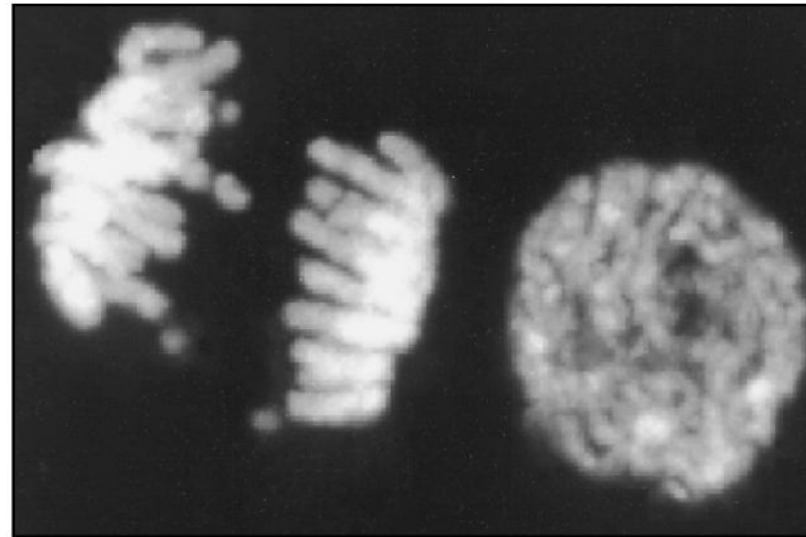


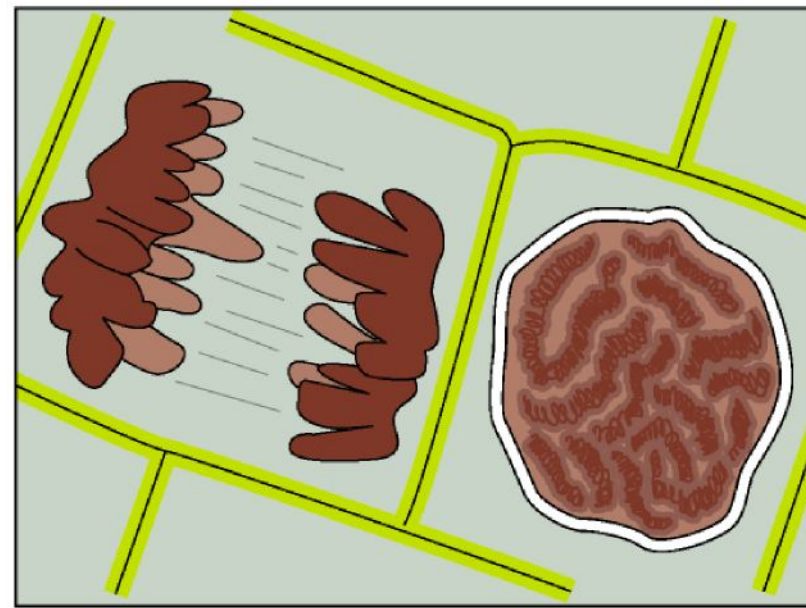
DNA e CROMOSOMI

Come il DNA si replica, si ripara e ricombina

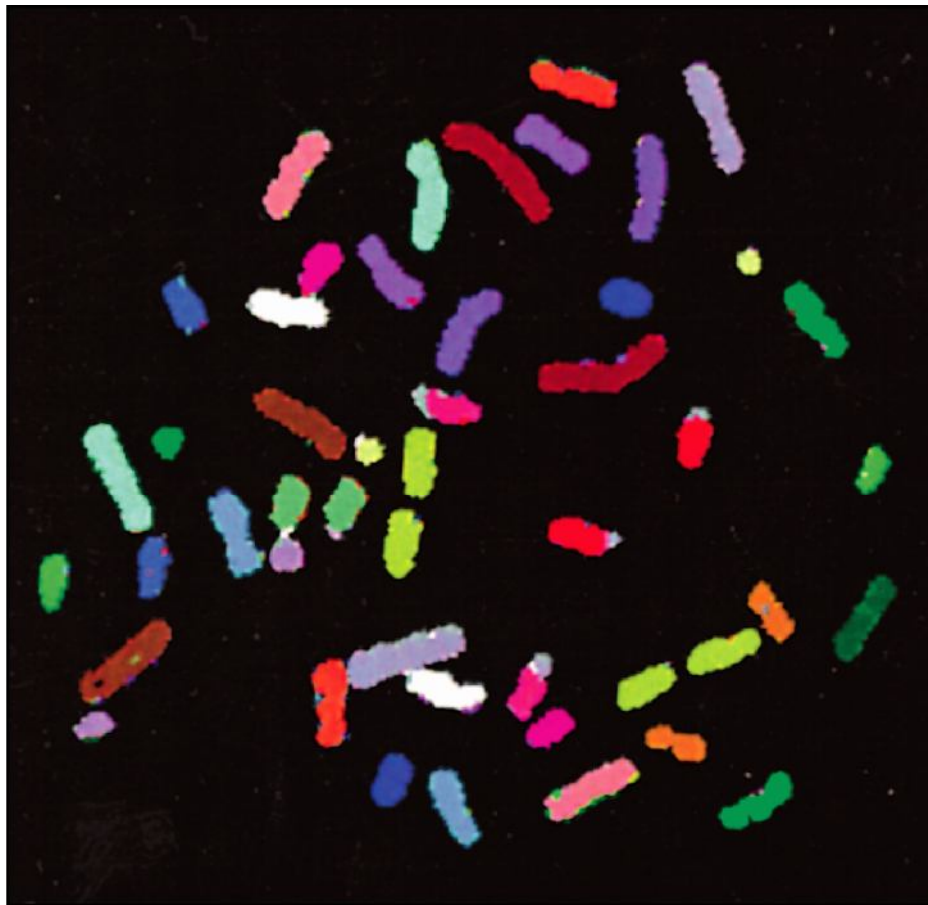


cellula
in divisione

cellula che non si sta
dividendo



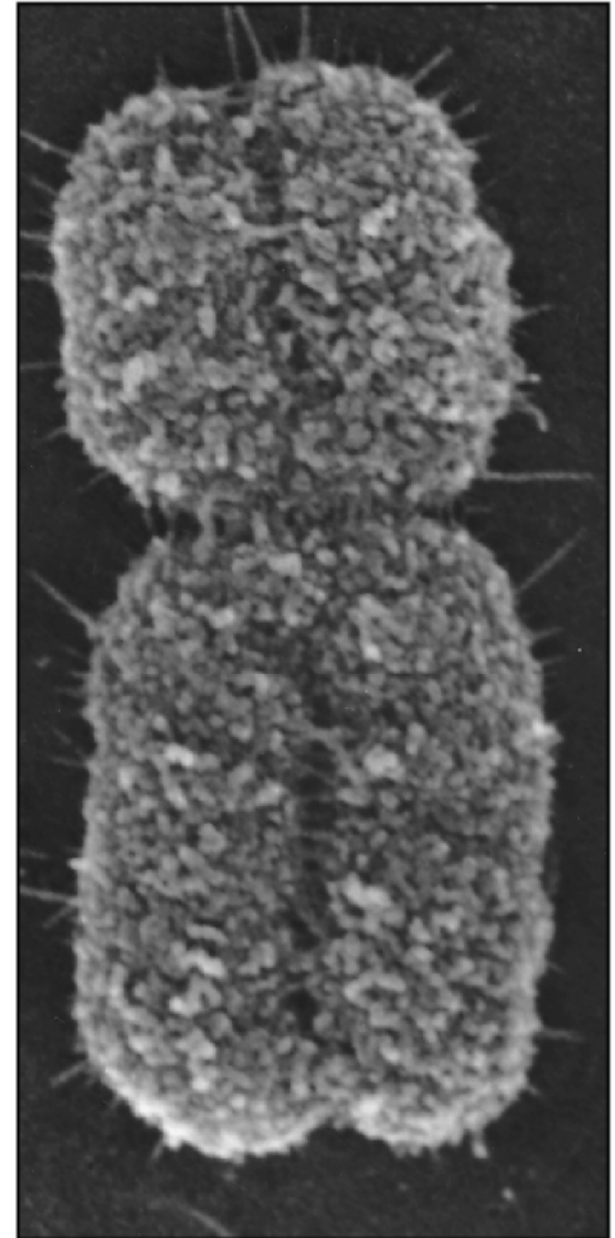
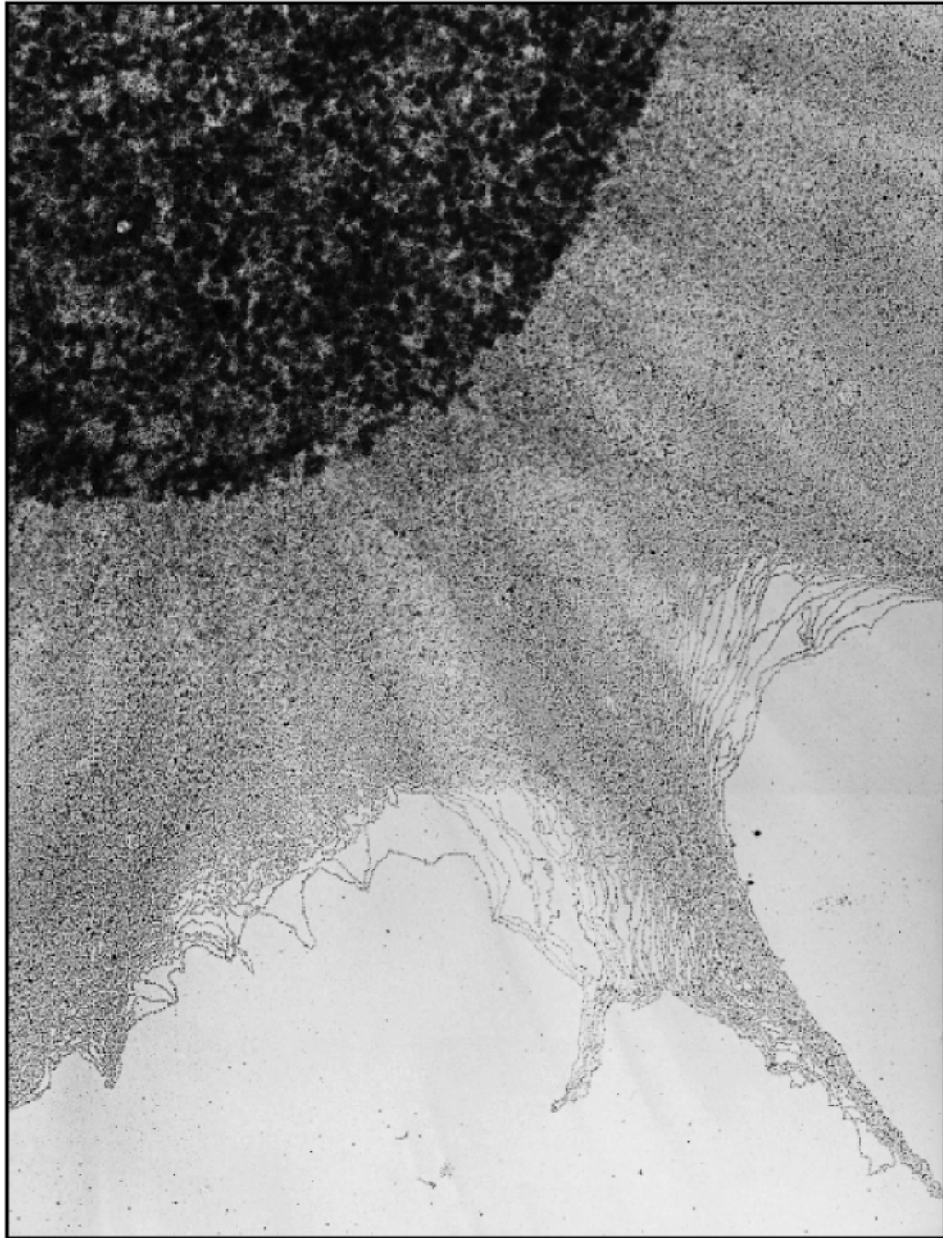
10 μm



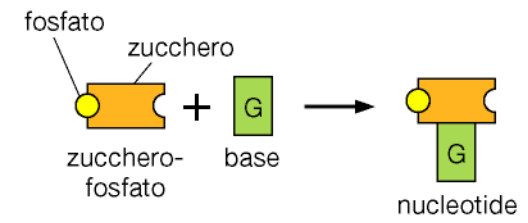
(A)



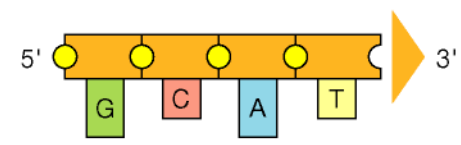
(B)



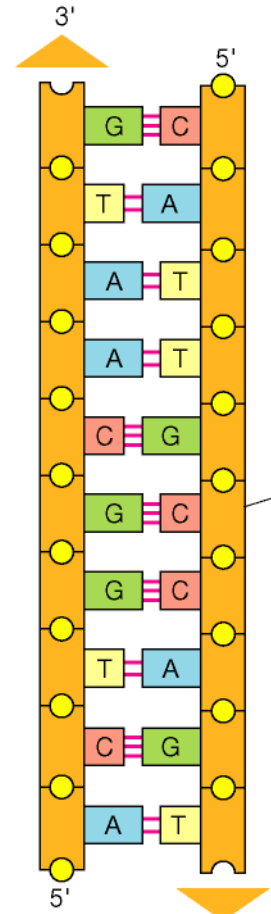
elementi costitutivi del DNA



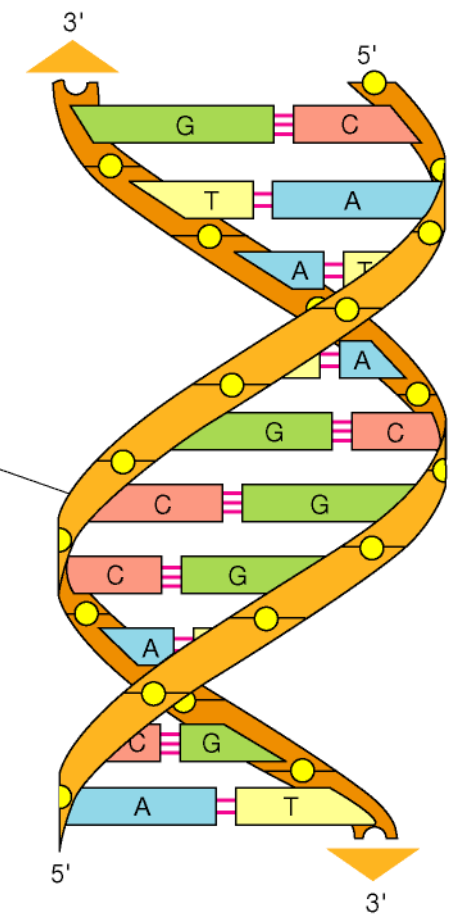
filamento di DNA



doppio filamento di DNA



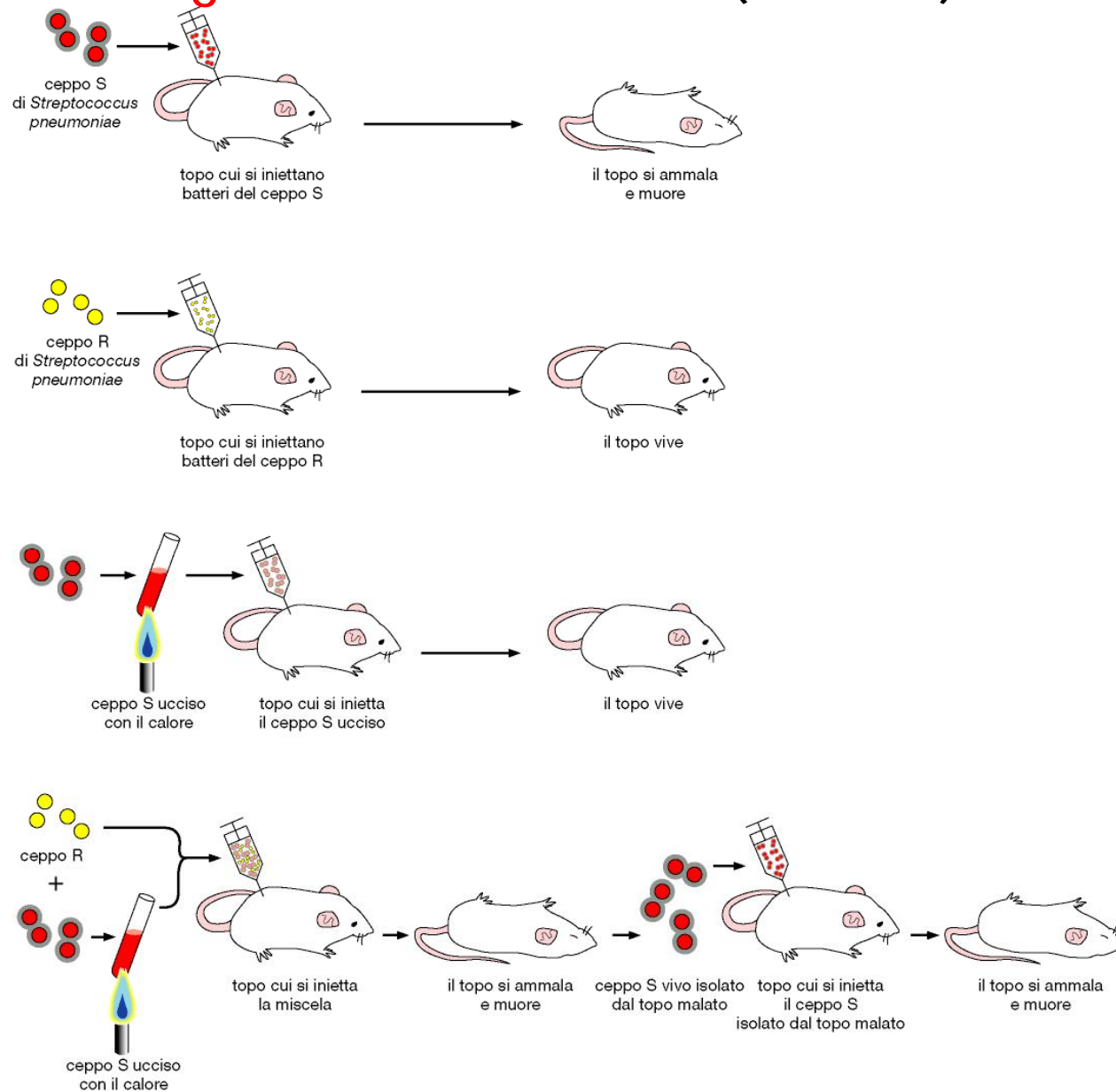
doppia elica di DNA



ossatura
zucchero-fosfato

coppie di basi unite da legami idrogeno

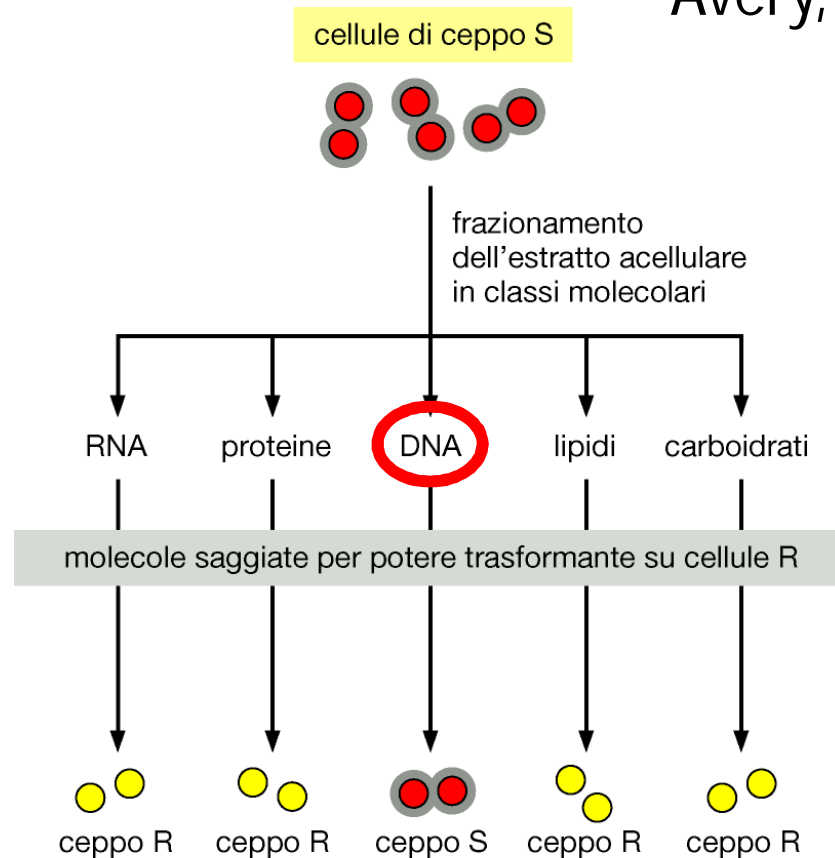
Nel 1928 venne dimostrato che il **DNA** è il **materiale genetico** dei batteri (Griffith)



Alcune proprietà dei batteri S morti possono *trasformare* i batteri vivi R così che essi producano il polisaccaride capsulare e diventino virulenti

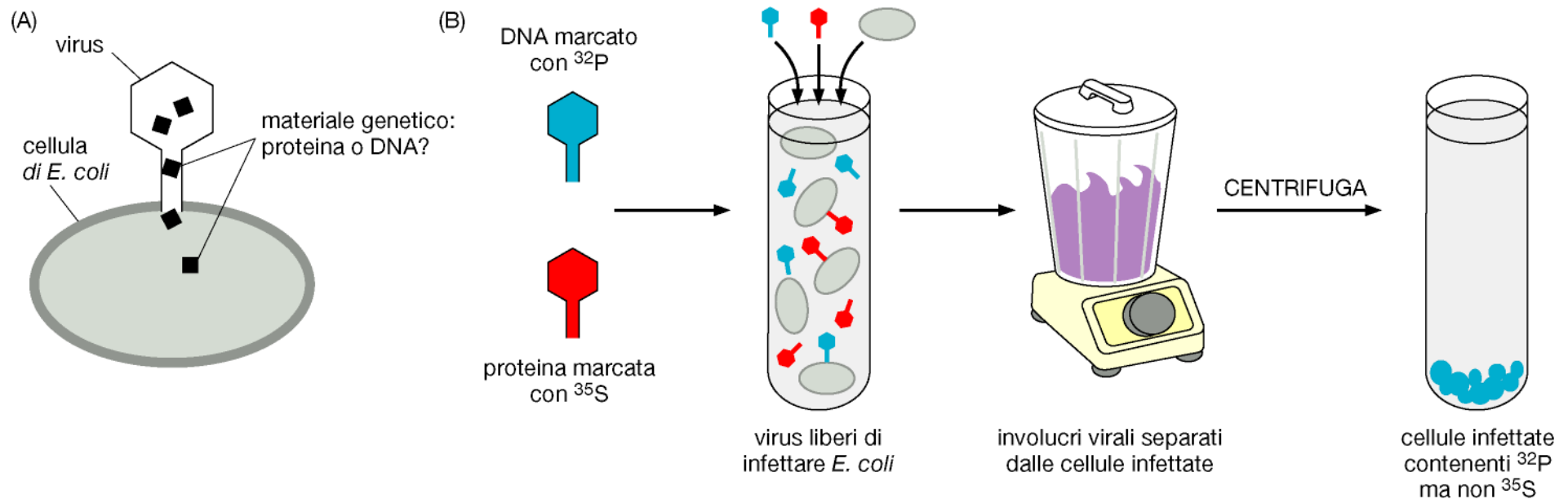
PRINCIPIO TRASFORMANTE

Avery, MacLeod, McCarty



CONCLUSIONE: la classe di molecole che porta l'informazione ereditabile è il DNA.

