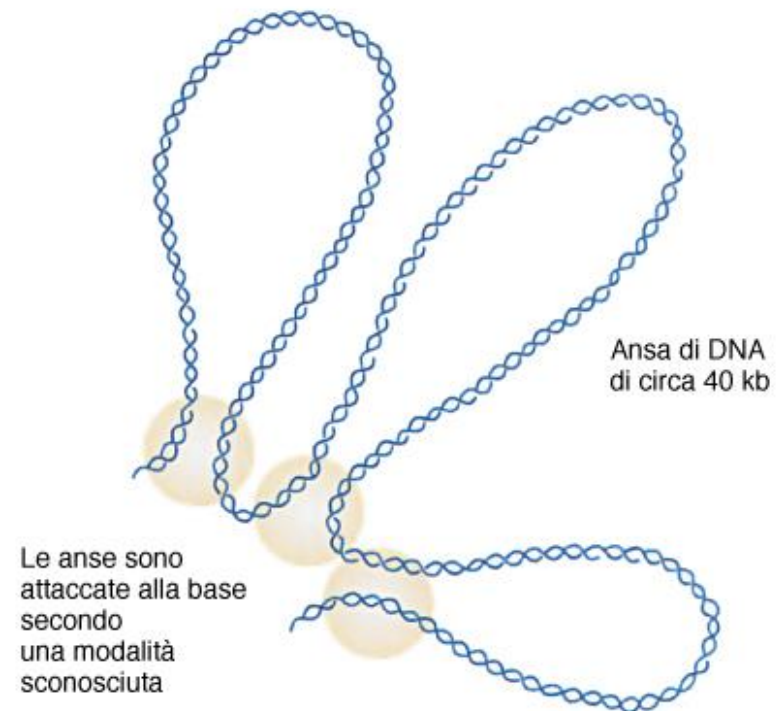
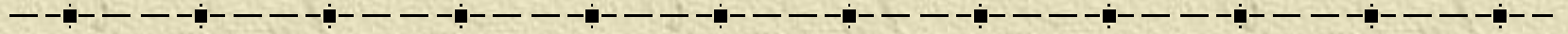


Figura 2.24

Modello della struttura di un cromosoma batterico. Il cromosoma è organizzato in domini ad ansa, le cui basi sono ancorate secondo una modalità sconosciuta.



Cromosomi eucarioti



La maggior parte degli eucarioti presenta un **genoma diploide**.

La quantità totale di DNA del genoma aploide di una specie è definito come il **valore C**.

Non vi è relazione tra il valore C e la complessità di un organismo (*paradosso del valore C*).

Ogni cromosoma eucariote è costituito da una molecola di DNA a doppia elica lineare complessata con una quantità in peso circa doppia di proteine.

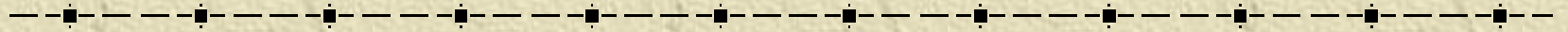
Il complesso DNA-proteine si definisce **cromatina**.