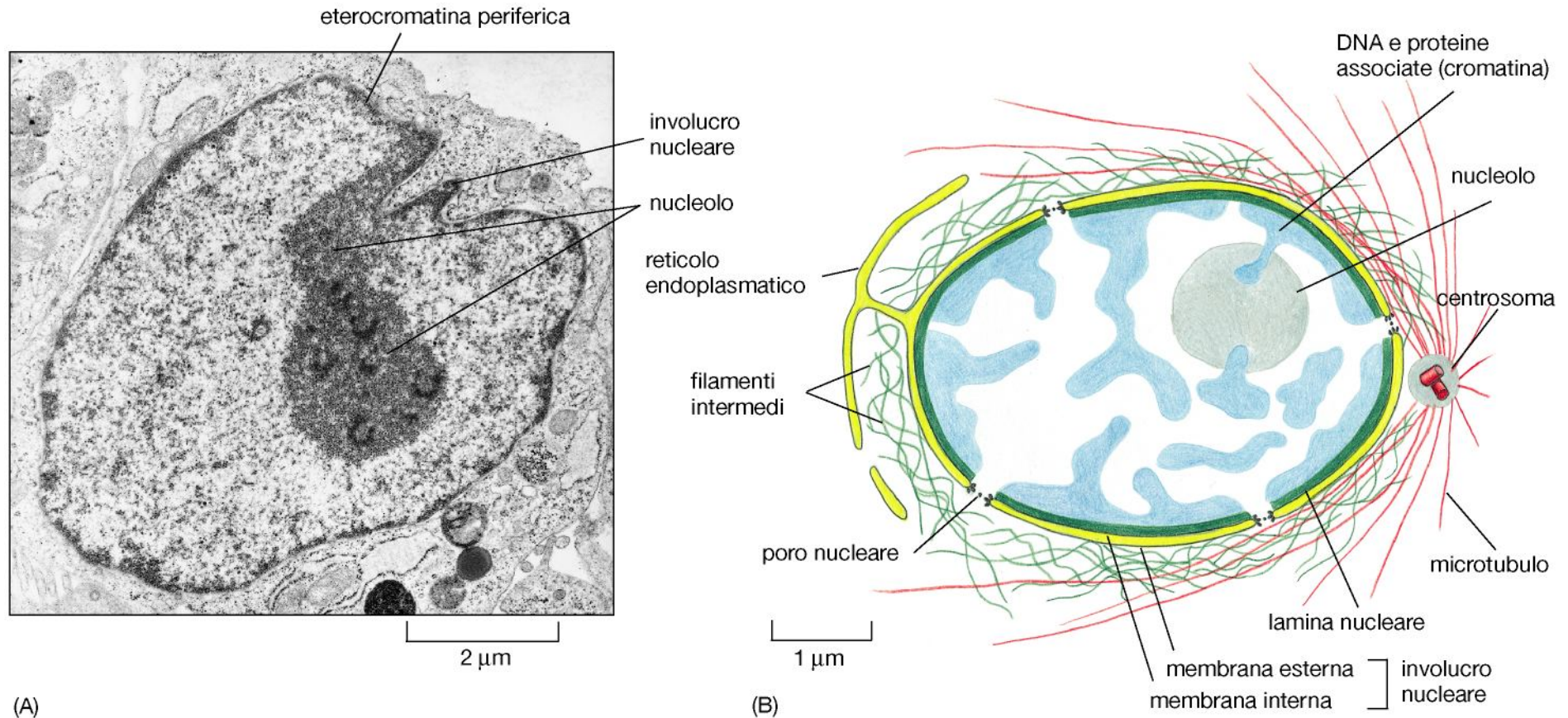
Nel 1952 venne dimostrato che il **DNA** è il **materiale genetico** dei virus (Hershey e Chase)
(In alcuni virus il materiale genetico è l' **RNA**)



Quando il DNA e i componenti proteici dei batteriofagi sono marcati con isotopi radioattivi diversi, soltanto il **DNA è trasmesso alla progenie fagica** prodotta infettando dei batteri

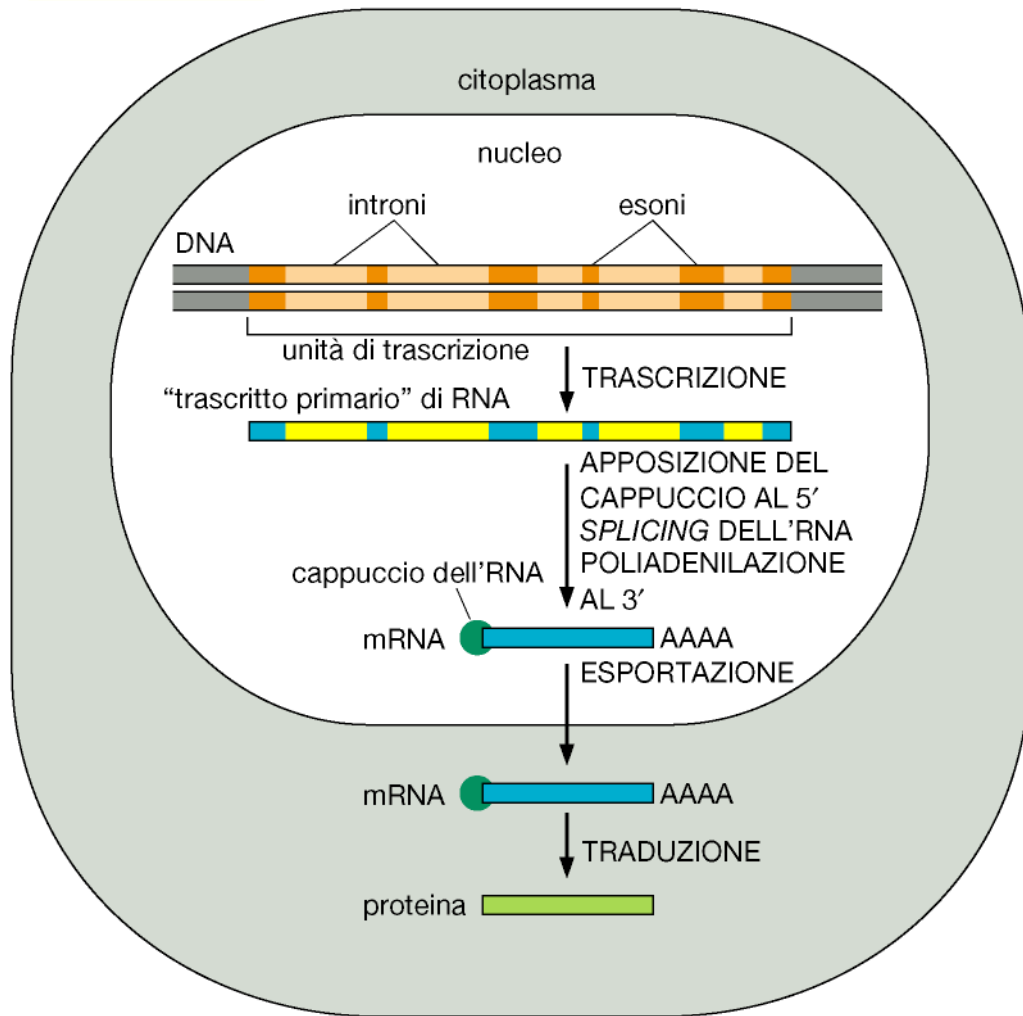
Esperimenti di **trasfezione** (equivalente negli eucarioti della trasformazione batterica) hanno dimostrato che il **DNA è il materiale genetico anche delle cellule animali**

Probabili ragioni per cui il **nucleo** avrebbe fatto la sua comparsa

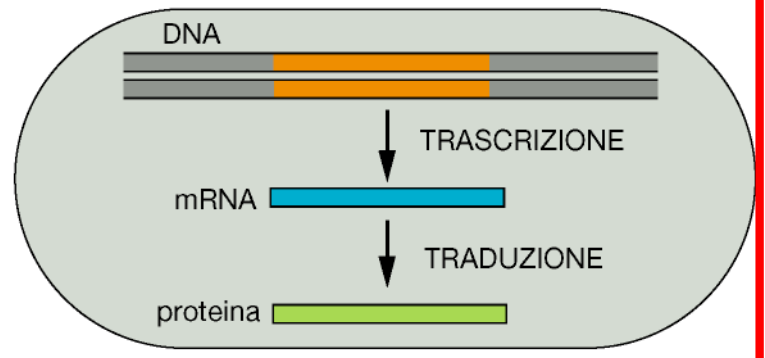


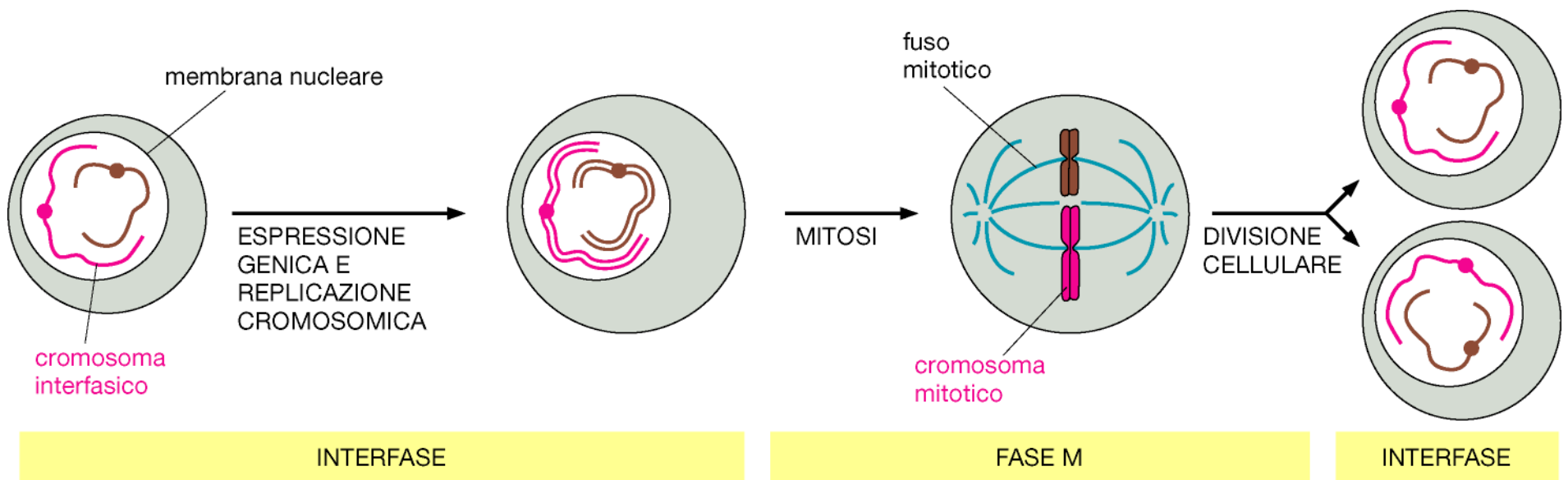
- per proteggere le lunghe e fragili molecole di DNA da urti meccanici
- per mantenere separate spazialmente e temporalmente trascrizione e traduzione
- perché il meccanismo dello *splicing* non venga disturbato dai ribosomi

(A) EUCARIOTI

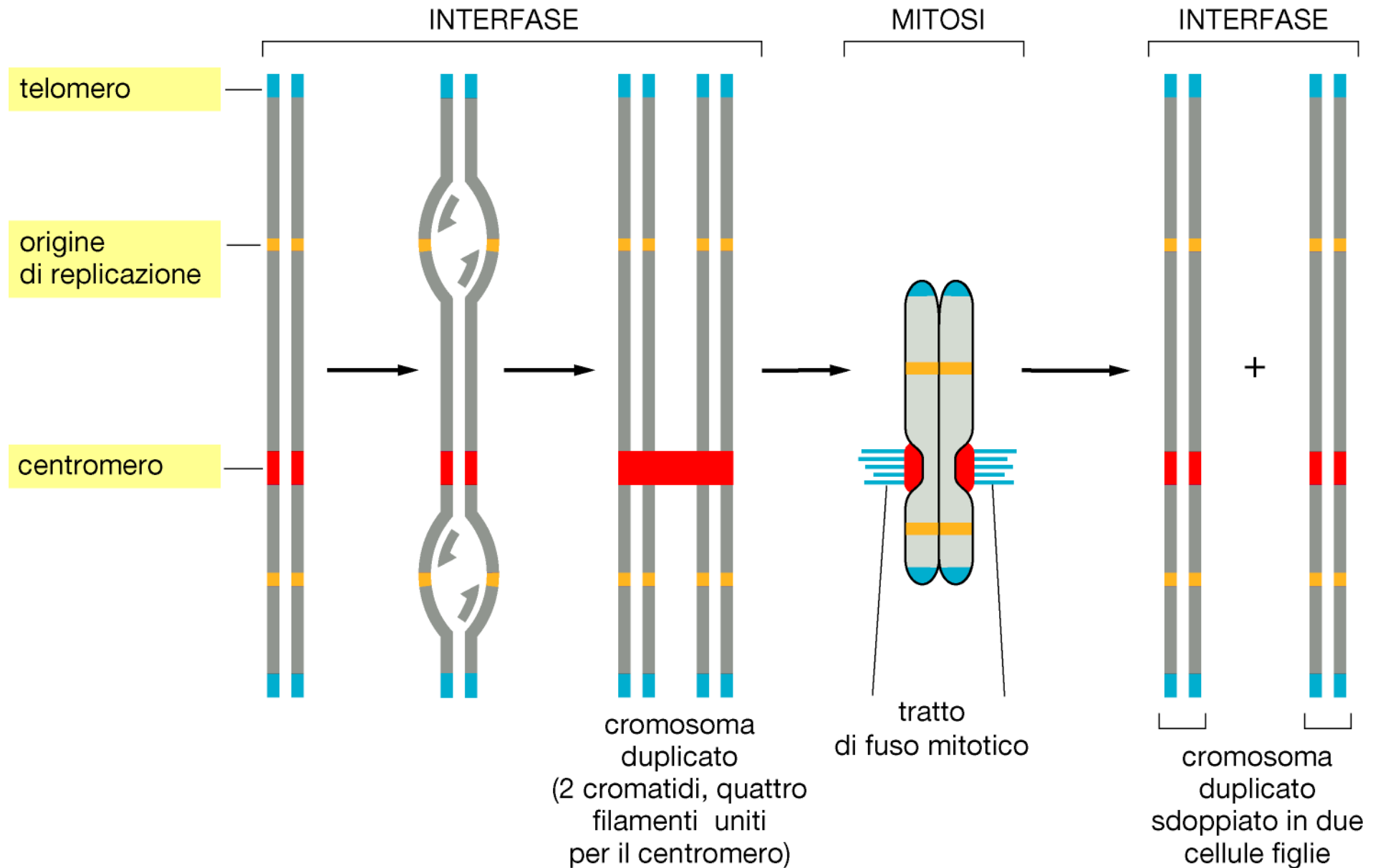


(B) PROCARIOTI

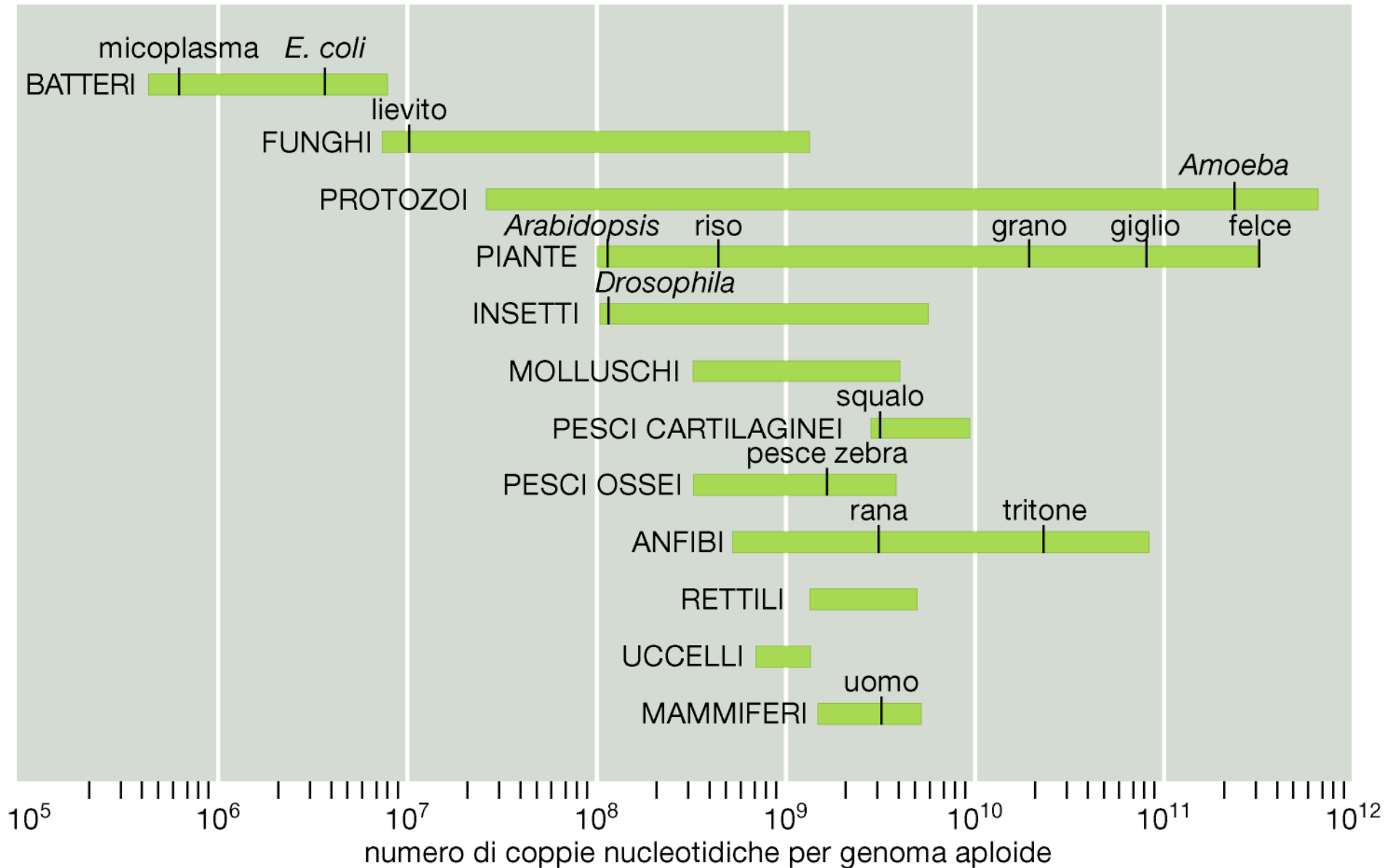




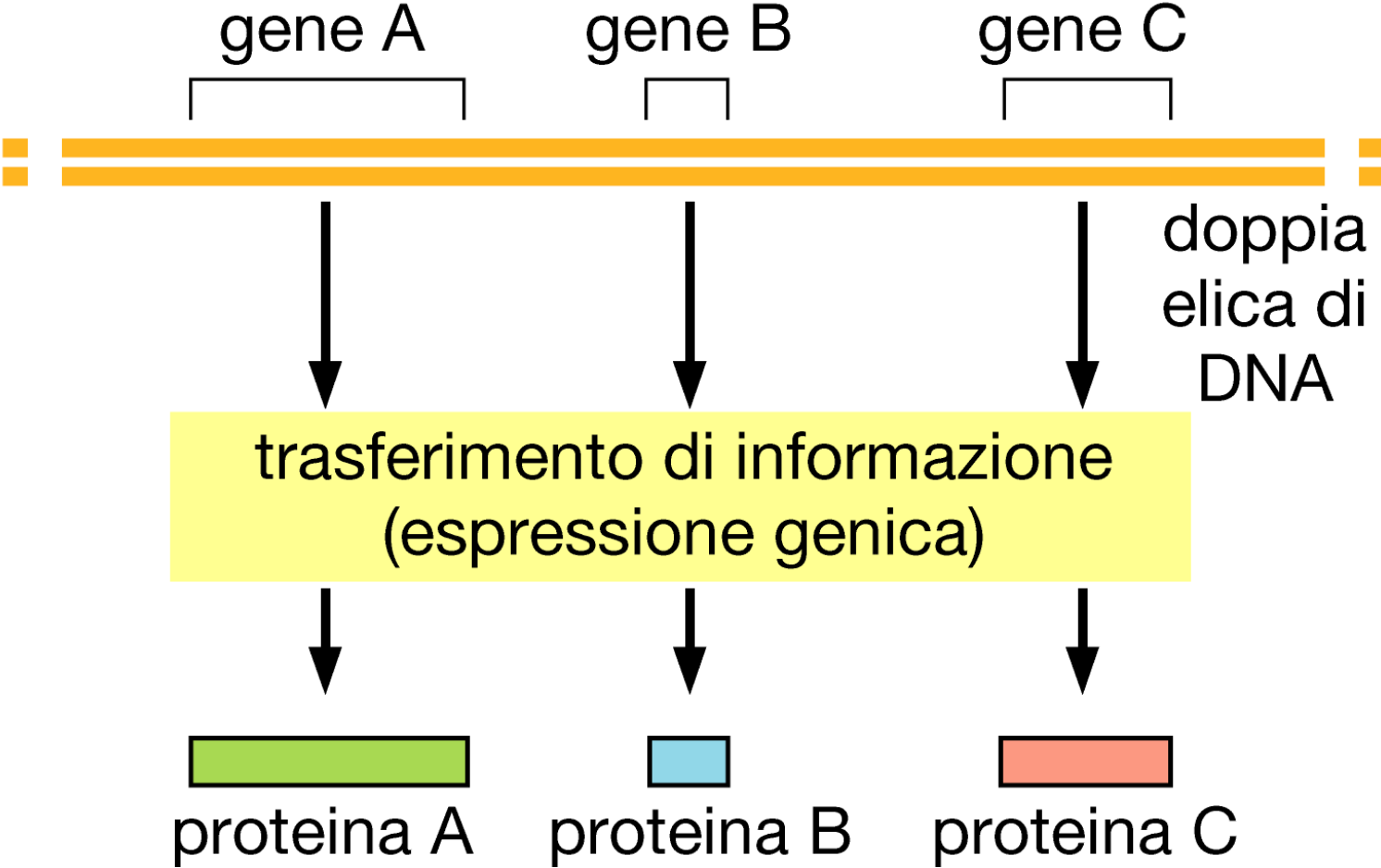
I tre elementi della sequenza di DNA necessari a produrre un cromosoma eucariotico stabile



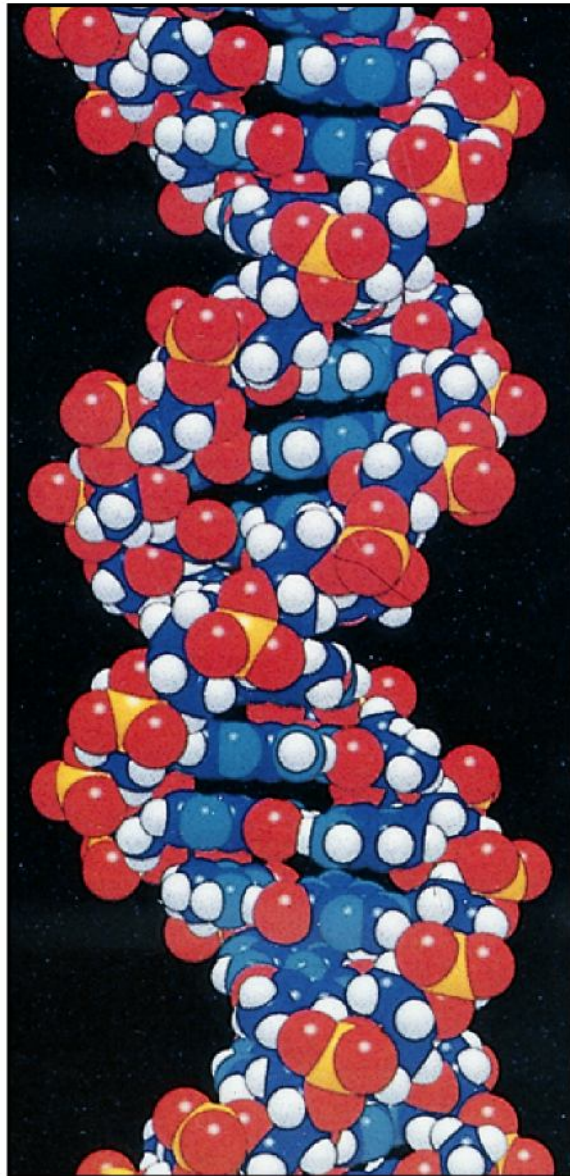
Quantità di DNA presente in un genoma aploide



Un gene è un'unità funzionale complessa che serve a realizzare la produzione regolata di una molecola di RNA



```
CCCTGTGGGCCACACCCCTAGGCTTGGCCA
ATCTACTCCAGGACAGGAGGAGGAGGAG
CCAGGGCTGGGCATANAAGTCAGGGCAGAG
CCATCTATTCGCTTAGATTTCCTCTGACAC
AACTGTGTTCACTAGCAACTCAACAGACA
CCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGAGAGT
CTCCCGTACTGCCTGTG39GGCAGGTGA
ACCTGGATGAAGTGGGTGGAGGCCCTGG
GCAGTTGGTATCAAGGTTACAAAGCAGGT
TTAGGAGACCAATAGAAGCTGGCATGTG
GAGCAGAGGAGACTCTTGGTTCTGATA
GGCACTGACTCTCTGCTTATTTGGTCTAT
TTTCCACCCCTTAGSCTGTGGTGGTCTAC
CCTTGGACCCAGAGGTTCTTGGATCCTTT
GGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTATG
GGCAACCCTAGGTGAGGCTCATGGCAAG
AAGTGTCTCGTCCCTTAGTATGGCTTG
GCTCACCTGGACACCTCAAGGGCACCTTT
GCCACACTGAGTGAAGCTGACTGTGCAAG
CTGCACCTGGATCCTGAGACTTCAGGCTG
AGTCTATGGACCCCTGATGTTTCTTCC
CCTTCTTCTATGTTTAAAGTCAATGTCAT
AGGAGGGGAGAGTAAACAGGCTACAGTT
AGAATGGGAACAGACAGAAATGTCATCA
GTGTGGAAGCTCAGGATCCTTTAGTTC
TTTTATTTGCTGTCAATACAAATGTTTC
TTTTGTTTAAATCTTGCCTTCTTTTTTT
CTTCTCCGGAATTTTACTATTAATCTAA
TGCTTAAAGTGTGATACAAAGGAA
TATCTGTAGATACATTAAGTAACTAA
AANAACITTAGACAGTCTGCCACTACATT
ACTATTTGGAATATATGTGGCTAATTCG
ATATTCATATCTCCCTACTTTATTTCTT
TTATTTTAAATGATACATAATCAATAAC
ATATTTAGGGTTAAGGTAAATGTTTAA
TATGTGTACACATATGACCAATCAGGGT
AATTTGCAATTTGTAATTTAAAAAATGCT
TTCTCTTTTAAATACCTTTTGTTRTC
TTATTTCTAATCTTTCCTAATCTCTTC
TTTCAGGGCAATATGATACAAATGATCAT
GCCTCTTTGCACCAFTTAAAGAAATACAG
TGATAA.TTCTGGGTTAAGGCAATAGCAAT
ATTTCTGCAATAAATAATTTCTGCATATA
ATTTAAGTGAATGTAAGAGTTTCAATATG
CTAATAGCAGTACAAATCAGCTACCAATC
TGCCTTATTTATGTTGGTGGATAGGCTG
GATTTATCTAGTCCCAAGCTAGGCCCTTT
GCTAATCATGTTCAATCCTTATCTTCCT
CCGACAGCTCTGGGCAAGGCTGCTGCTC
TGTTGCTGGCCATCACTTTGGCAAGAATT
CACCCACCACTGCAGGCTGCCATCAGAA
AGTGTGGCTGGTGGCTAATGGCTGGC
CCACAGTACTACTAGCTCGCTTCTTCTG
TGTCAAATTTCTAATTAAGGTTCTTGTG
CCCTAGTCCACTACTAACTGGGGATA
TTATCAAGGCCCTTGACCACTGGATTCG
CCATATAAACAATTTATTTCAATGCAA
TGATGATTTAAATATTTCTGAAATTTT
ACTAAAAGGGATGTGGAGGTCAGTGA
TTTAAACATTAAGAAATGATGAGCTGTC
AACCCTTGGAAATACACTATATCTTAA
CTCCATGAAAGGTTGAGGCTGCACCCAG
CTAATGGCATTGGCAACGCCCTGATGC
CTATGCTTATTCATCCCTCAGAAAGGAT
```



2 nm

0,34 nm

solco
secondario

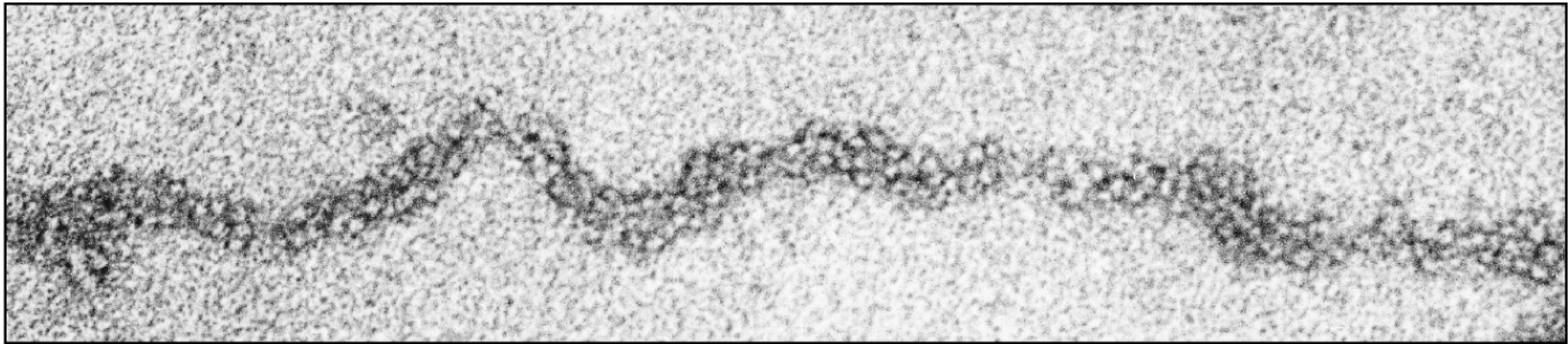
solco
principale

I cromosomi contengono
proteine legate a specifiche
sequenze del DNA

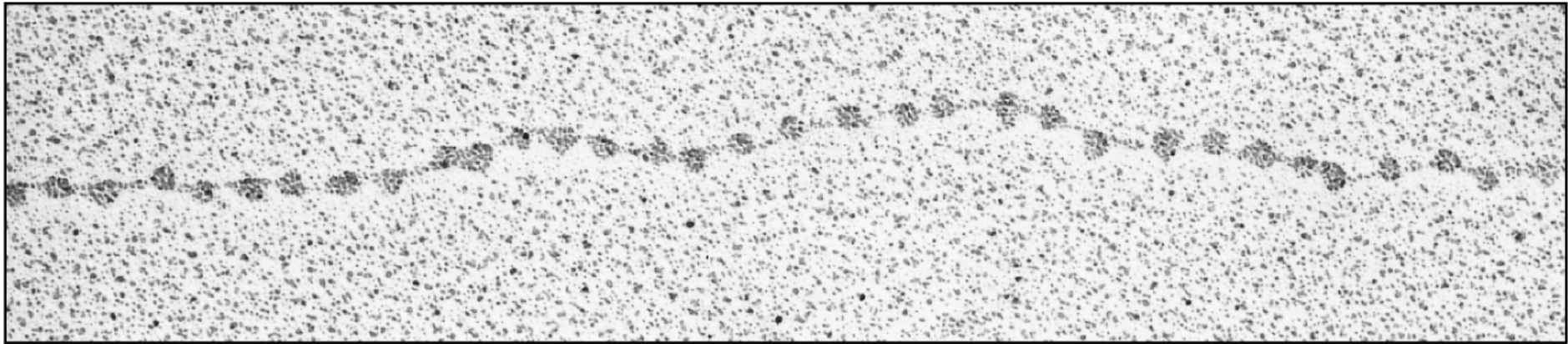
La geometria dell'elica di
DNA dipende dalla sequenza
nucleotidica (la struttura più
stabile è la **forma B**,
elicoidale destrorsa; la **forma
A** è un'altra elica destrorsa; la
forma Z è una doppia elica
sinistrorsa

Le proteine sono in grado di
avvolgere il DNA in spire
strette: **NUCLEOSOMI**

Gli **ISTONI**, le **proteine non
istoniche** ed il DNA nucleare
costituiscono la **CROMATINA**

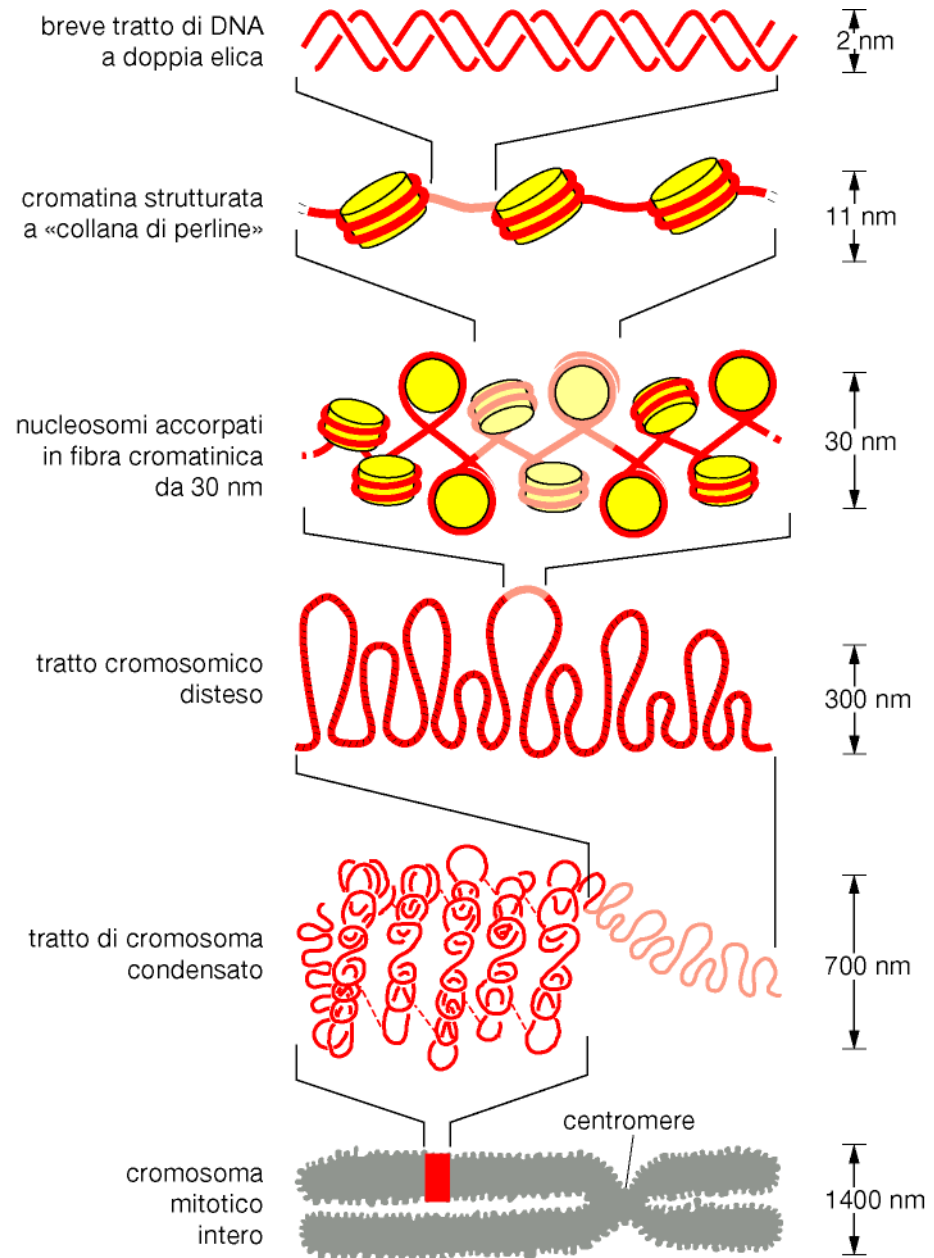
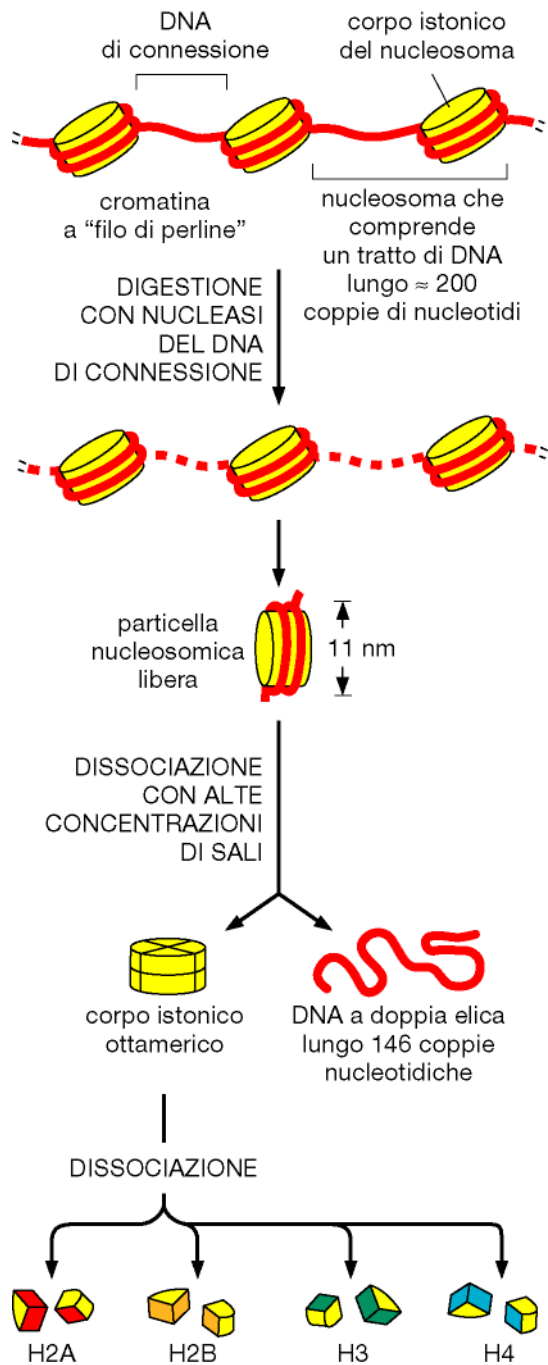


(A)

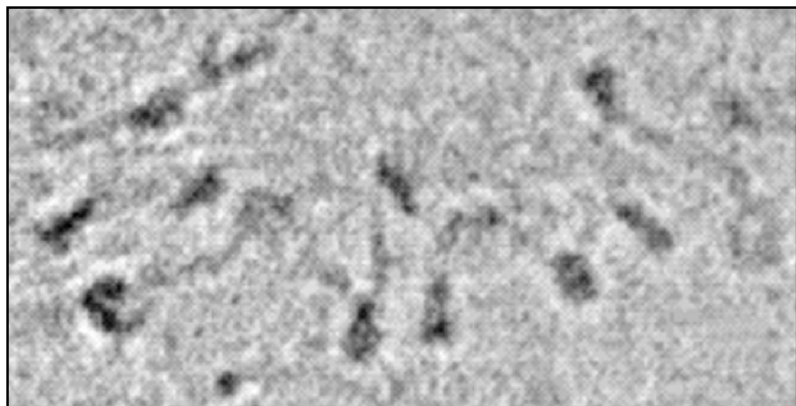


50 nm

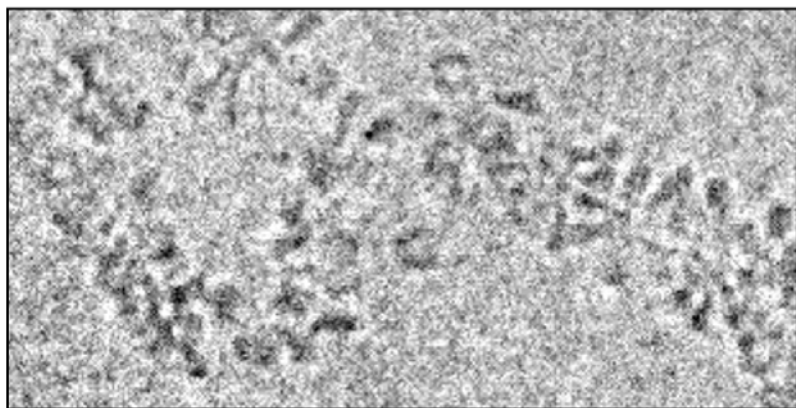
(B)



RISULTATO NETTO: OGNI MOLECOLA DI DNA RISULTA STIPATA IN UN CROMOSOMA MITOTICO 10 000 VOLTE PIÙ CORTO DI QUANDO È DISTESO

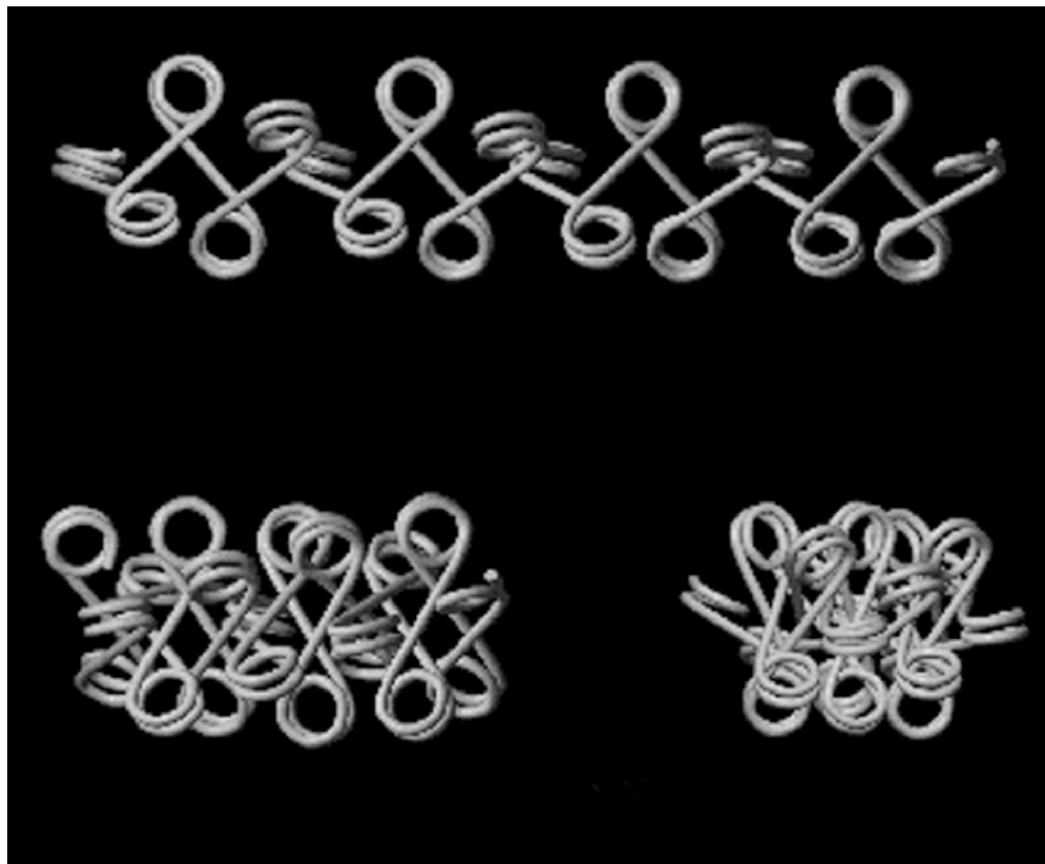


(A)

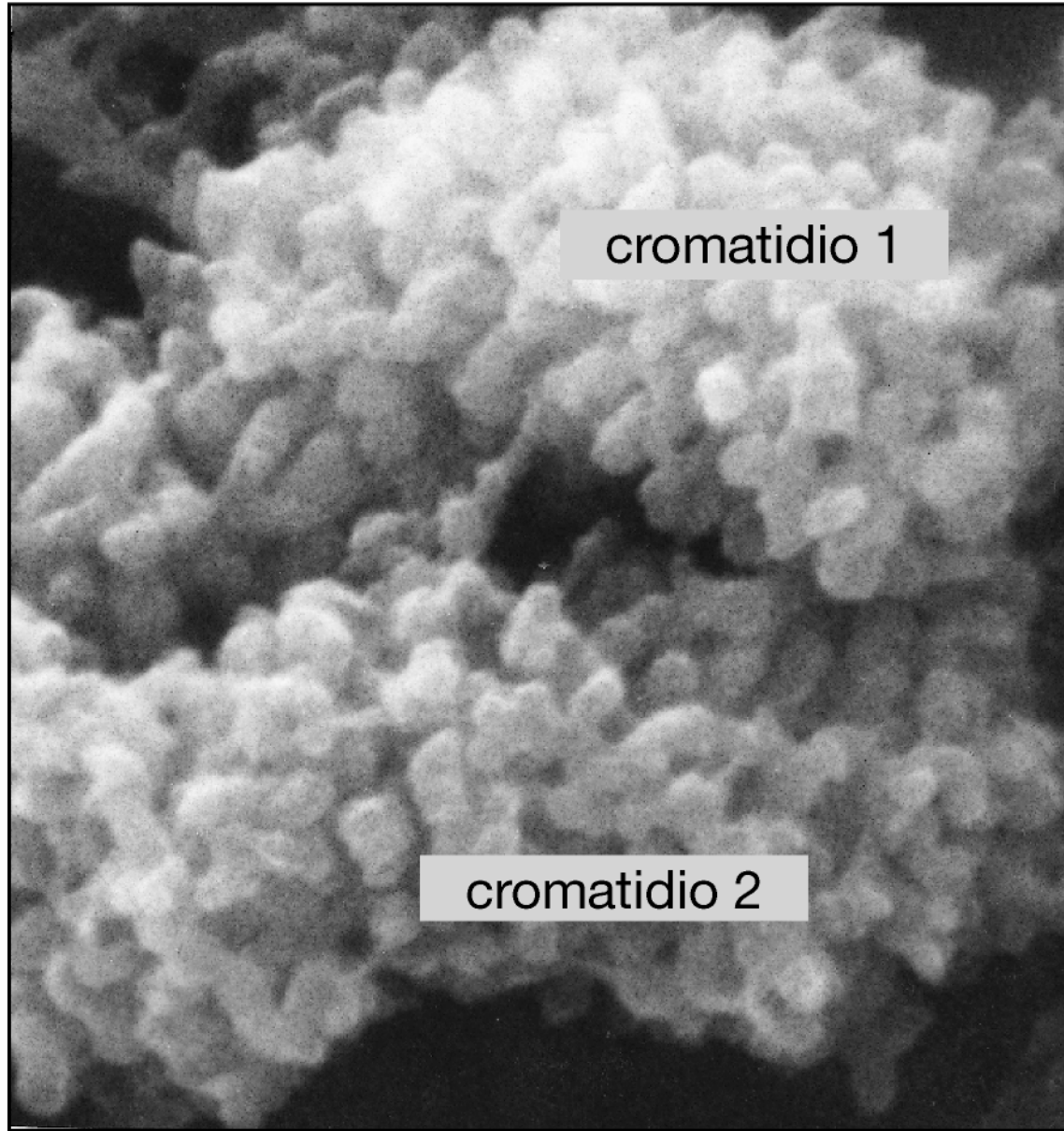


(B)

50 nm



(C)