Tabella 2.4 Contenuto di DNA aploide, o valore C, in alcune specie

Specie	Valore C (bp)
Virus e fagi	
λ (batteriofago)	48.502 ^a
T4 (batteriofago)	168.900
Virus della leucemia felina (virus del gatto)	8448 ^a
Virus della scimmia (SV40)	5243 ^a
Virus dell'immunodeficienza umana-1 (HIV-1, agente eziologico dell'AIDS)	9750
Virus del morbillo (virus dell'uomo)	15.894
Batteri	
<i>Bacillus subtilis</i>	4.214.814 ^a
<i>Borrelia burgdorferi</i> (spirocheta della malattia di Lyme)	910.724 ^a
<i>Escherichia coli</i>	4.639.221 ^a
<i>Helicobacter pylori</i> (batterio che causa l'ulcera gastrica)	1.667.867 ^a
<i>Neisseria meningitis</i>	2.272.351 ^a
Archei	
<i>Methanococcus jannaschii</i>	1.664.970 ^a
Eucarioti	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (lievito gemmante; lievito di birra)	13.105.020 ^a
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (lievito)	14.000.000
<i>Lilium formosanum</i> (giglio)	36.000.000.000
<i>Zea mays</i> (mais, granturco)	5.000.000.000
<i>Amoeba proteus</i> (ameba)	290.000.000.000
<i>Drosophila melanogaster</i> (moscerino della frutta)	180.000.000
<i>Caenorhabditis elegans</i> (nematode)	97.000.000
<i>Danio rerio</i> (zebrafish)	1.900.000.000
<i>Xenopus laevis</i> (rospo Africano)	3.100.000.000
<i>Mus musculus</i> (topo)	3.454.200.000
<i>Rattus rattus</i> (ratto)	3.093.900.000
<i>Canis familiaris</i> (cane)	3.355.500.000
<i>Equus caballus</i> (cavallo)	3.311.000.000
<i>Homo sapiens</i> (uomo)	3.400.000.000

^aQuesti valori C sono derivati dalla sequenza completa del genoma; tutti gli altri sono stime basate su altre misurazioni.

Struttura della cromatina



Esistono due tipi di proteine associate al DNA: **istoniche e non-istoniche**.

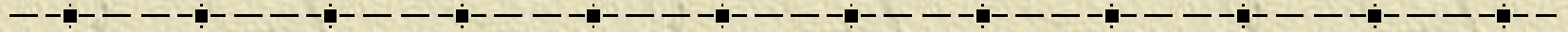
La quantità e proporzione degli istoni rispetto al DNA sono costanti in tutti gli organismi.

Gli istoni sono estremamente conservati durante l'evoluzione.

Gli istoni svolgono un ruolo fondamentale nell'impacchettamento della cromatina.

Il primo livello di impacchettamento è il **nucleosoma**:

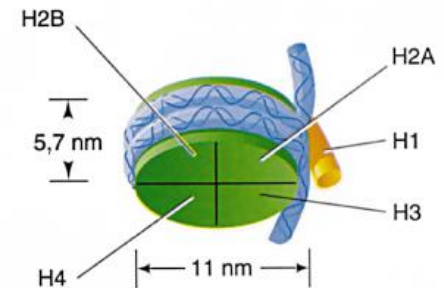
Struttura della cromatina: nucleosoma



In un modello di nucleosoma un corto segmento di DNA è avvolto attorno a 2 molecole per ciascuno dei 4 istoni:

Figura 2.25

Possibile struttura del nucleosoma.



Gli istoni del nucleo sono capaci di autoaggregarsi in un ottamero.

Il DNA compie attorno a questa “tortina” un giro e tre/quarti, il che comporta un compattamento di un fattore 7

Struttura della cromatina: nucleosoma

I singoli nucleosomi sono connessi tra di loro da un frammento di DNA che funge da linker e da molecole dell'istone H1.

Le strutture risultanti possono essere osservate al microscopio elettronico come fibre di cromatina di 10 nm (**nucleofilamenti di 10 nm**).

Figura 2.26

Nucleosomi uniti insieme dal DNA linker e dall'istone H1 a produrre la forma estesa di cromatina "a collana di perle".

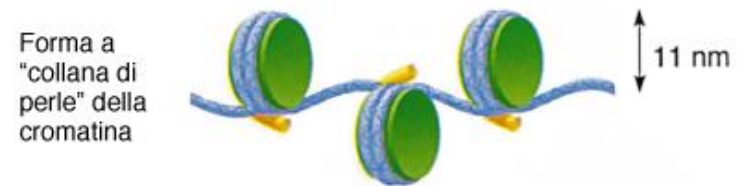
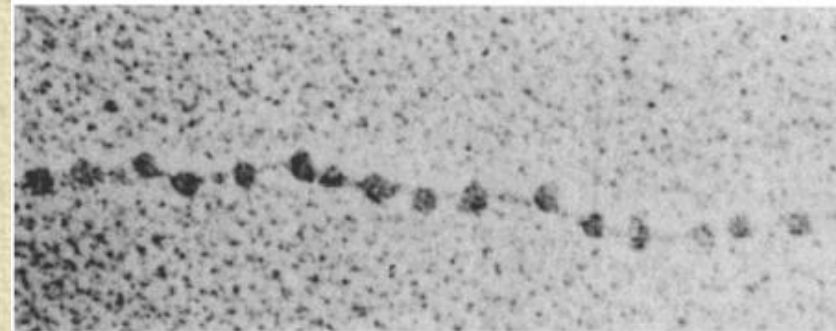
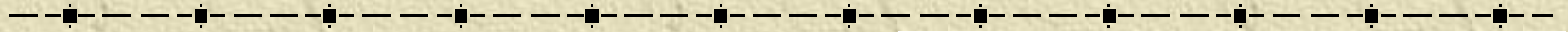