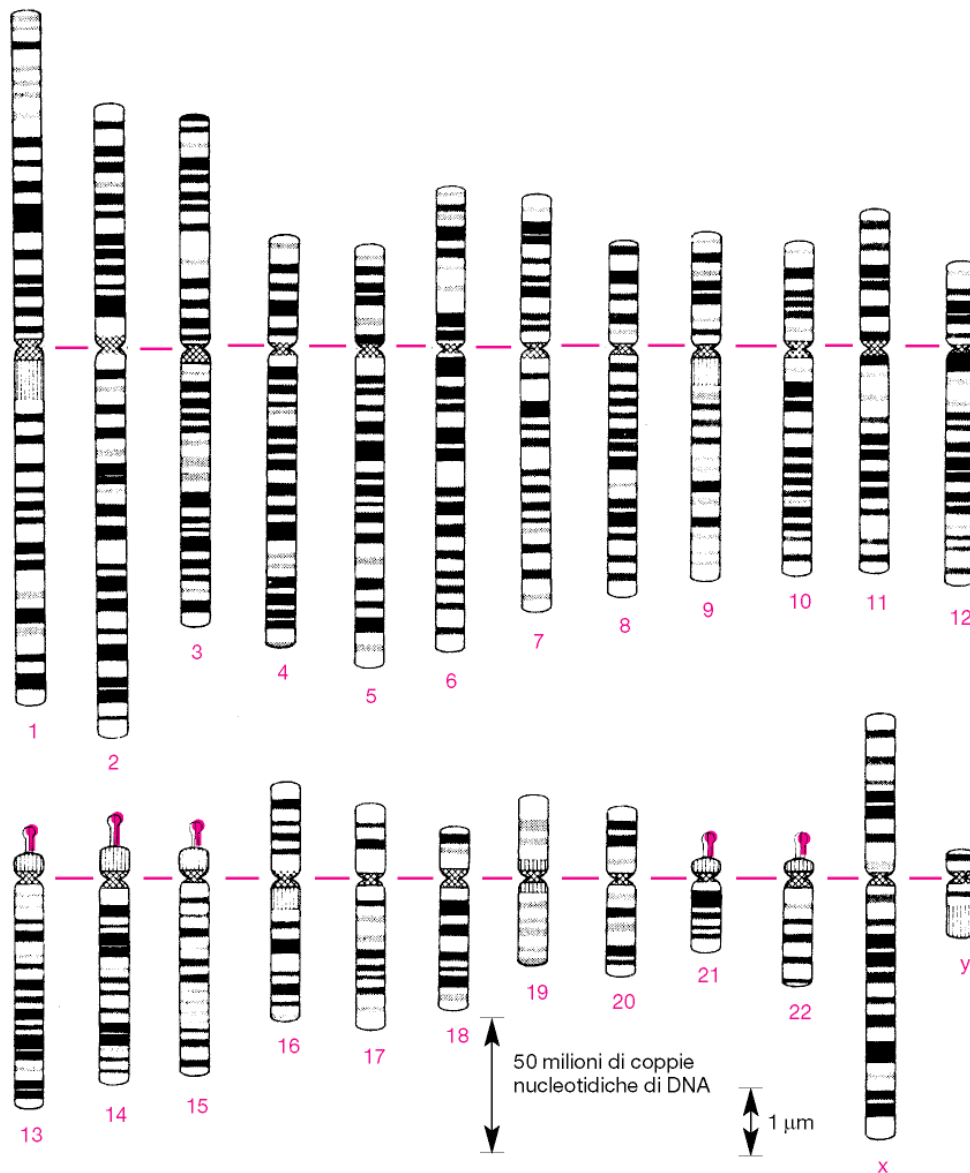
cromatidio 1

cromatidio 2

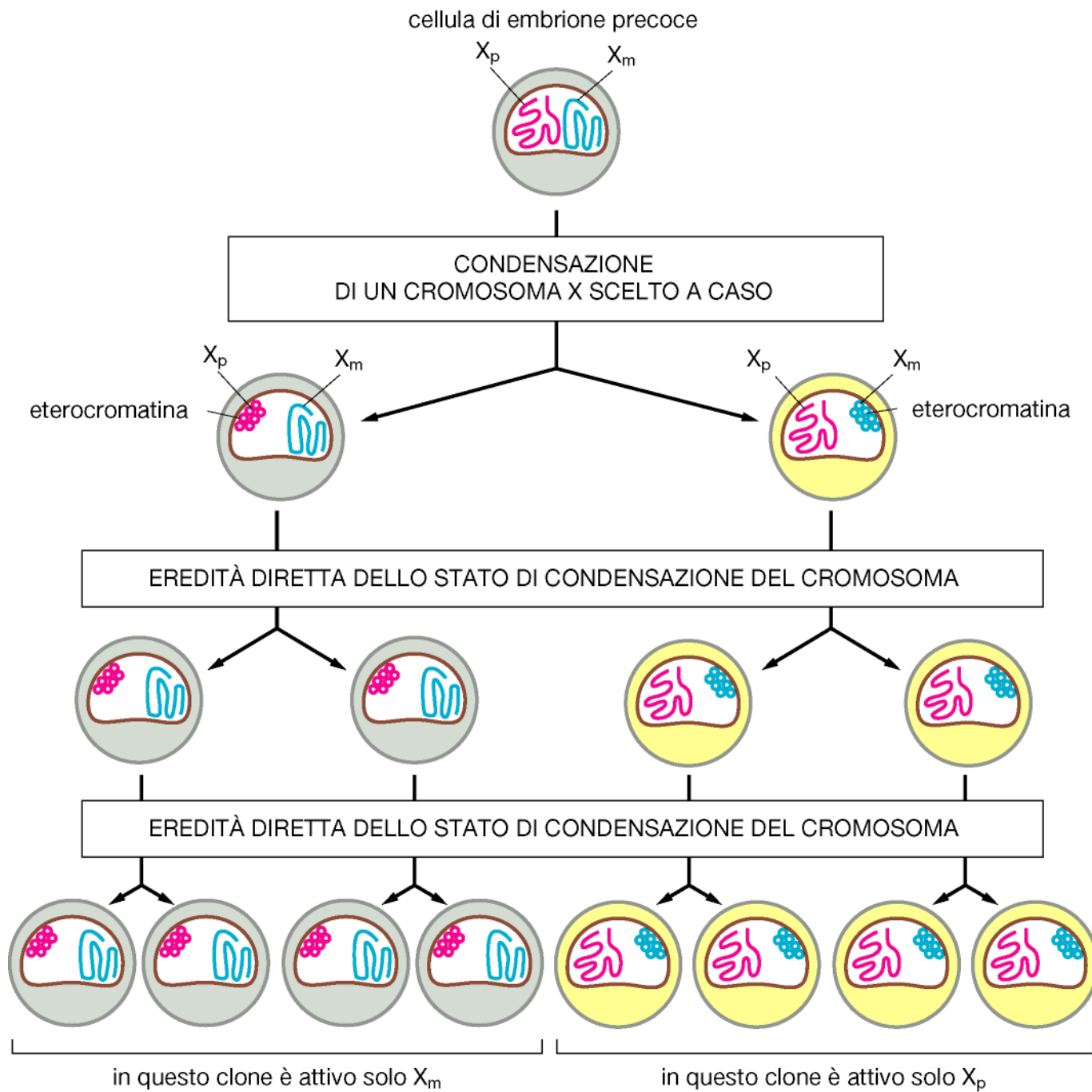
0,1 μm

Rappresentazione schematica di cariotipo umano

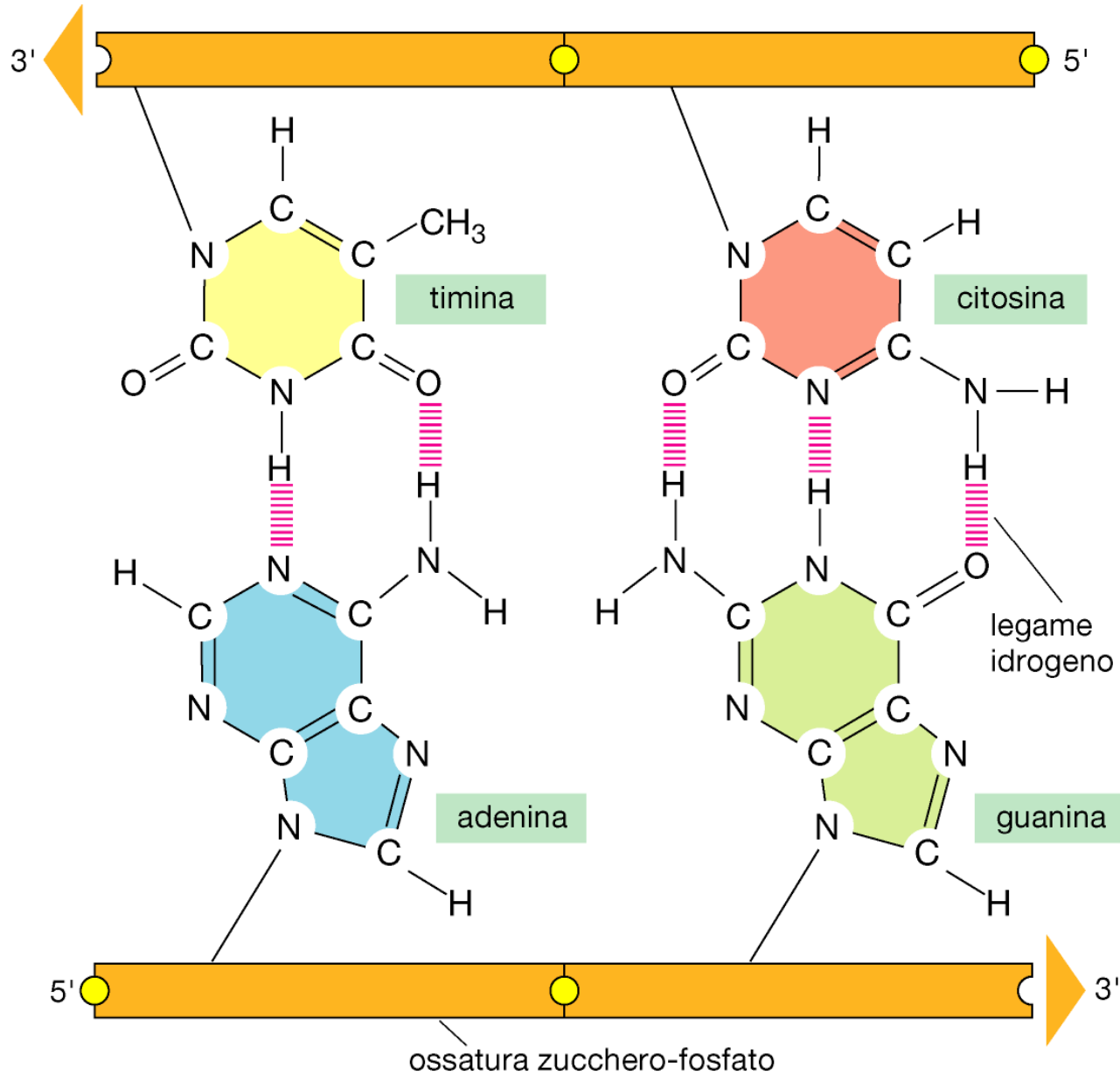
Bande G, qui scure, ricche in A-T; bande R, qui bianche, ricche in G-C

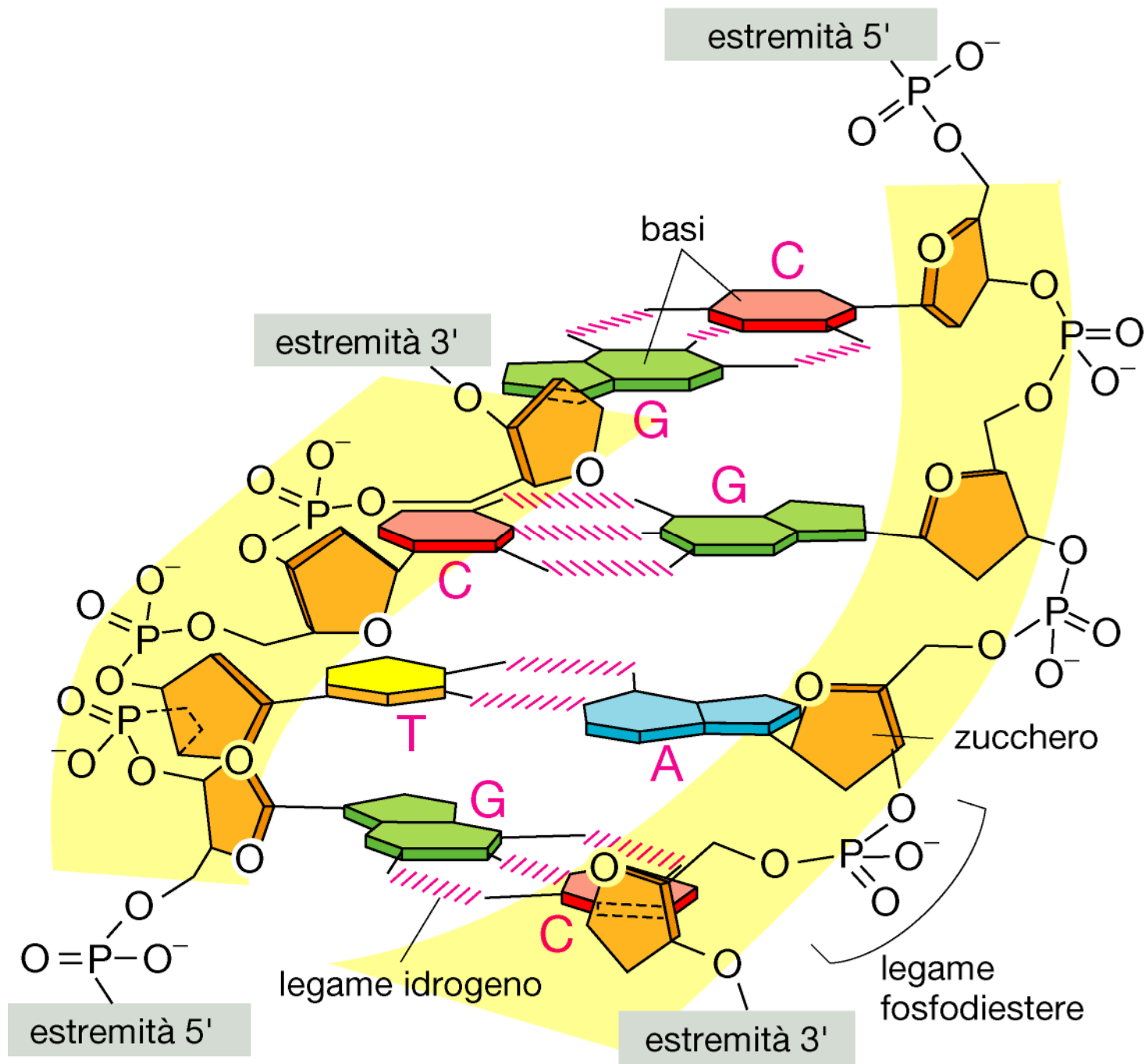


I geni sono contenuti sia nelle bande G che nelle bande R
La cromatina si addensa meno nelle regioni interessate alla trascrizione
La cromatina è costituita da **EUCROMATINA**, non particolarmente addensata, ed **ETEROCROMATINA**, molto addensata e inattiva dal punto di vista della trascrizione

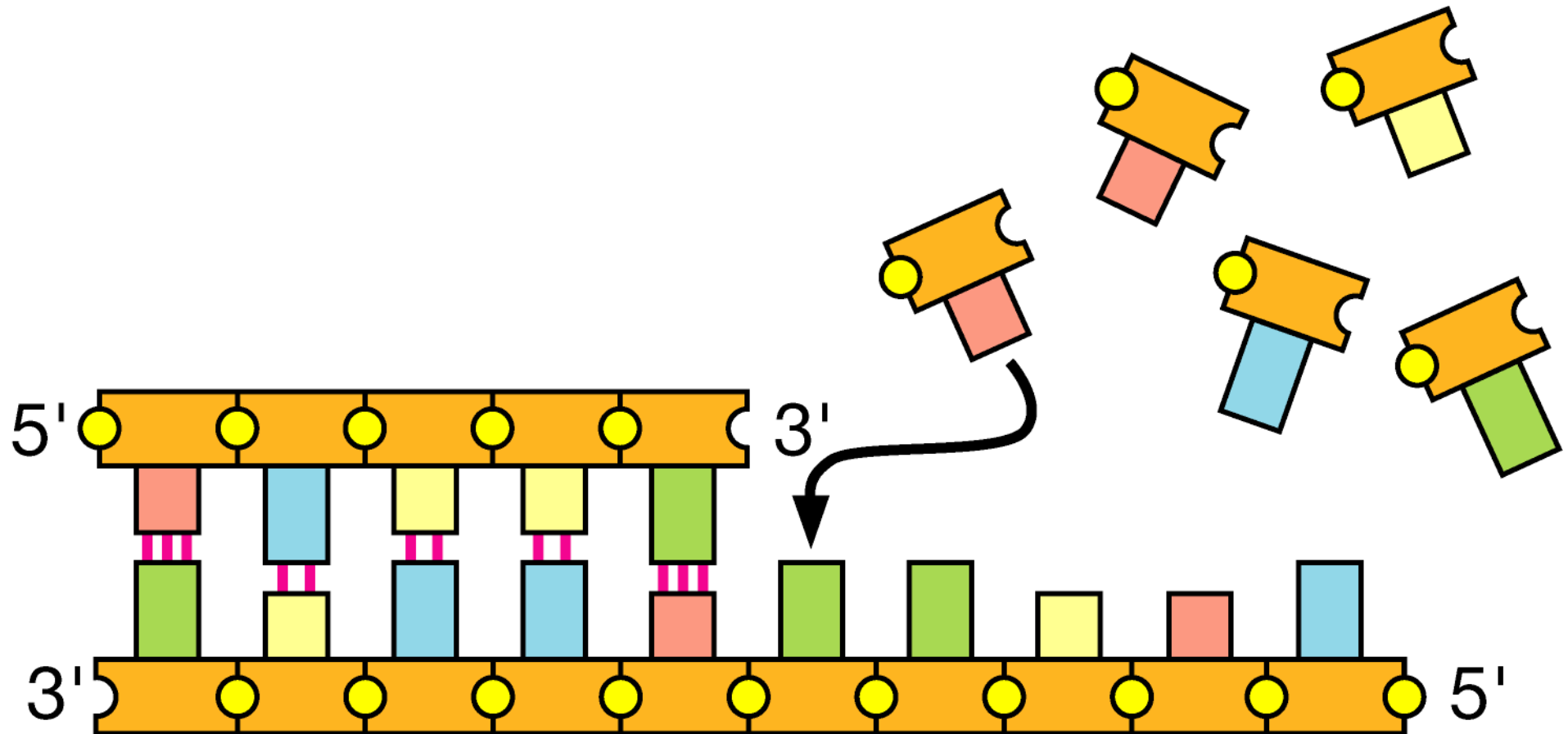


Replicazione del DNA

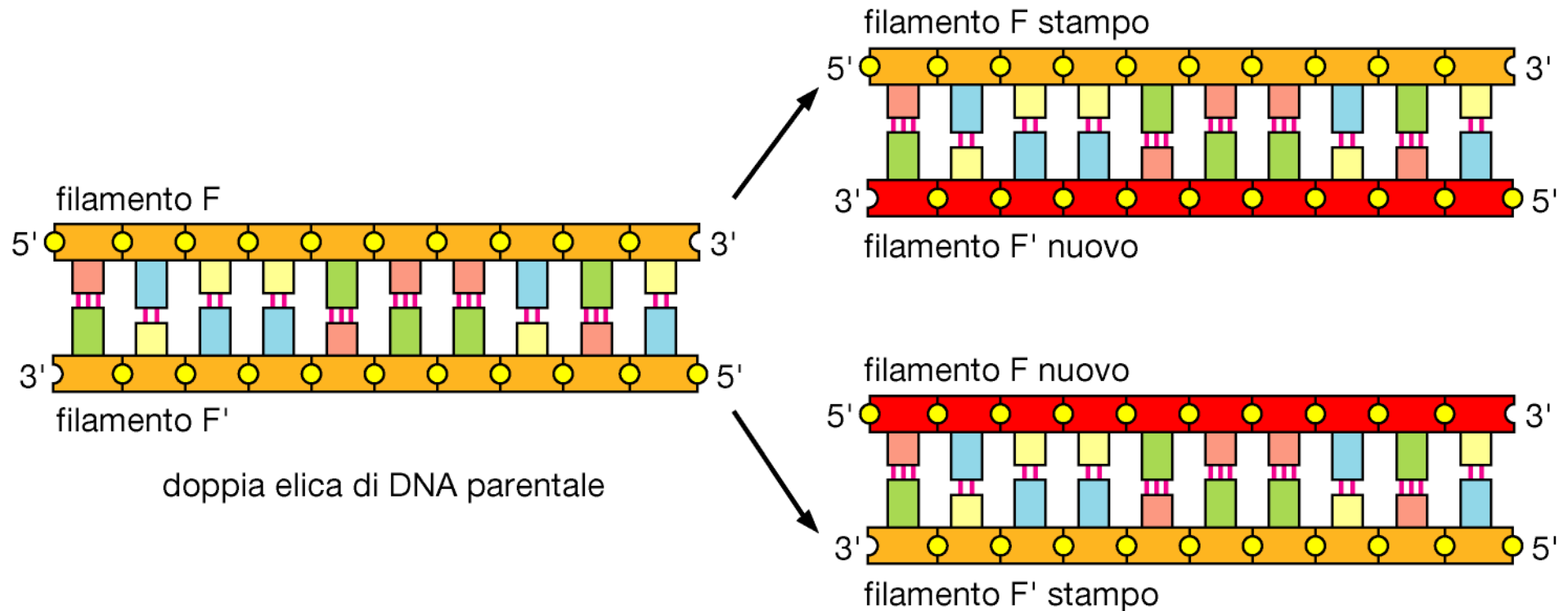


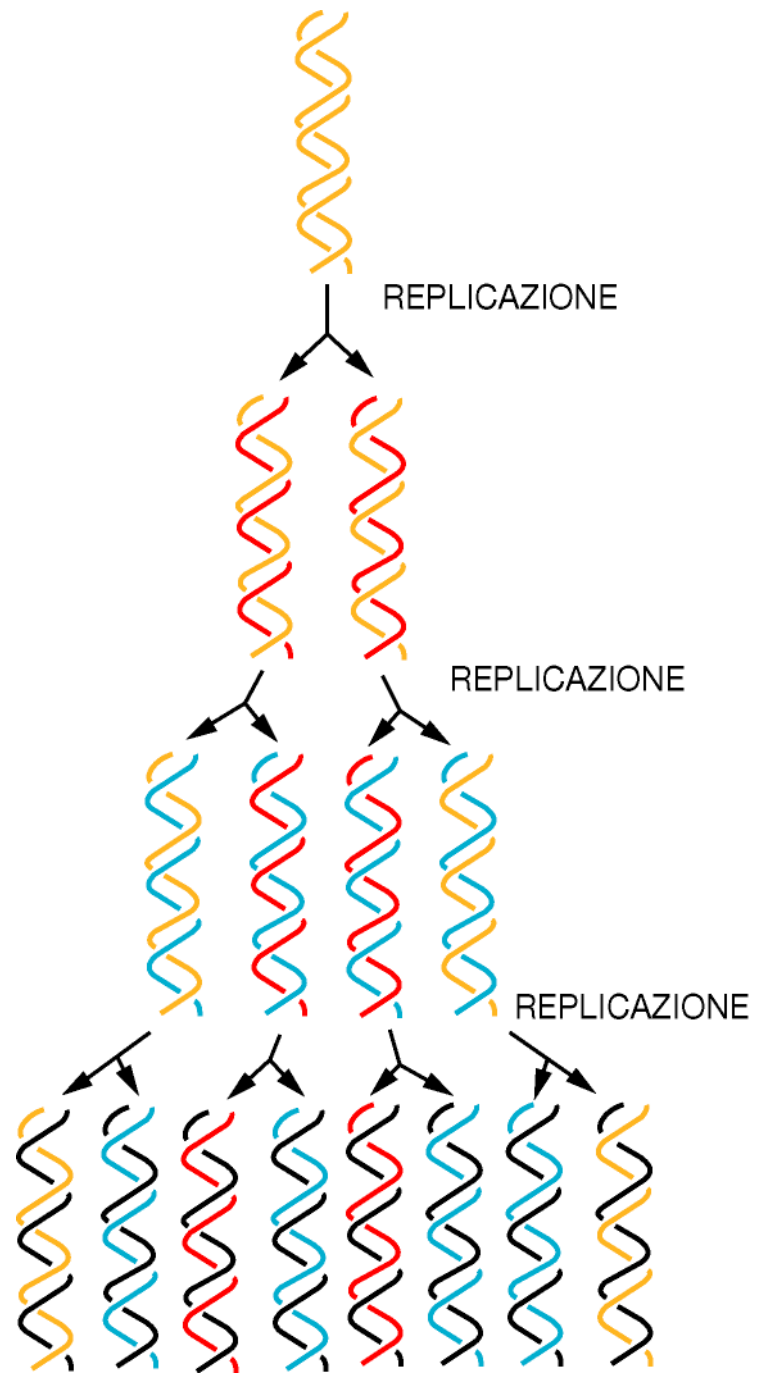


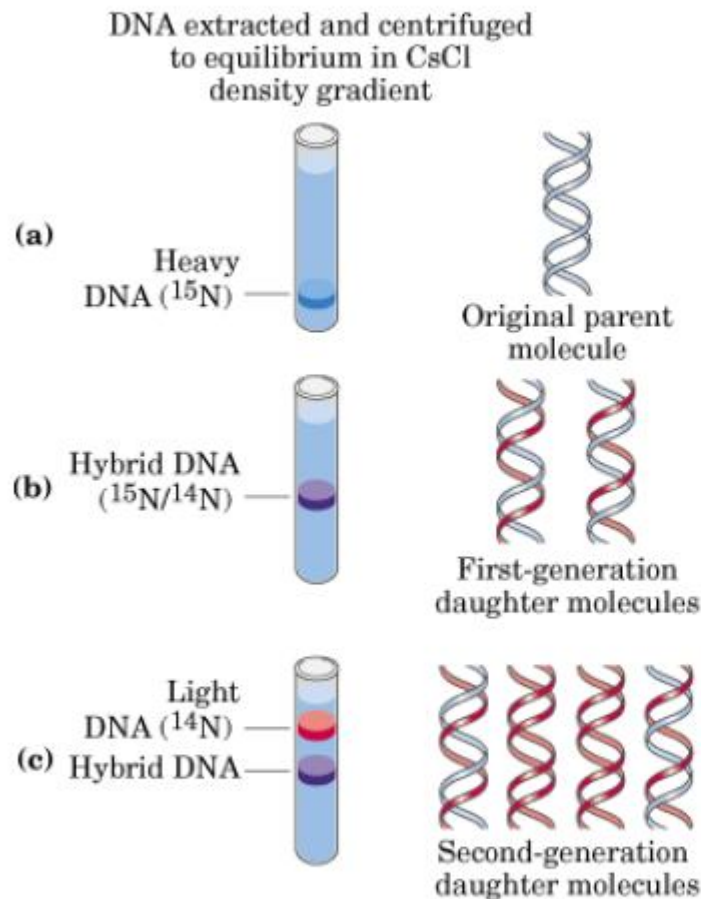
L'allungamento della catena avviene sempre in direzione
5' - 3'



Il meccanismo di replicazione è **semiconservativo**, infatti ogni filamento funge da stampo per la formazione di un intero nuovo filamento. Ciascuna **cellula figlia** eredita una doppia elica contenente **un filamento vecchio e uno nuovo**.







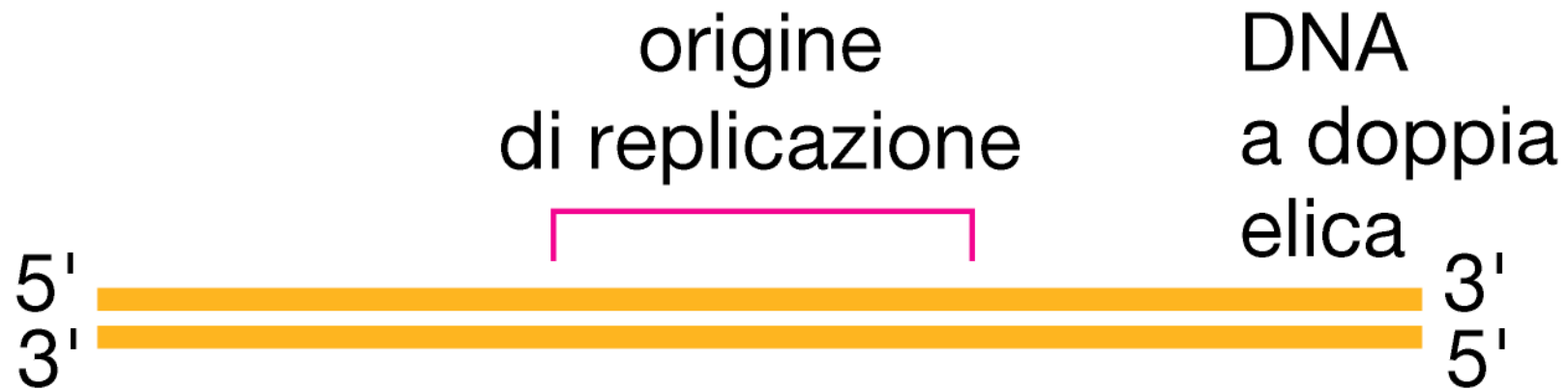
Esperimento di Meselson-Stahl

a) Cellule coltivate per varie generazioni in un terreno contenente solo N pesante (^{15}N), per cui, dopo centrifugazione per gradiente di densità, si ottiene una sola banda (blu) di DNA

b) Cellule coltivate in ^{15}N sono trasferite in un terreno contenente solo N leggero (^{14}N). Dopo centrifugazione, la banda di DNA (viola) sedimenta in una zona più alta della precedente essendo un ibrido ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)

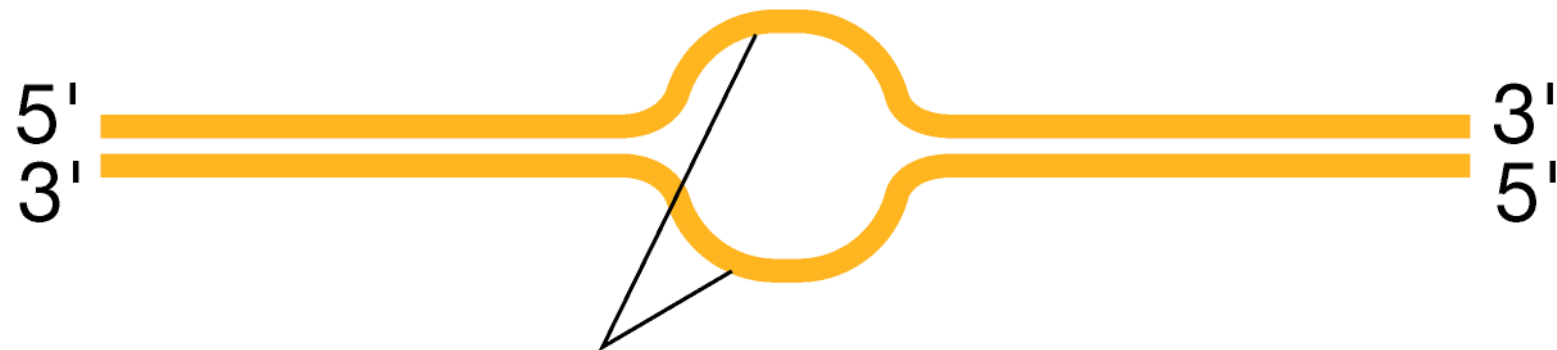
c) Continuando la replicazione per un'altra generazione, si producono due DNA ibridi bande di DNA (banda viola) e due DNA leggeri (banda rossa)

Questo esperimento conferma l'ipotesi della **replicazione semiconservativa**, in base alla quale durante la replicazione le nuove molecole di DNA sono formate da un filamento parentale ed uno neosintetizzato



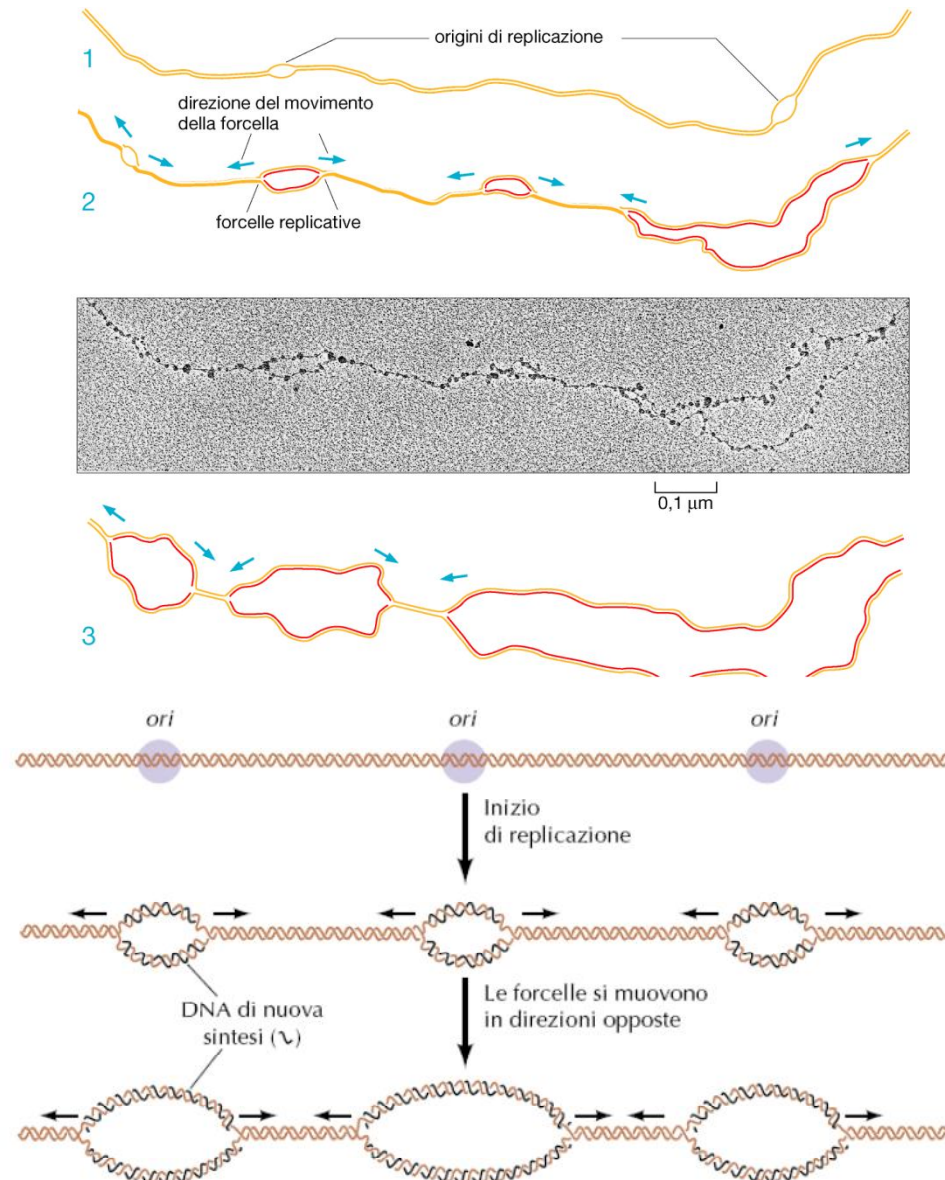
doppia elica aperta
con l'aiuto
di proteine iniziatrici

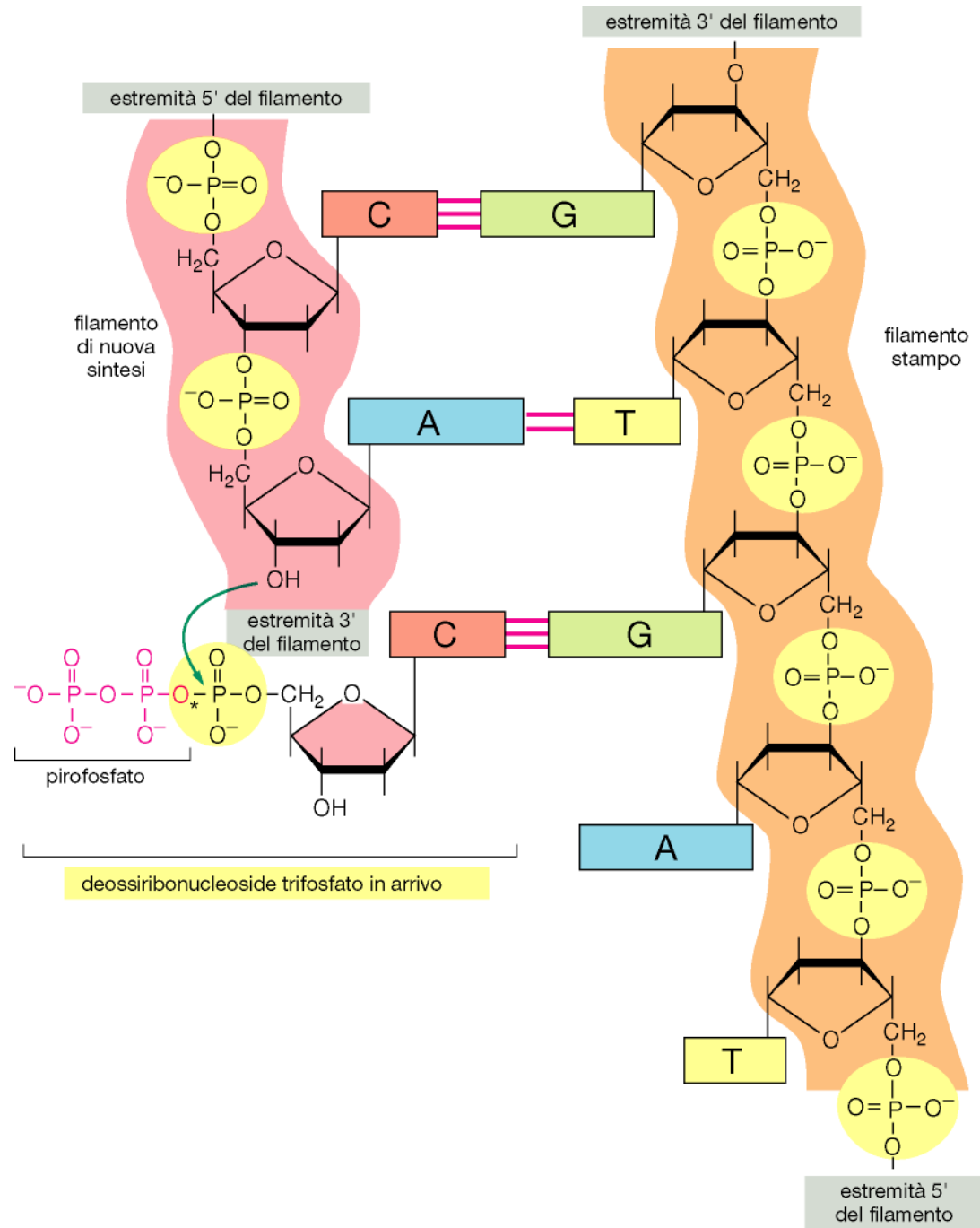
A black arrow points downwards from the origin of replication to the replication fork.

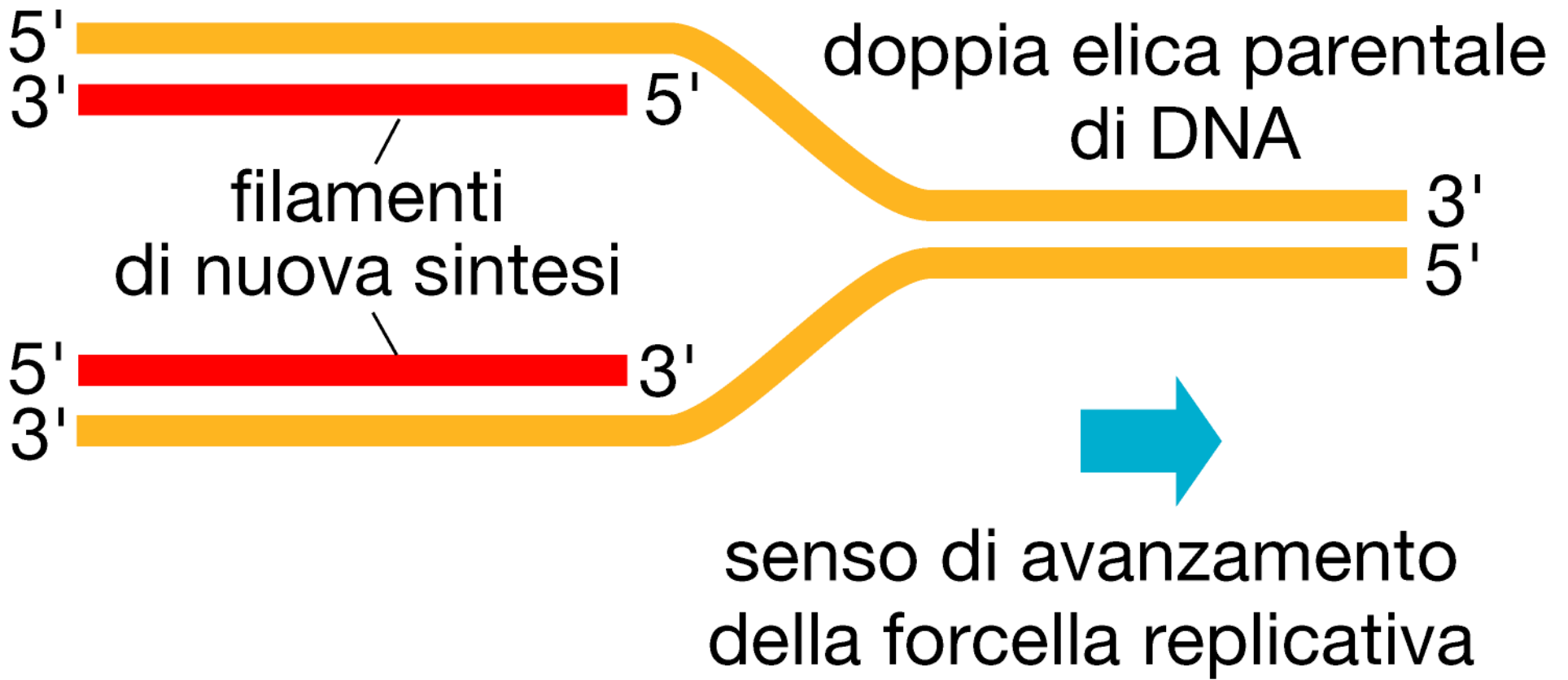


DNA stampo a filamento singolo,
pronto per la sintesi di DNA

Si ritiene che una forcella replicativa si arresti solo quando si imbatte in un'altra in movimento in senso opposto oppure quando raggiunge l'estremità del cromosoma

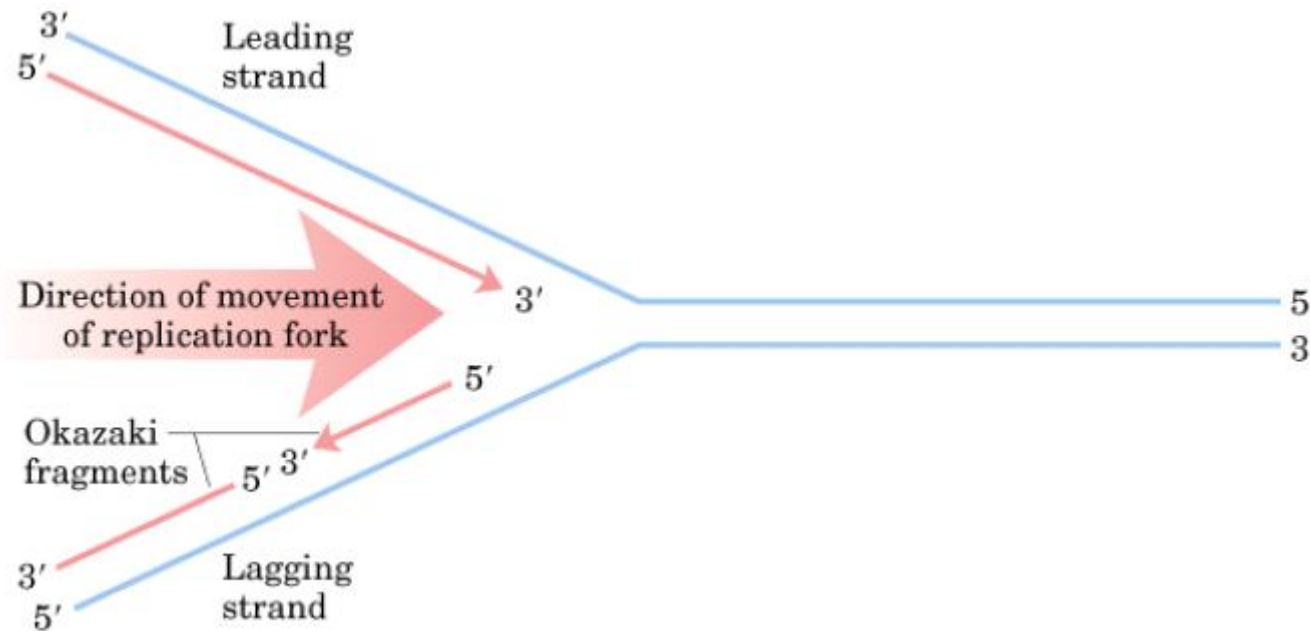


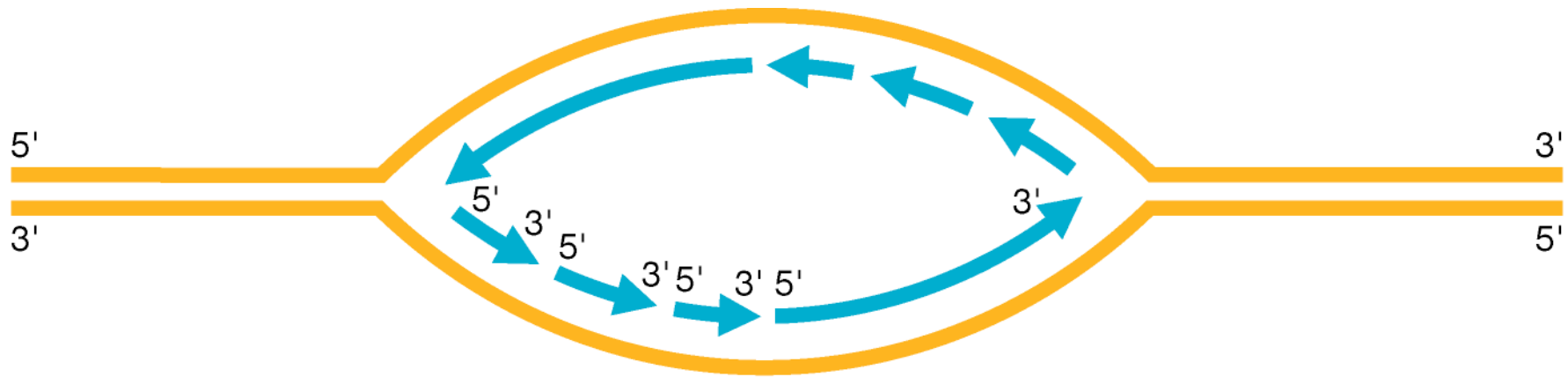




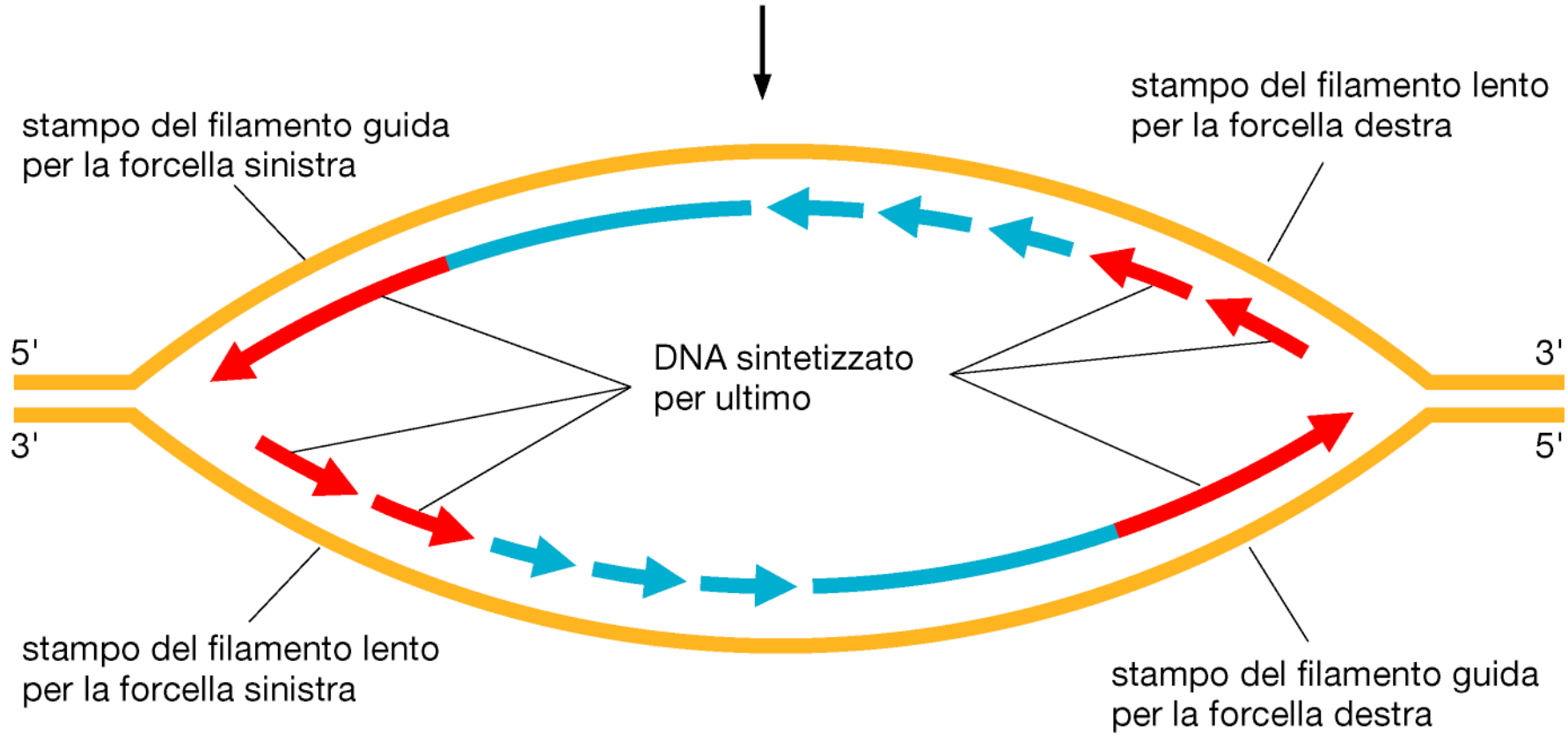
Sintetizzandosi entrambi i filamenti figli in direzione 5' – 3', il DNA sintetizzato sul filamento lento deve essere costruito inizialmente sotto forma di una serie di brevi molecole dette