Figura 2.27

Fotografia al microscopio elettronico di cromatina distesa che mostra i nucleosomi con la morfologia "a collana di perle".



Struttura della cromatina: nucleofilamenti



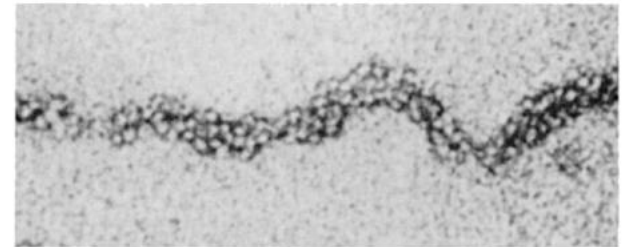
Nella cellula questi nucleofilamenti si compattono in una struttura maggiormente densa chiamata **nucleofilamenti a 30 nm.**

Il DNA si condensa di un sesto rispetto all'organizzazione precedente

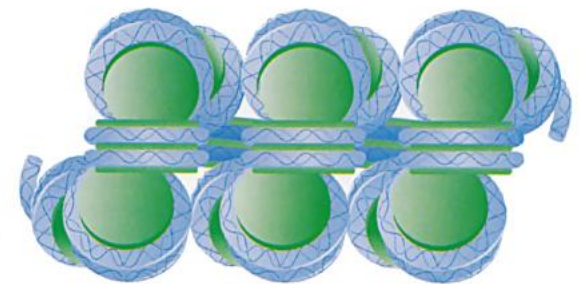
Figura 2.28

La fibra di cromatina di 30-nm. (a) Fotografia al microscopio elettronico. (b) Modello d'impacchettamento dei nucleosomi nella fibra di cromatina di 30-nm.

a)



b)



Struttura della cromatina:



Il livello successivo di impaccamento implica la formazione di domini ad ansa.

Questi domini sono ancorati ad un'intelaiatura strutturale proteica all'interno della membrana nucleare chiamata *matrice nucleare*.

Le sequenze di DNA associate alle proteine nella matrice sono chiamate MAR.

L'organizzazione della cromatina in anse è importante anche per la trascrizione genica.

Figura 2.29

Modello schematico dell'organizzazione della fibra di 30-nm in domini ad ansa, ancorati ad un'impalcatura di proteine non-istoniche.

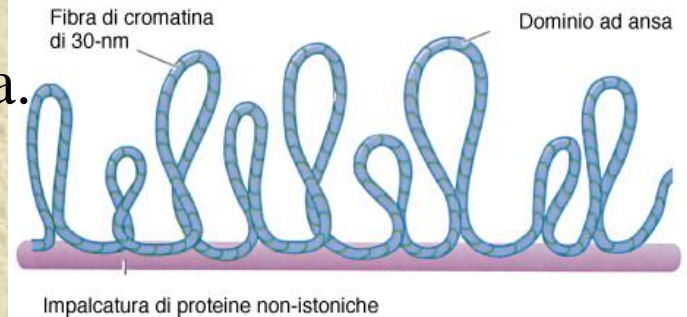


Figura 2.30

Fotografia al microscopio elettronico di un cromosoma metafasico privato degli istoni. Il cromosoma mantiene la sua morfologia generale attraverso un'impalcatura di proteine non-istoniche, da cui sporgono le anse di DNA.