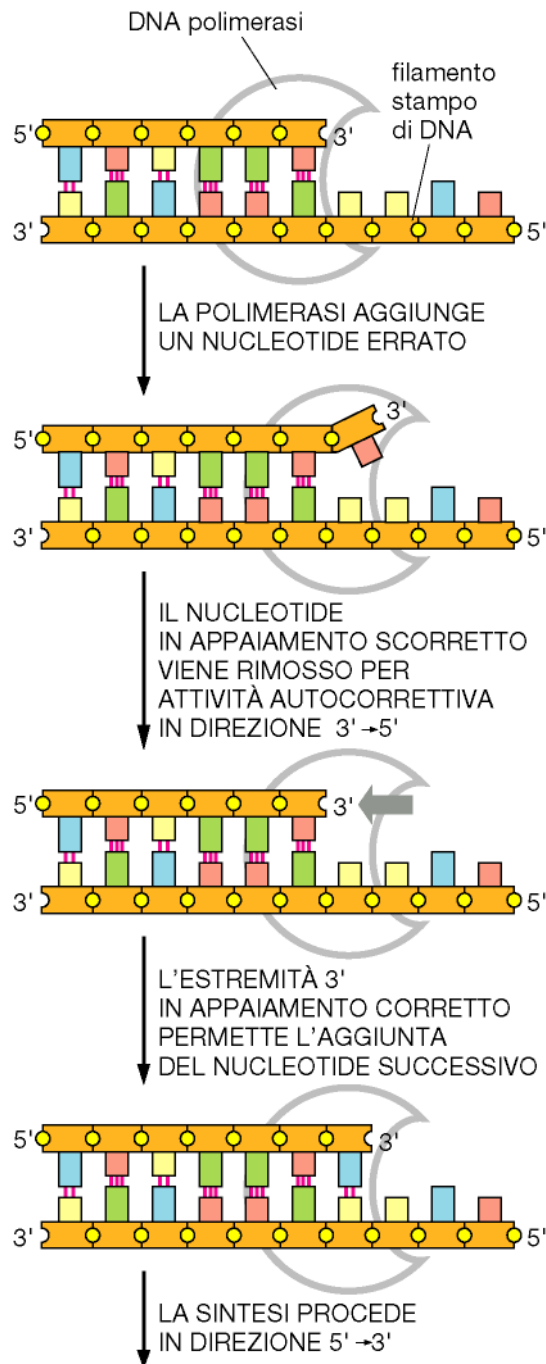
FRAMMENTI DI OKAZAKI





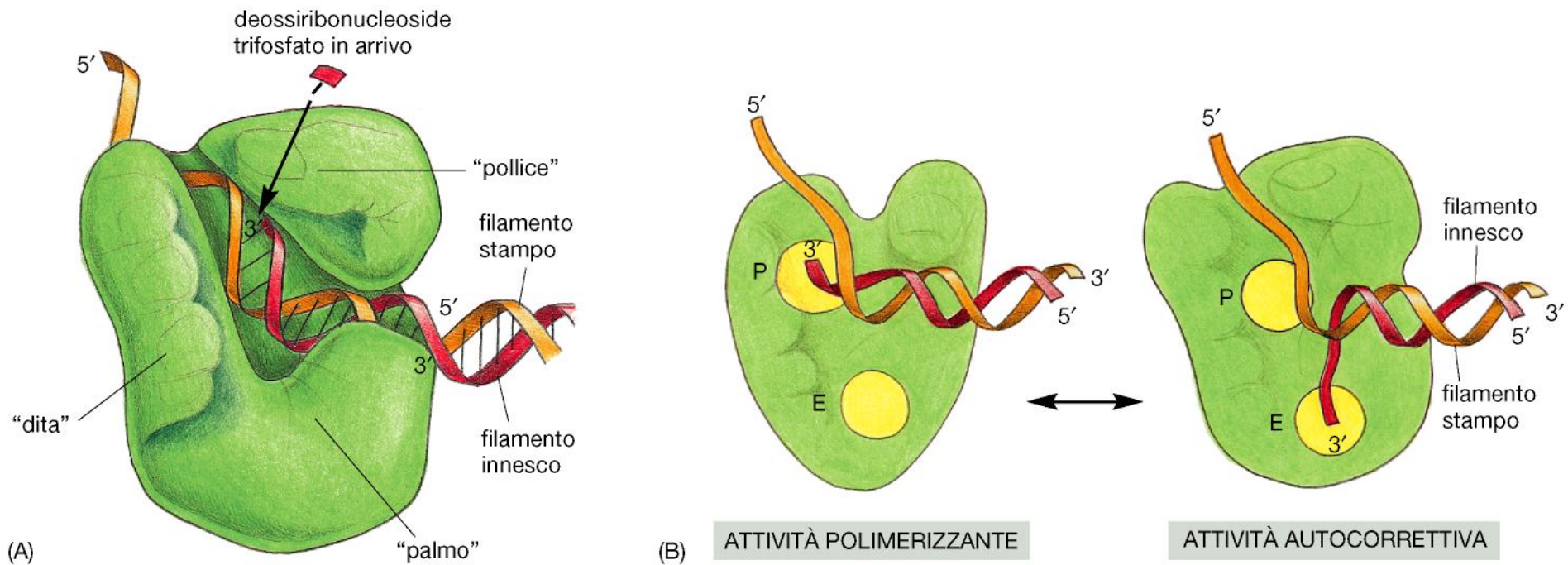
← direzione di spostamento della forcella replicativa →

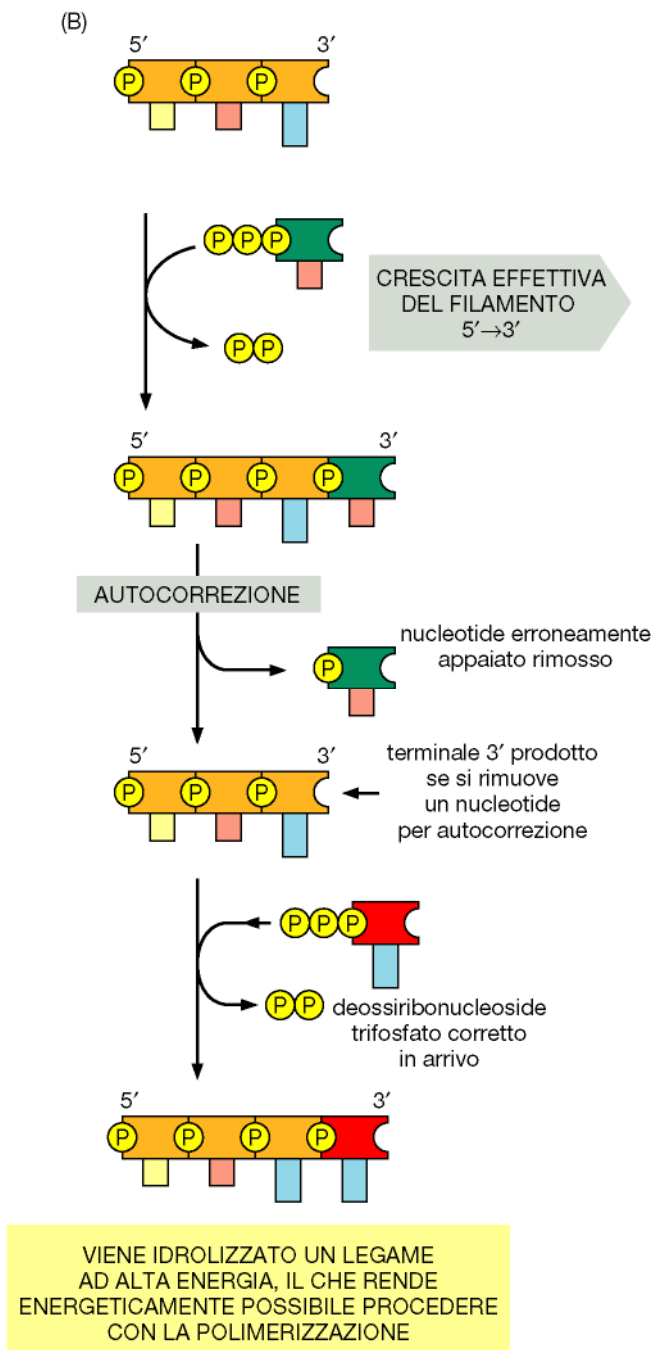
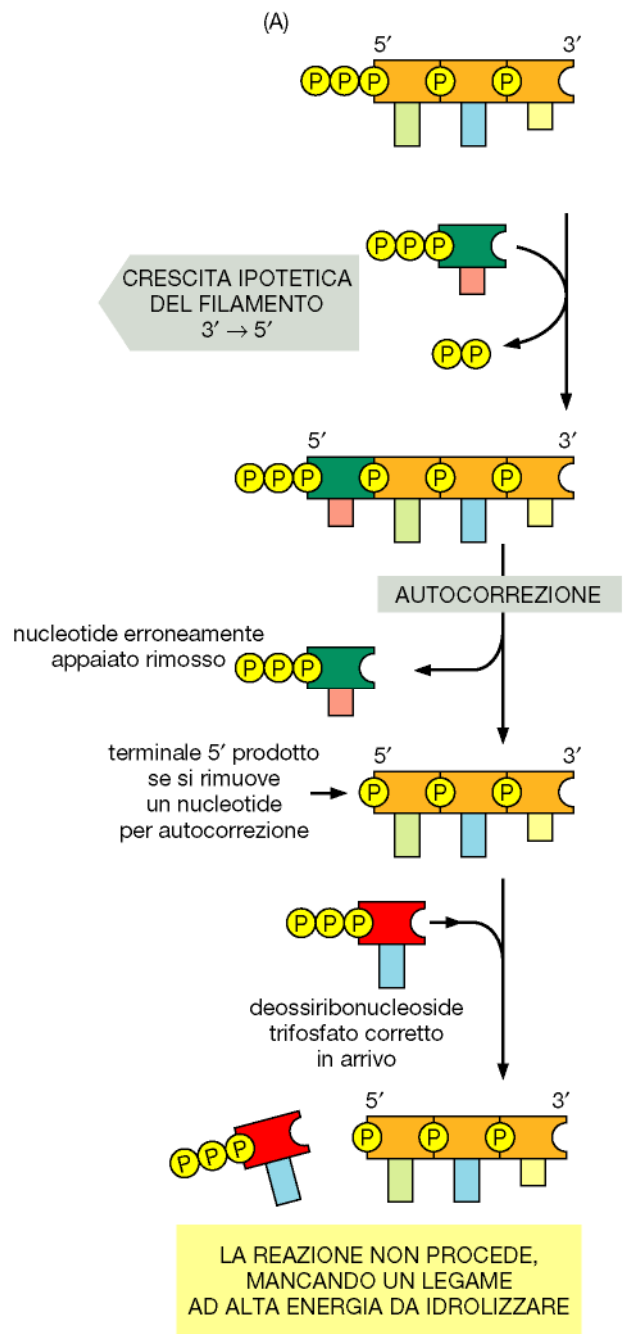




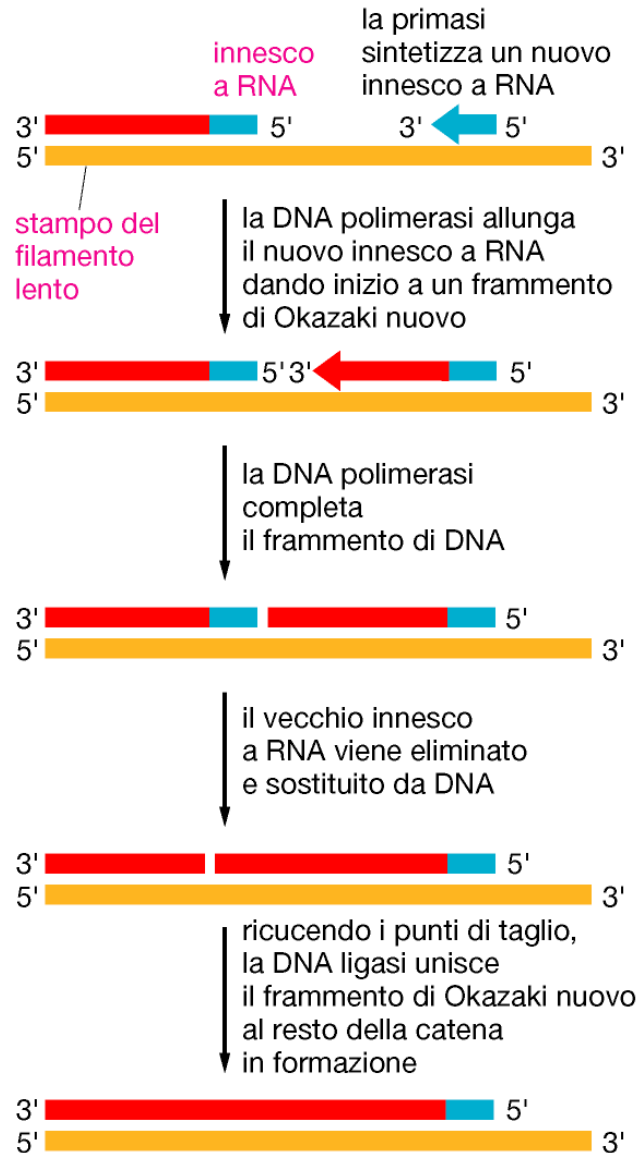
Per essere altamente fedele, la duplicazione del DNA esige un meccanismo di **"CORREZIONE DELLE BOZZE"**

La DNA polimerasi possiede sia un sito che catalizza la polimerizzazione (**ATTIVITA' POLIMERASICA 5' – 3'**) sia un sito catalitico che recide qualunque residuo spaiato terminale (**ATTIVITA' ESONUCLEASICA 3' – 5' / Proofreading activity**)





La DNA polimerasi esige un filamento innesco (primer) alla cui estremità 3'-OH sommerà altri nucleotidi. La **DNA PRIMASI** crea dei brevi **inneschi di RNA**, che poi verranno rimossi



Allungamento

Proteina iniziatrice: si lega a siti specifici del punto di origine della duplicazione

Elicasi: scorre lungo il filamento del DNA garantendone lo svolgimento (usa l'energia di idrolisi dell'ATP)

Primasi: sintetizza i primer di RNA

Proteine destabilizzatrici dell'elica: si legano al DNA a singola elica mantenendone la conformazione non avvolta

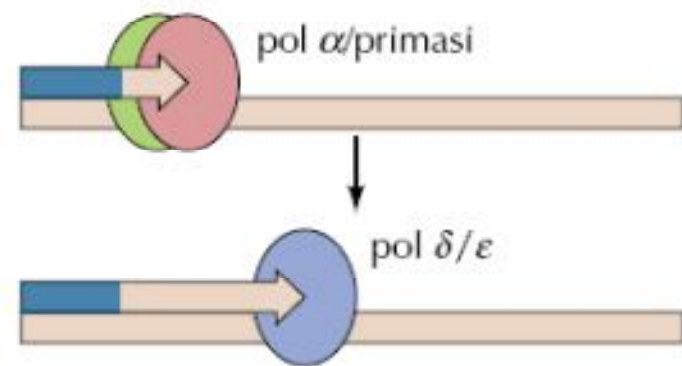
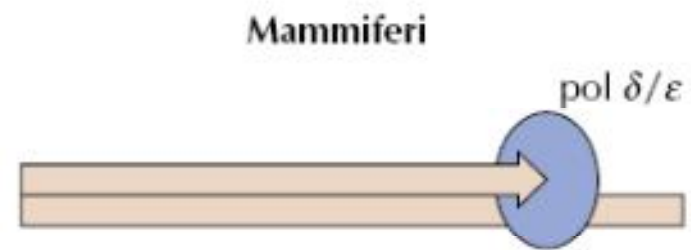
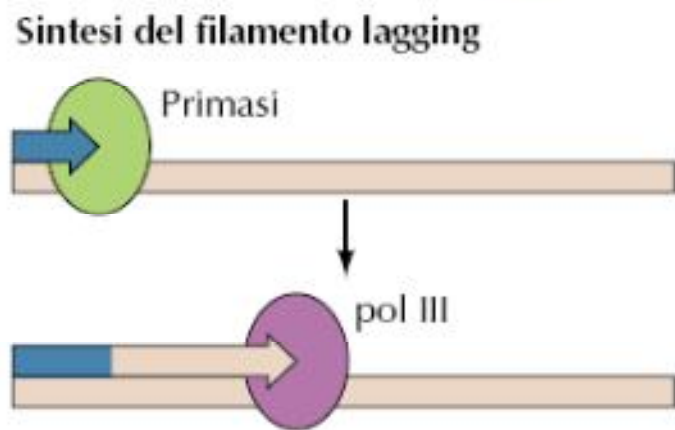
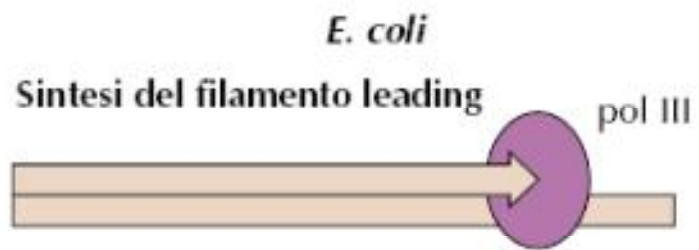
Morsetto scorrevole: mantiene la DNA polimerasi salda allo stampo

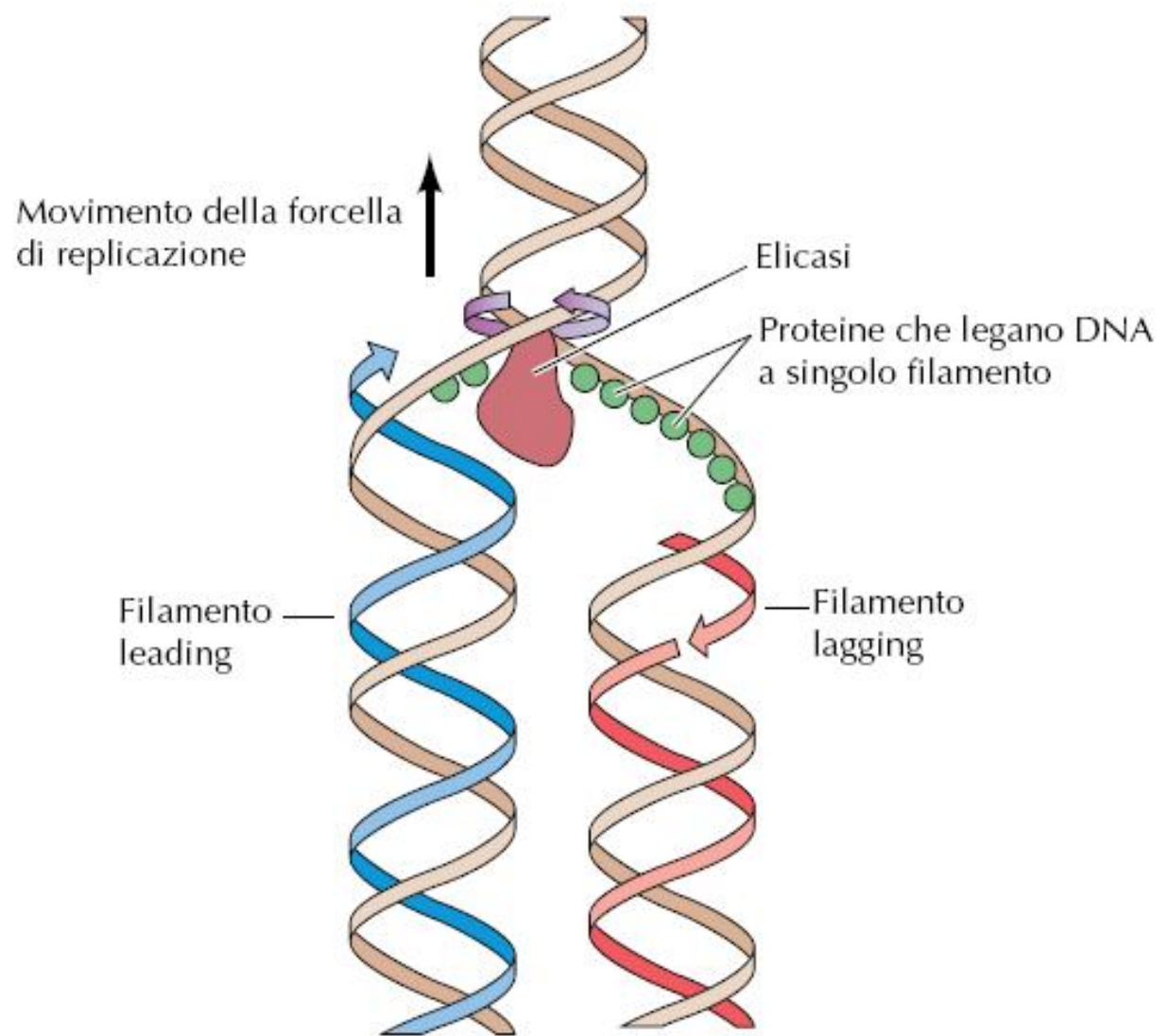
DNA polimerasi: nel **batterio** la **III** si occupa dell'allungamento, la **I** di riempire delle lacune e rimuovere gli inneschi; negli **eucarioti** la **α** ha attività primasica e polimerasica; la **δ** estende i primer, è probabilmente responsabile dell'allungamento sia del filamento lento che di quello veloce, ha attività *proofreading*; la **ϵ** può prendere il posto della **δ** ad esempio nella riparazione del DNA

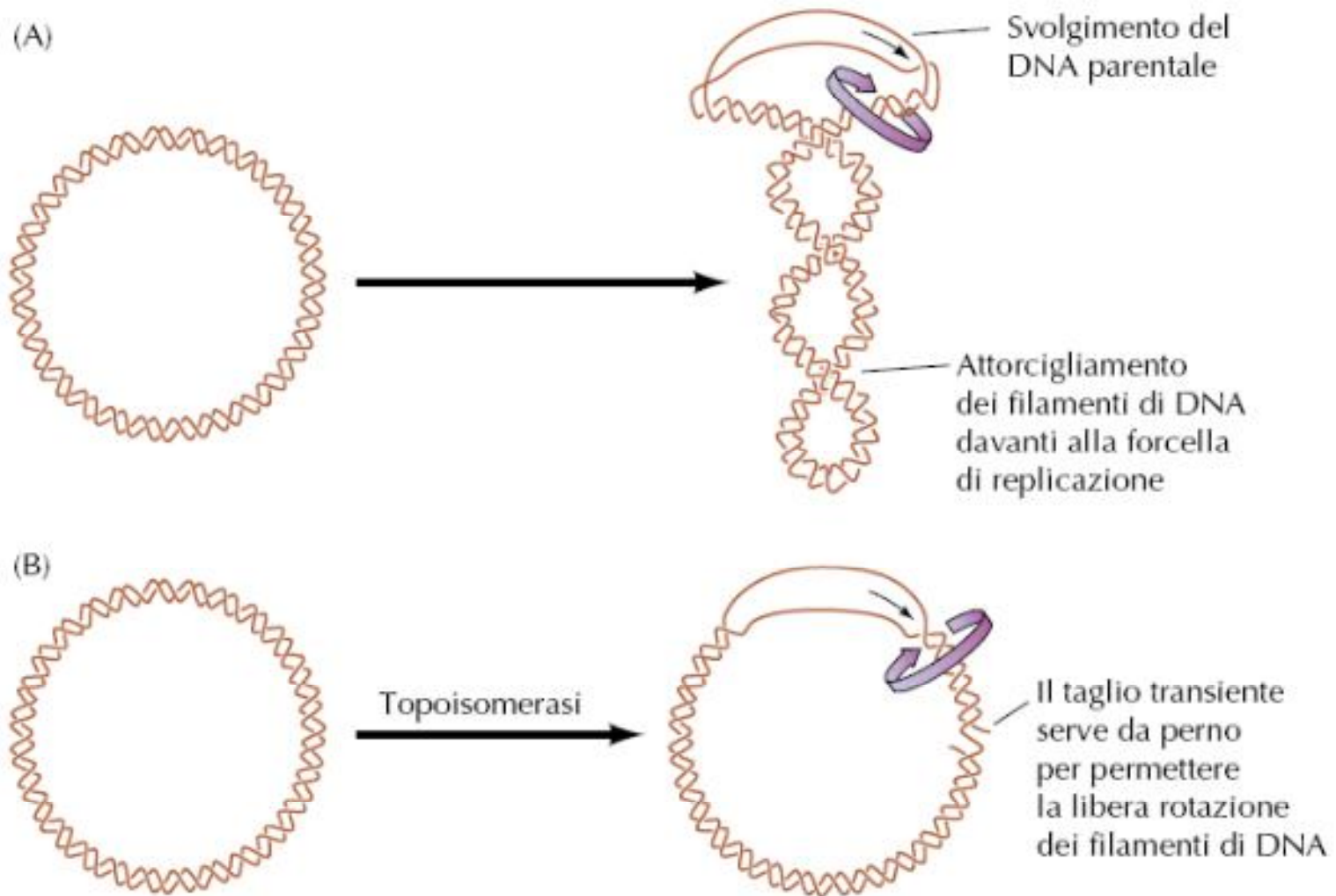
Ligasi: sutura del DNA

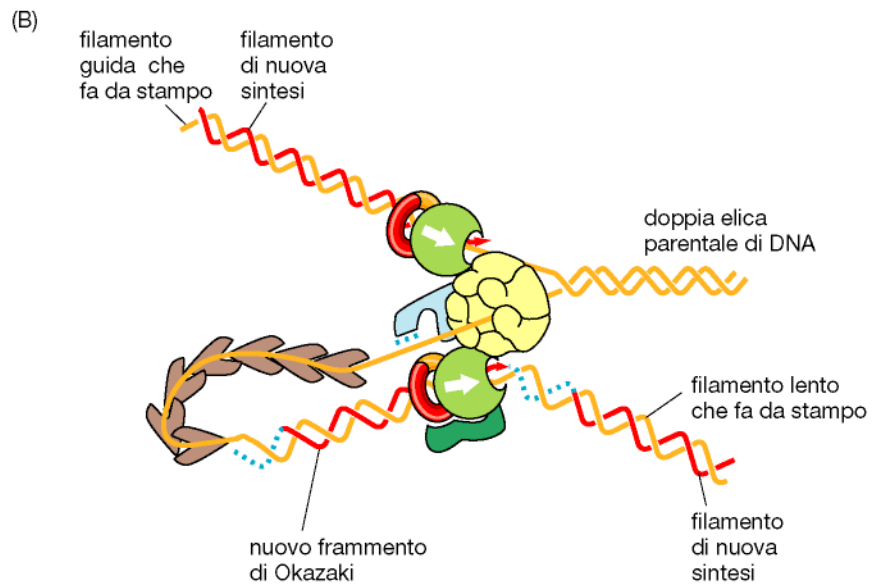
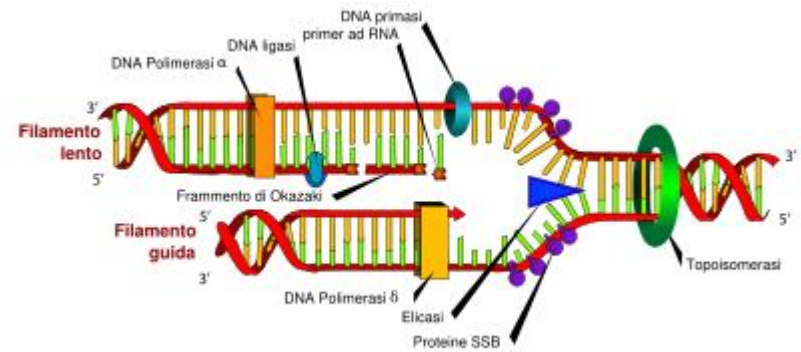
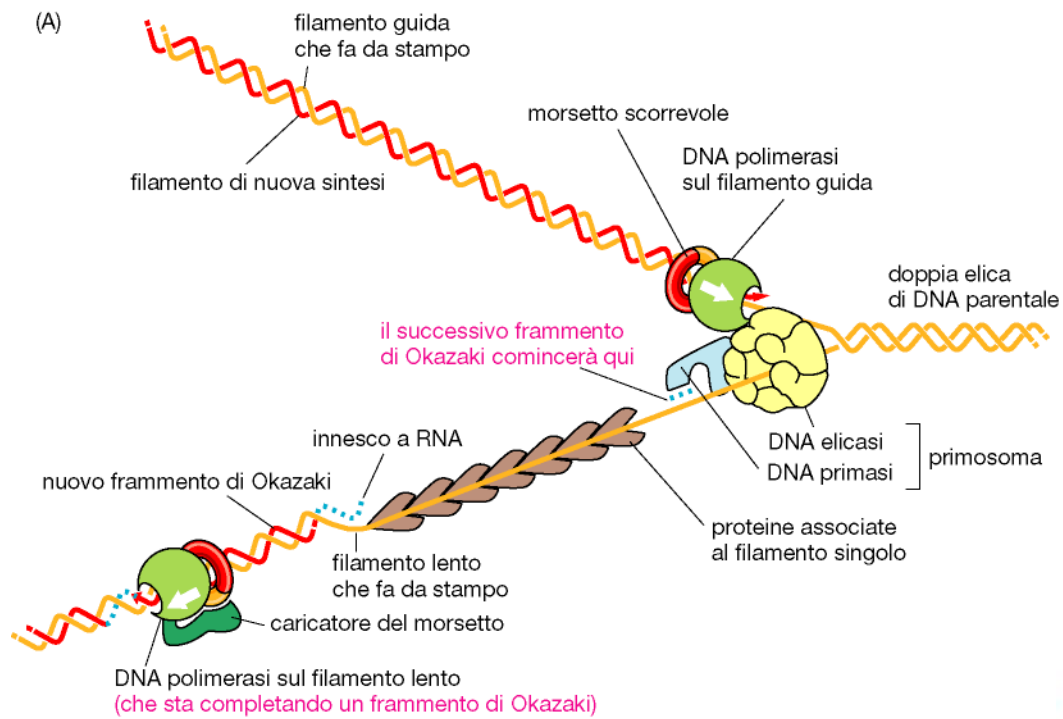
Topoisomerasi: scinde il DNA nei punti di superavvolgimento legandovisi covalentemente in maniera reversibile

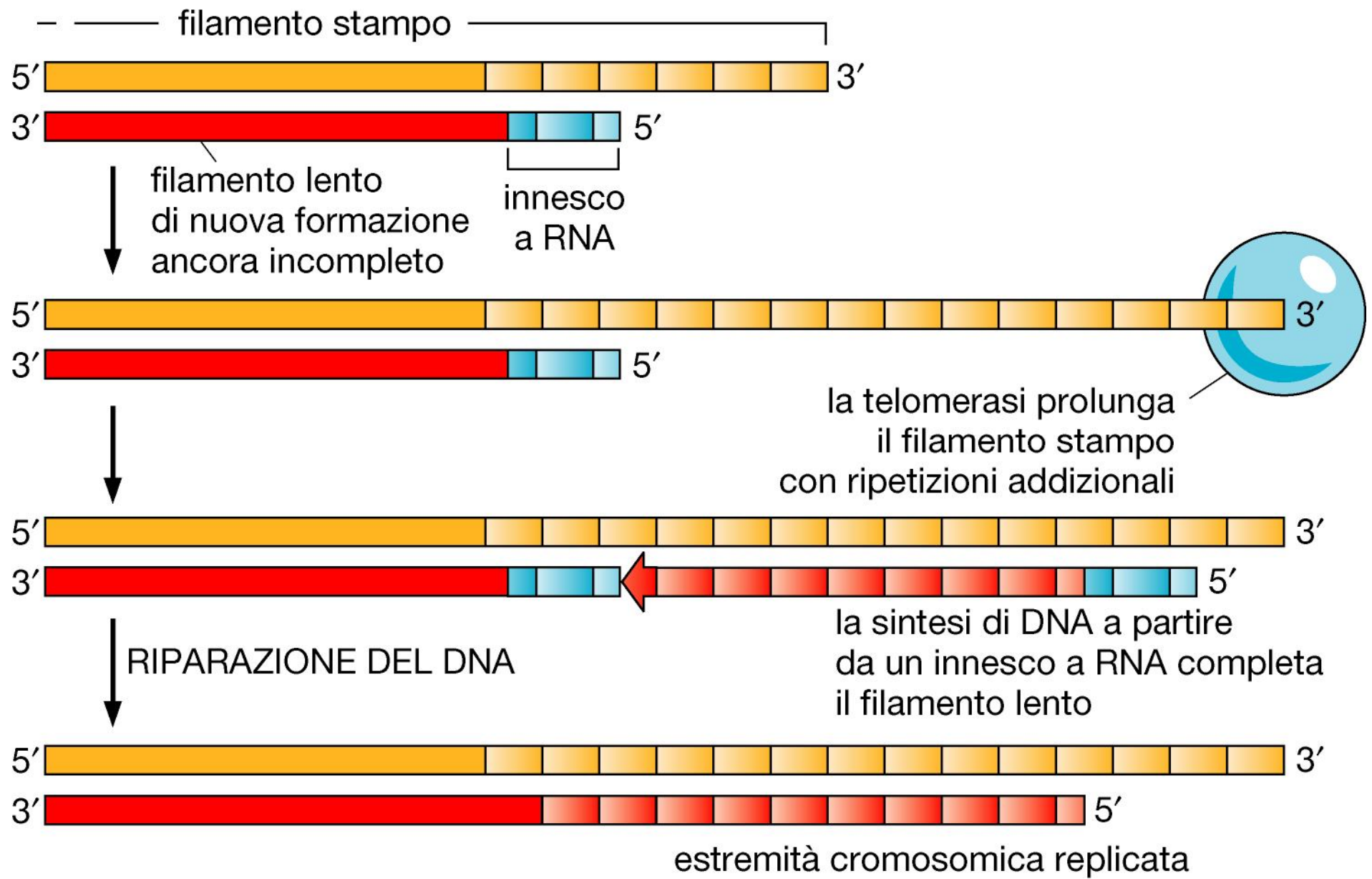
PRIMOSOMA











Restauro del DNA

Le sequenze di **DNA** si conservano con **fedeltà altissima** (si è stimata una velocità di mutazione pari a 1 mutazione ogni 200.000 anni)

La maggior parte delle **mutazioni a carico delle proteine sono deleterie** e vengono eliminate per **selezione naturale**

Una bassa velocità di mutazione è indispensabile; le cellule germinali vanno **protette** da un elevato tasso di mutazione per la **conservazione delle specie**; le cellule somatiche per la **salvaguardia dell'individuo** (es. cancro)

Diversi organismi non differiscono tanto per la sequenza quanto per l'**espressione genica**

filamento singolo di un gene normale per la globina β

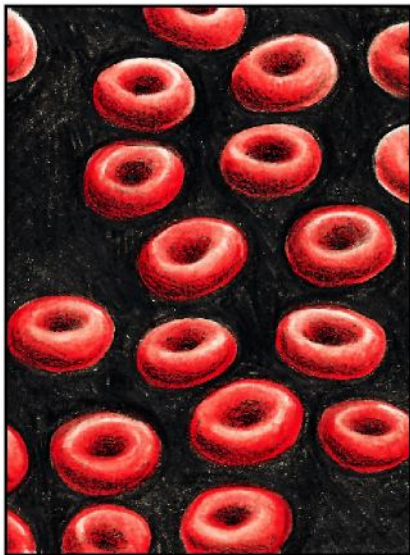
GTGCACCTGACTCCTG**A**GGAG---

GTGCACCTGACTCCTG**T**GGAG---

filamento singolo di un gene mutato per la globina β

unico nucleotide cambiato (mutazione)

(A)



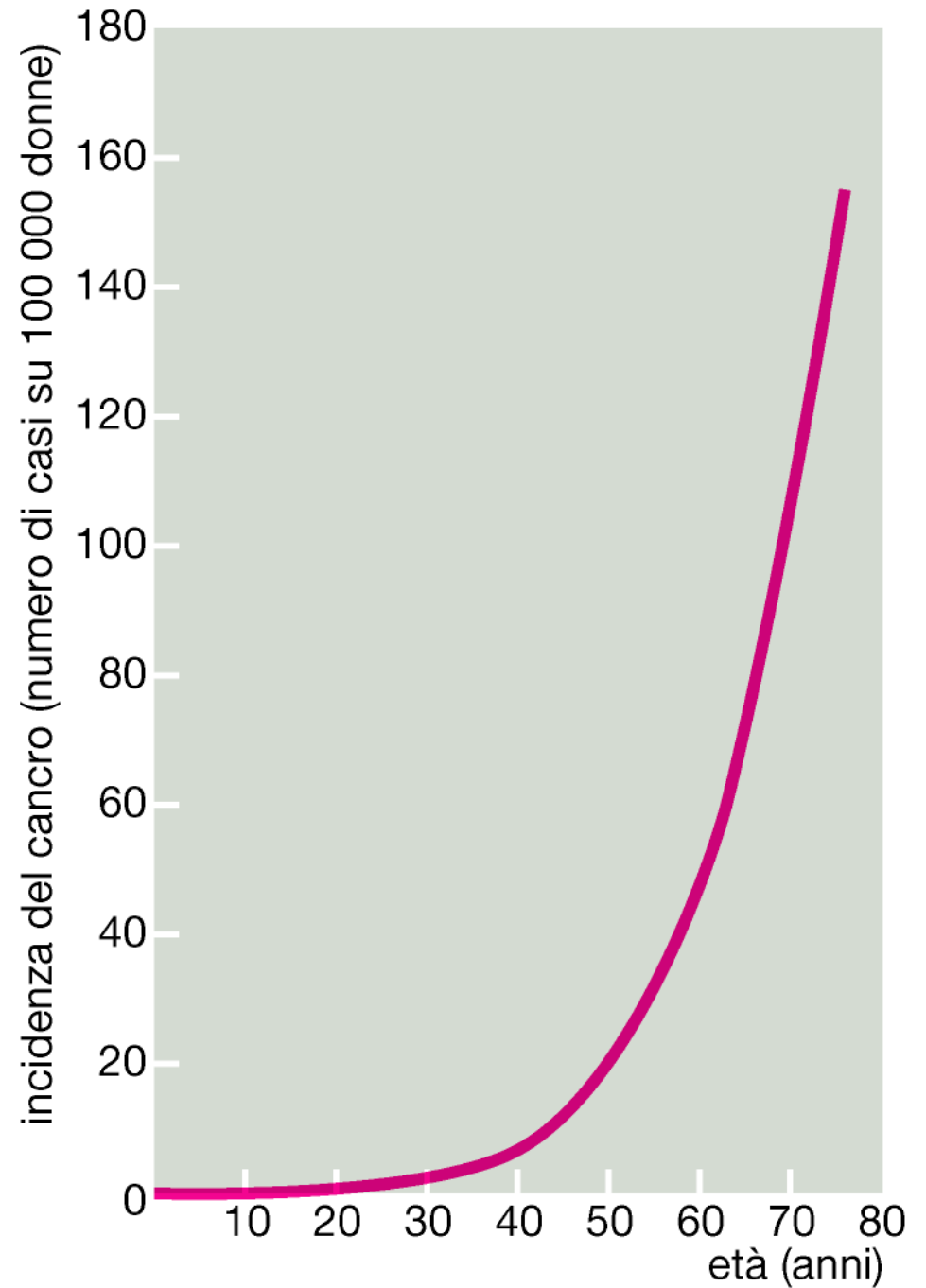
(B)

5 μ m



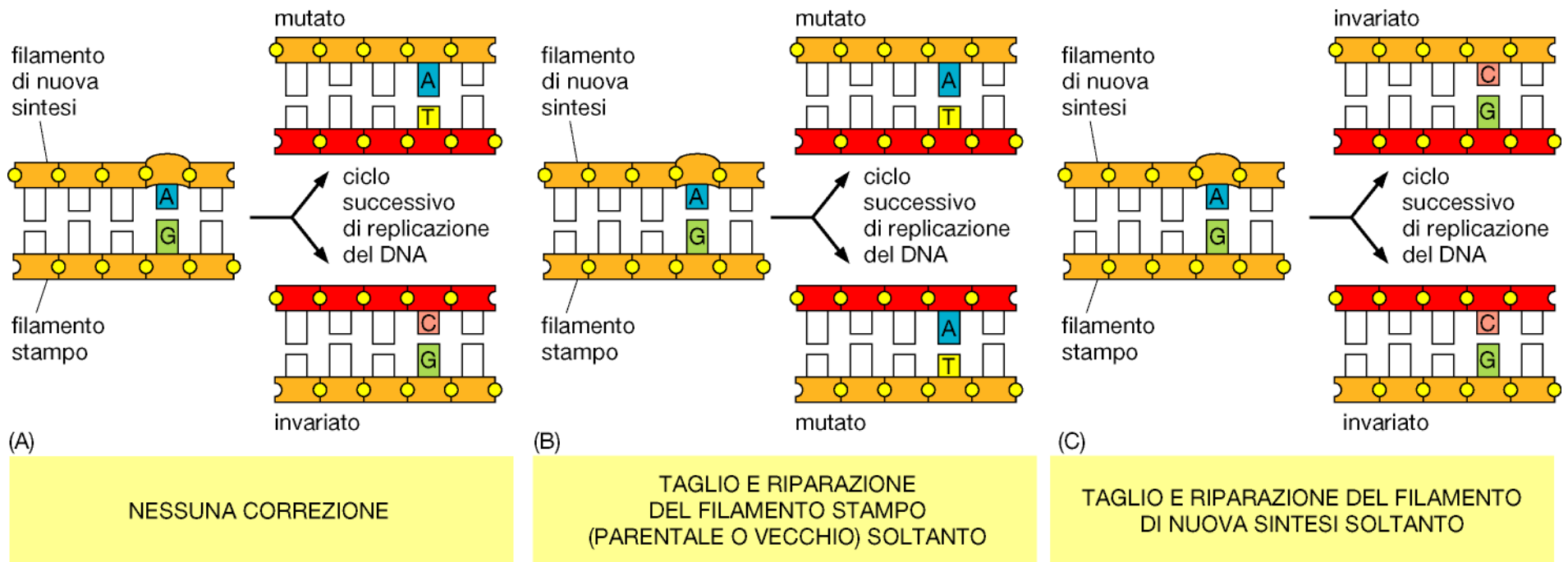
(C)

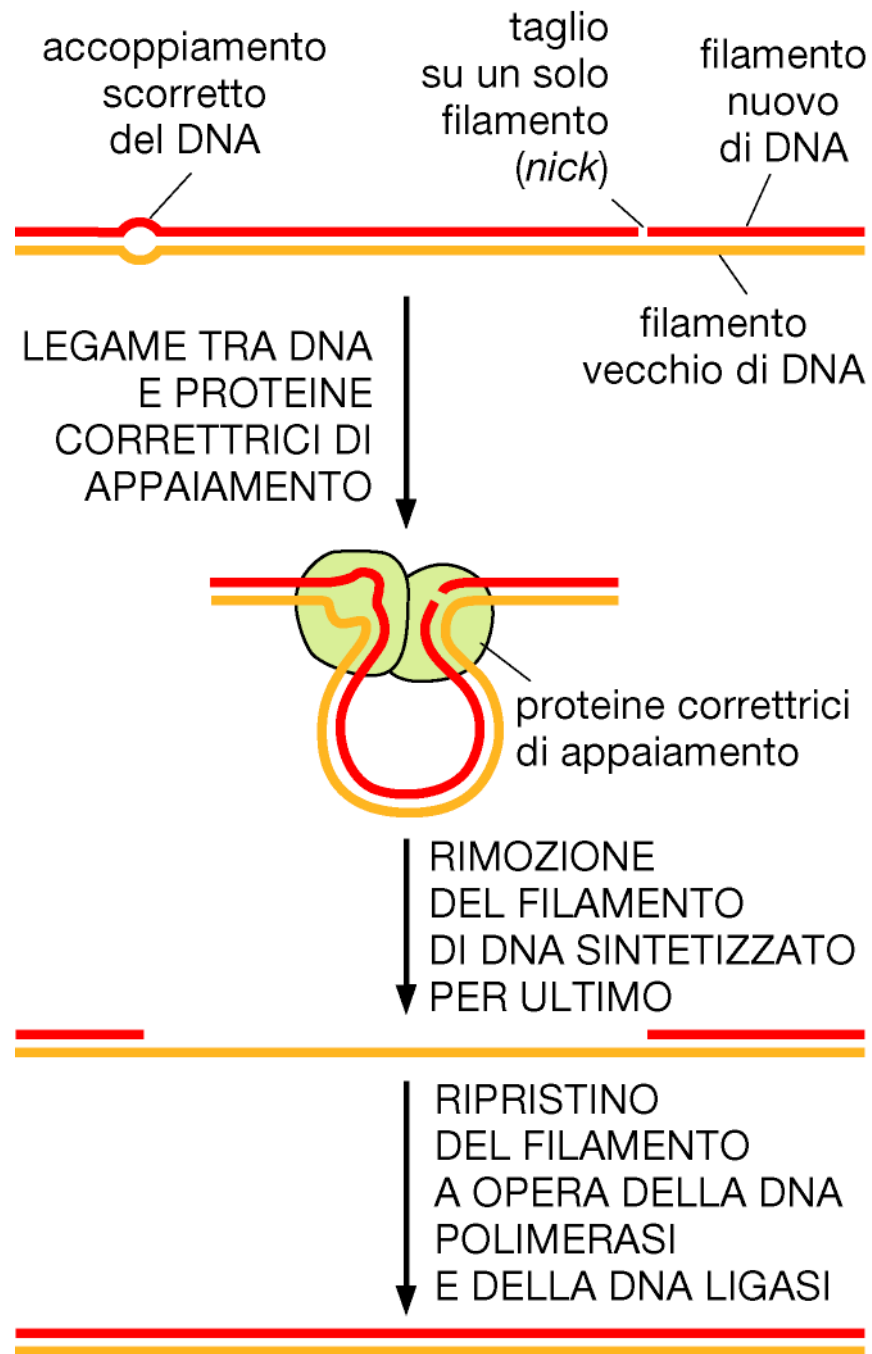
5 μ m



Correttore di appaiamento del DNA

la cellula corregge gli errori che fa durante la replicazione del DNA



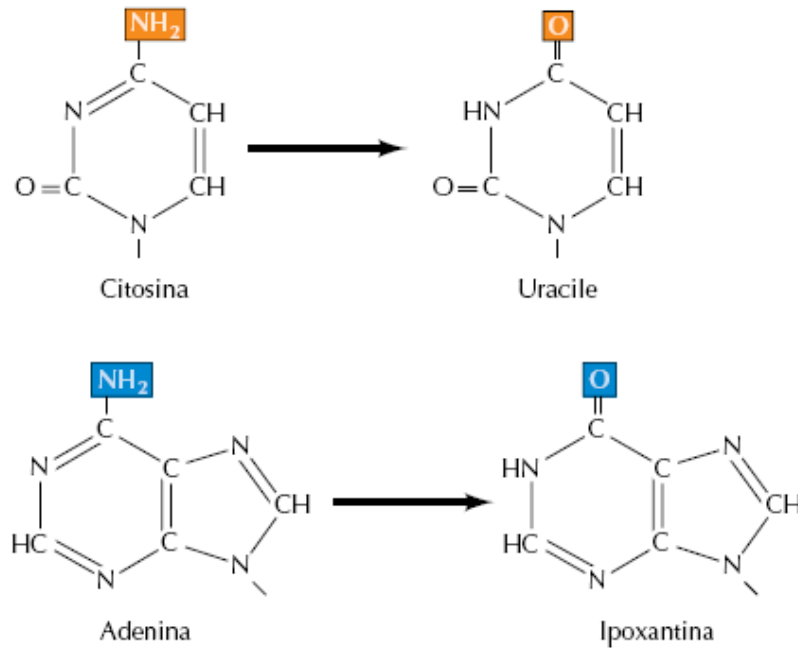


Le proteine correttrici di appaiamento rimediano agli errori occorsi durante la replicazione del DNA