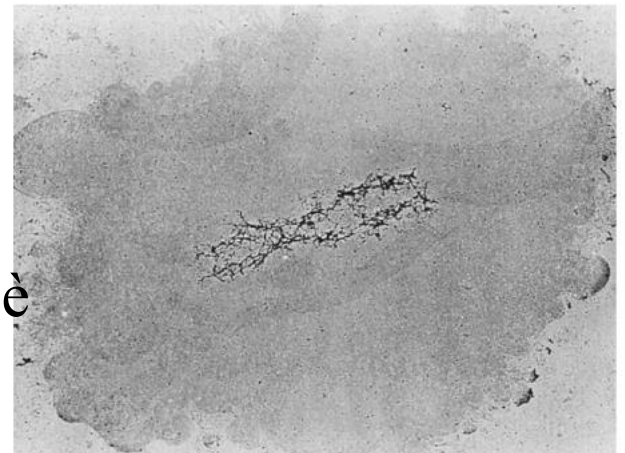
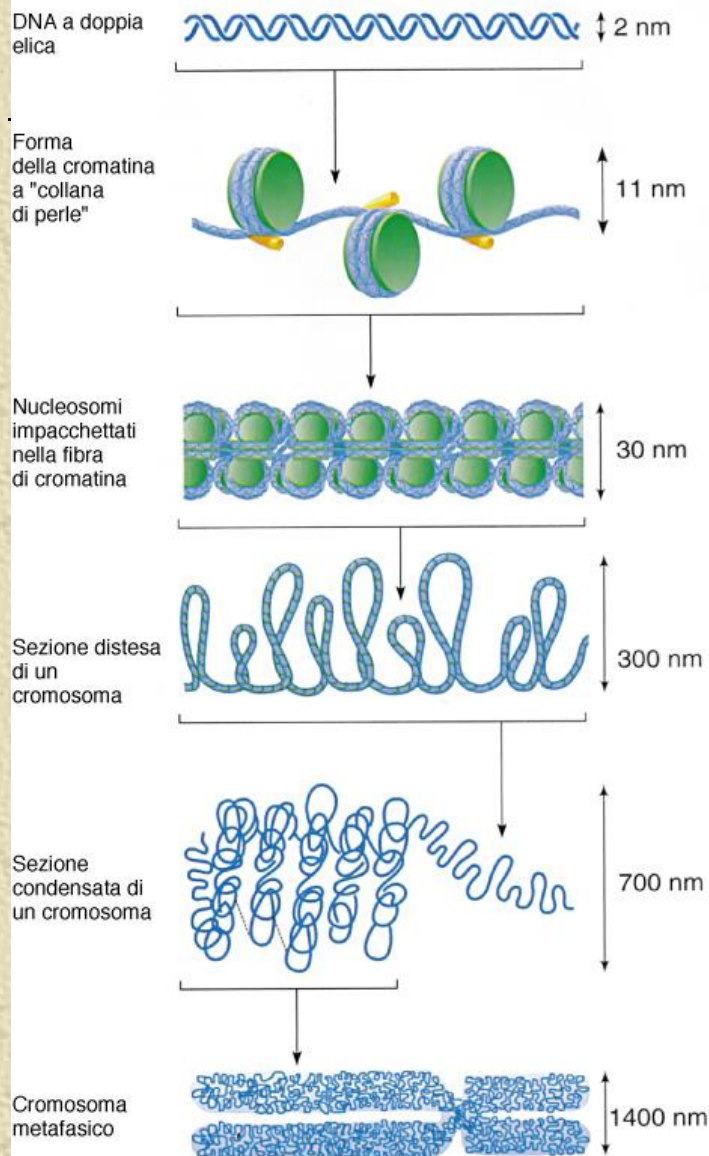


Figura 2.31

Rappresentazione schematica dei diversi ordini di impacchettamento della cromatina, alla base del cromosoma metafase altamente condensato.



Eucromatina ed eterocromatina

Eucromatina: rappresenta i cromosomi e le regioni cromosomiche che manifestano la normale alternanza di condensazione decondensazione durante il ciclo cellulare. La maggior parte del genoma di una cellula attiva è eucromatina. I geni sono espressi e ci sono poche sequenze ripetute.

Eterocromatina: regioni che rimangono condensate anche in interfase. Può essere *costitutiva* se è presente nella stessa posizione del cromosoma in tutte le cellule (centromeri). Oppure può essere *facoltativa* se varia di condensazione nei tipi cellulari, in diversi stadi di sviluppo. (corpo di Barr).

DNA centromerico e telomerico

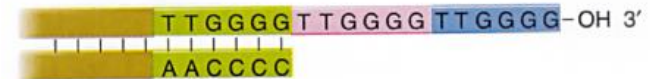
I **telomeri** possono essere suddivisi in due tipi:

1. *Sequenze telomeriche semplici* sono la componente essenziale dei telomeri, garantiscono la stabilità. Sequenze semplici ripetute in tandem. Il DNA è a singolo filamento e si avvolge a formare un loop che stabilizza e protegge i cromosomi.
2. *Sequenze associate ai telomeri* DNA ripetuto anche per migliaia di bp dal significato sconosciuto

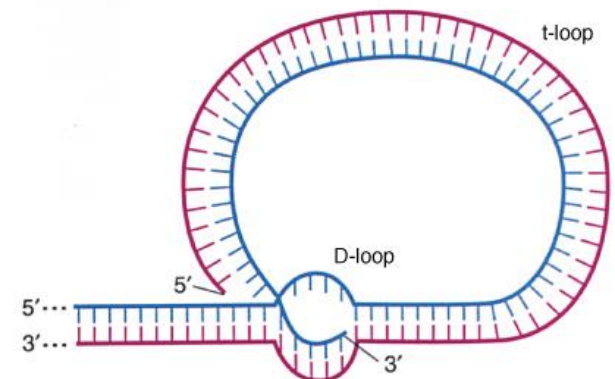
Figura 2.34

Telomeri. (a) Sequenze telomeriche semplici all'estremità dei cromosomi di *Tetrahymena*. (b) Modello di struttura del telomero in cui il DNA telomerico si avvolge all'indietro a formare un'ansa (t-loop). L'estremità a singolo filamento s'insinua tra le sequenze telomeriche a doppio filamento formando un cosiddetto displacement loop (D-loop).

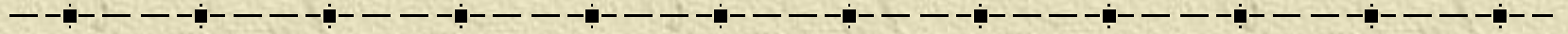
a) Sequenze telomeriche semplici di *Tetrahymena*



b) Modello a t-loop per i telomeri



DNA a sequenze uniche

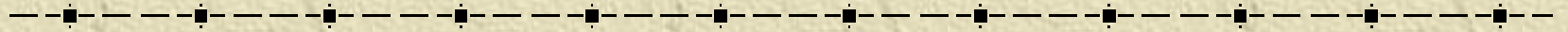


Il DNA genomico si divide quindi in **sequenze uniche** (presenti in singola o poche copie); **DNA moderatamente ripetuto** (presente fino a 10^5 copie); **DNA altamente ripetuto** (presente fino a 10^7 copie).

sequenze uniche

Sono le sequenze che compongono i geni, le sequenze regolatrici e nell'uomo corrispondono a circa il 65% del genoma.

DNA a sequenze ripetute



DNA a sequenze ripetute: possono essere sparse e a tandem.

Le ripetute sparse si dividono in due famiglie a seconda della loro dimensione:

SINE “corte sequenze ripetute sparse” dalla dimensione variabile tra le 100 e 500 bp. La famiglia *Alu* $9 \cdot 10^5$ ripetizioni da 200-300 bp per circa il 9% del genoma umano.

LINE “lunghe sequenze ripetute sparse” lunghe circa 5000 bp. Possono essere trasposoni