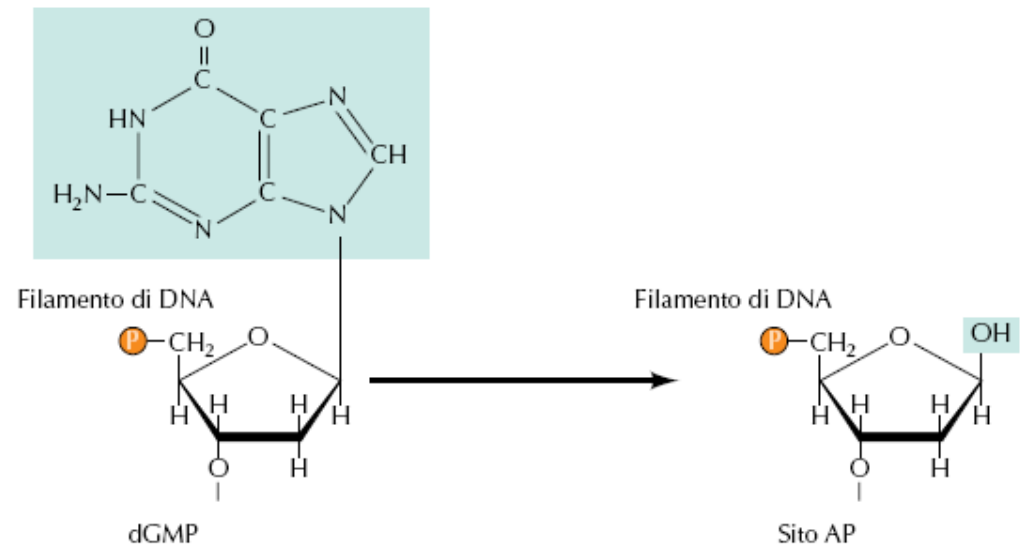
Il DNA subisce ampi mutamenti a causa di fluttuazioni termiche

Danneggiamento spontaneo del DNA

(A) Deaminazione

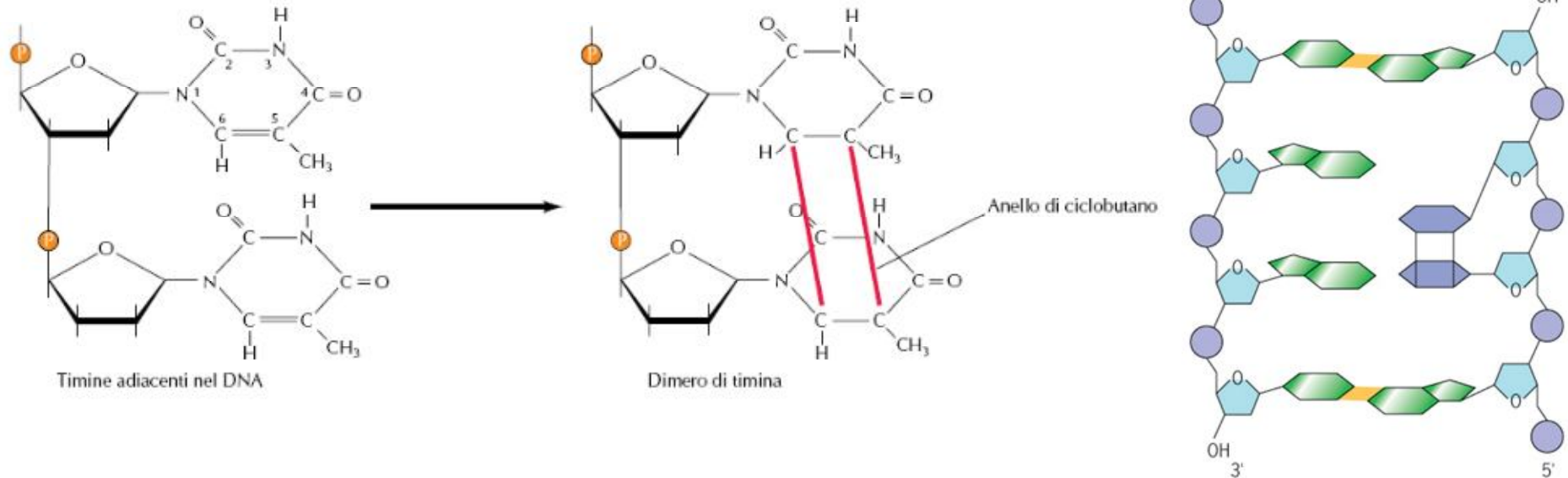


(B) Depurinazione

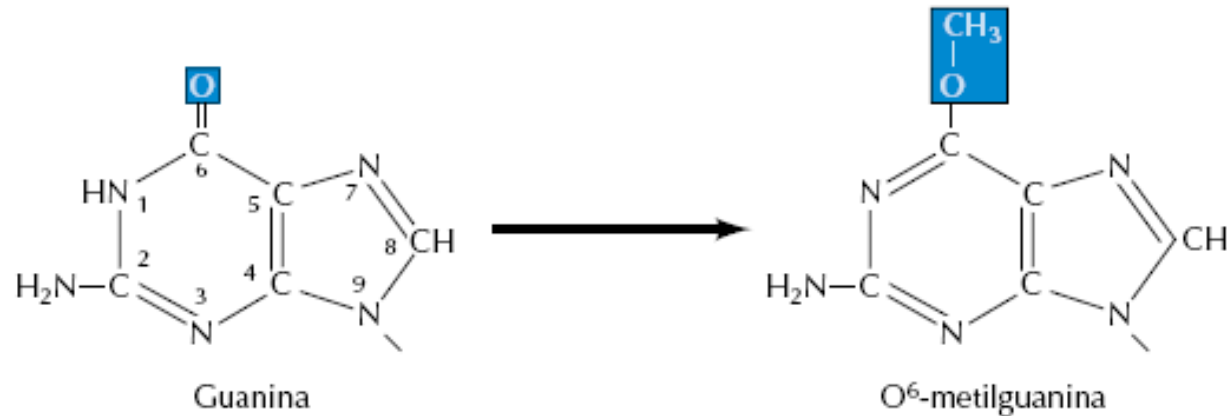


Danneggiamento del DNA indotto da radiazioni e agenti chimici

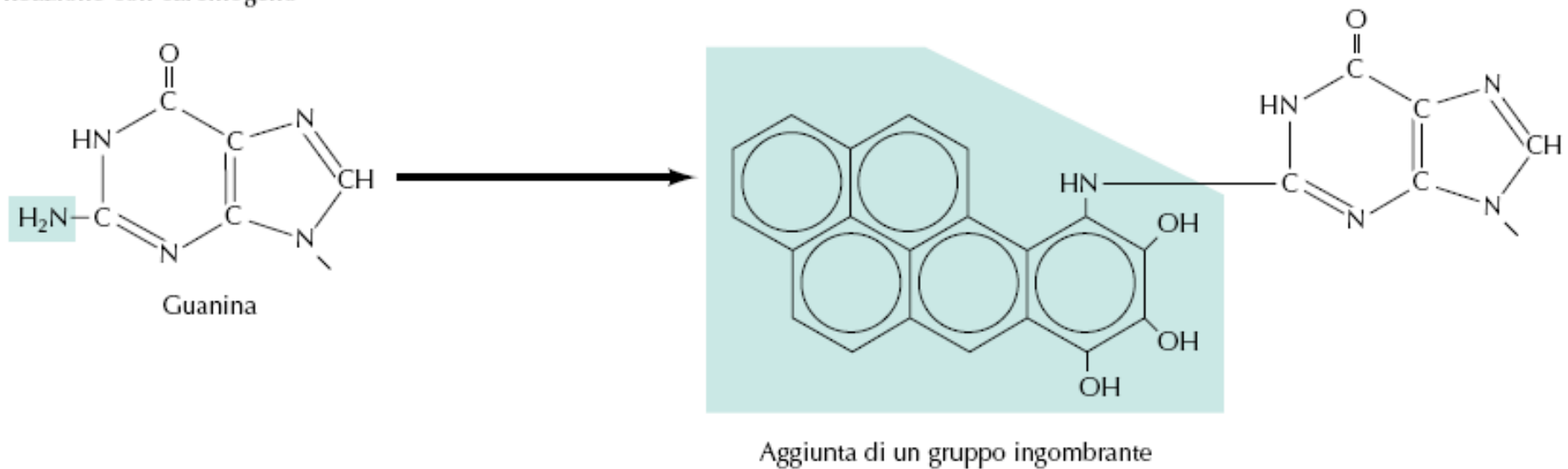
(A) Esposizione a luce UV



(B) Alchilazione

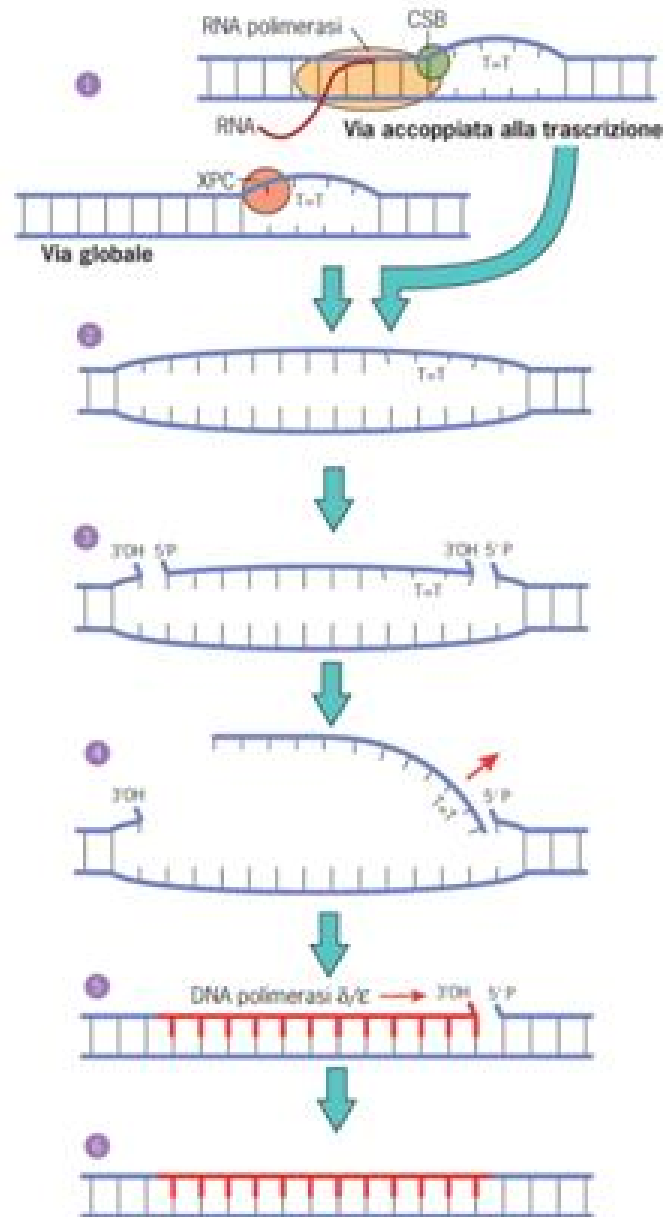


(C) Reazione con carcinogeno

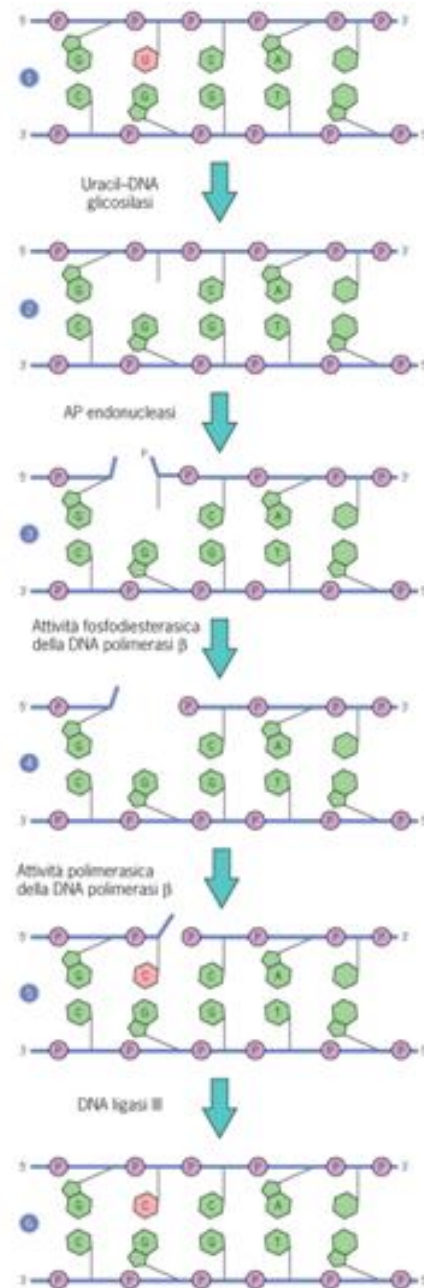


- **Nucleasi di restauro del DNA**: idrolizzano i legami fosfodiesterici creando una lacuna nell'elica
- **DNA polimerasi**: colma la lacuna basandosi sul filamento stampo
- **DNA ligasi**: salda l'incisione sul filamento completando il restauro
- I diversi tipi di danno vengono riconosciuti da enzimi differenti:
AP-ENDONUCLEASI per le depurinazioni; **DNA-GLICOSILASI** per ciascun tipo di base alterata
- Vi è poi un grande complesso enzimatico per il restauro di **LESIONI MASSICCE**

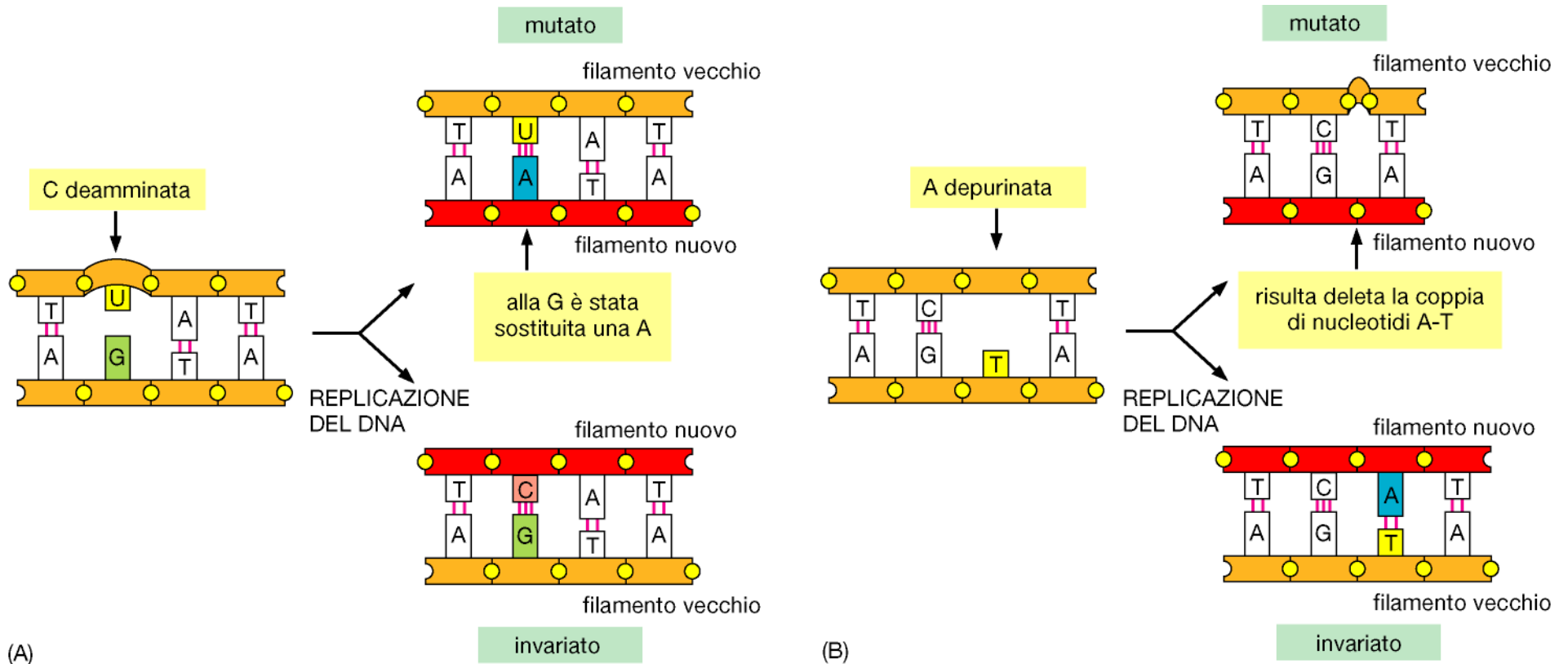
Riparazione per escissione nucleotidica



Riparazione per escissione di base



Se non riparate le modificazioni chimiche dei nucleotidi danno origine a mutazioni





Un polipo del colon visto in colonscopia.
(David M. Martin, M.D./SPL/Photo Researchers, Inc.).

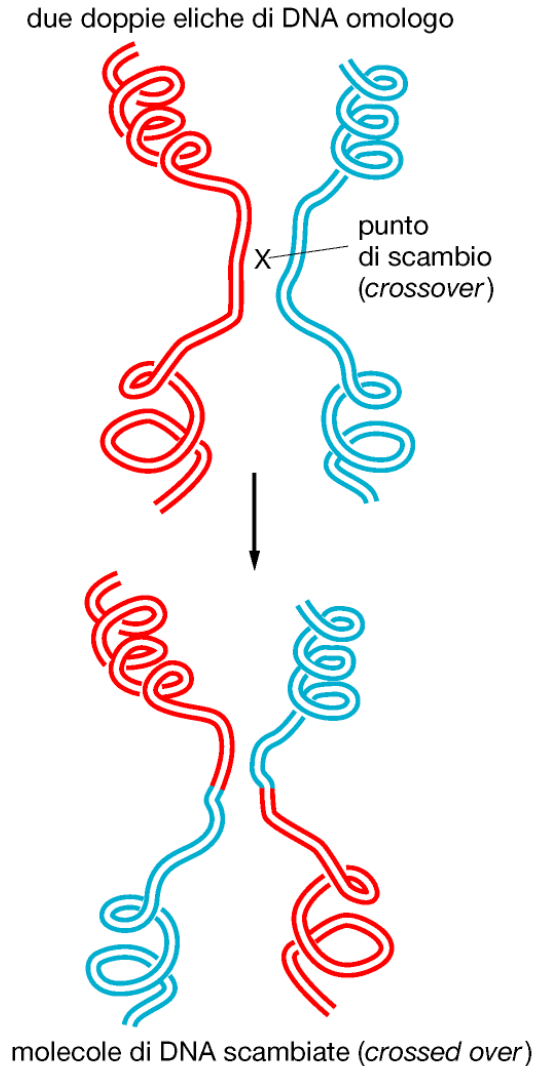
La struttura e le caratteristiche chimiche del DNA, ne facilitano il restauro?

Le **basi** che si generano per deaminazione sono riconoscibili in quanto **innaturali**

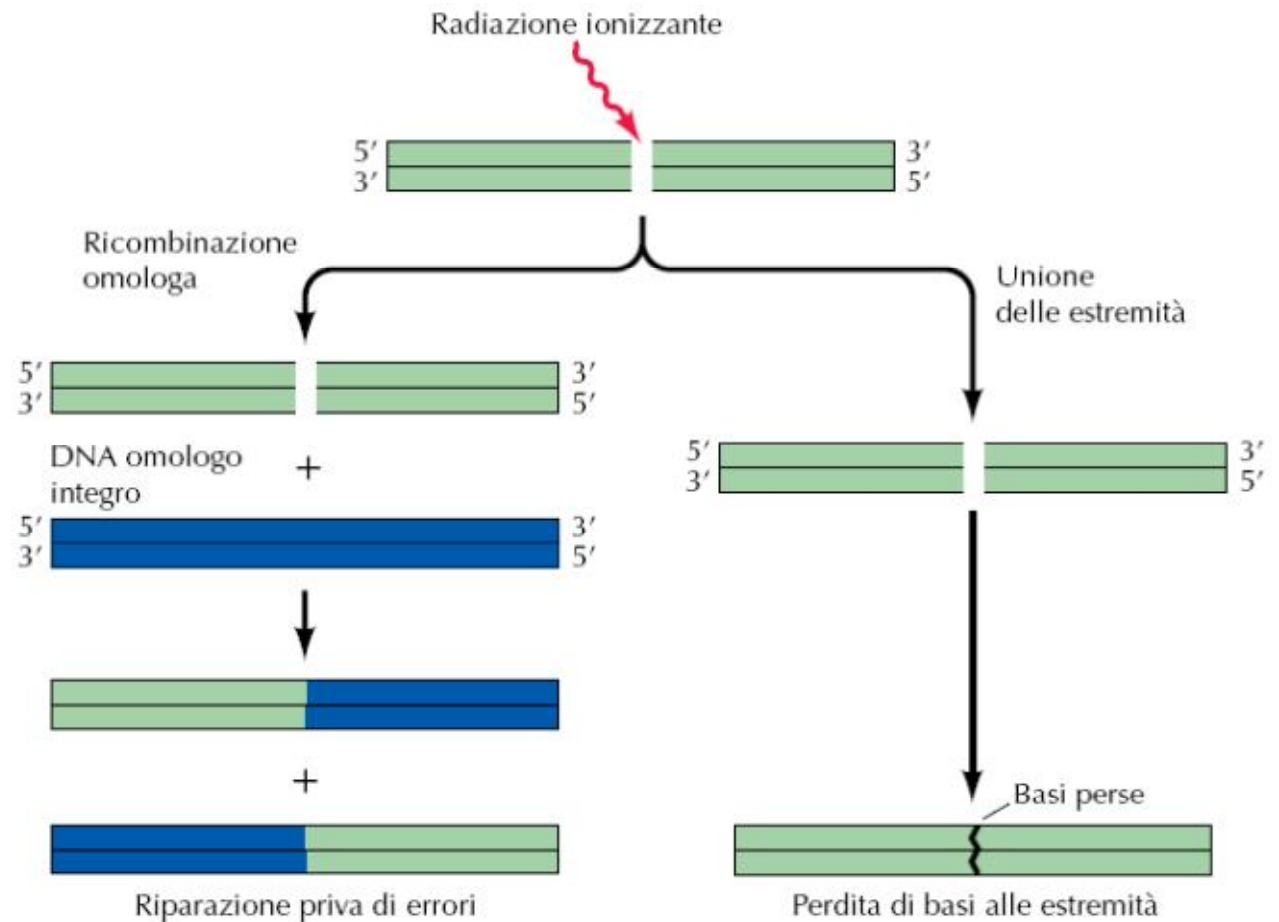
Il restauro è accurato grazie al fatto che l'informazione è in **duplice copia**

La ricombinazione del DNA

Ricombinazione omologa: scambio di informazione genetica ad alta precisione



Riparazione da tagli del doppio filamento di DNA



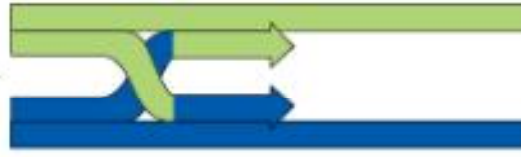
Ipotetici modelli di ricombinazione

Scelta della copia

Sintesi di nuovi DNA figli



Scambio per copiare l'altro stampo parentale



DNA figli ricombinanti



Taglio e unione

DNA parentali



Taglio e unione incrociata

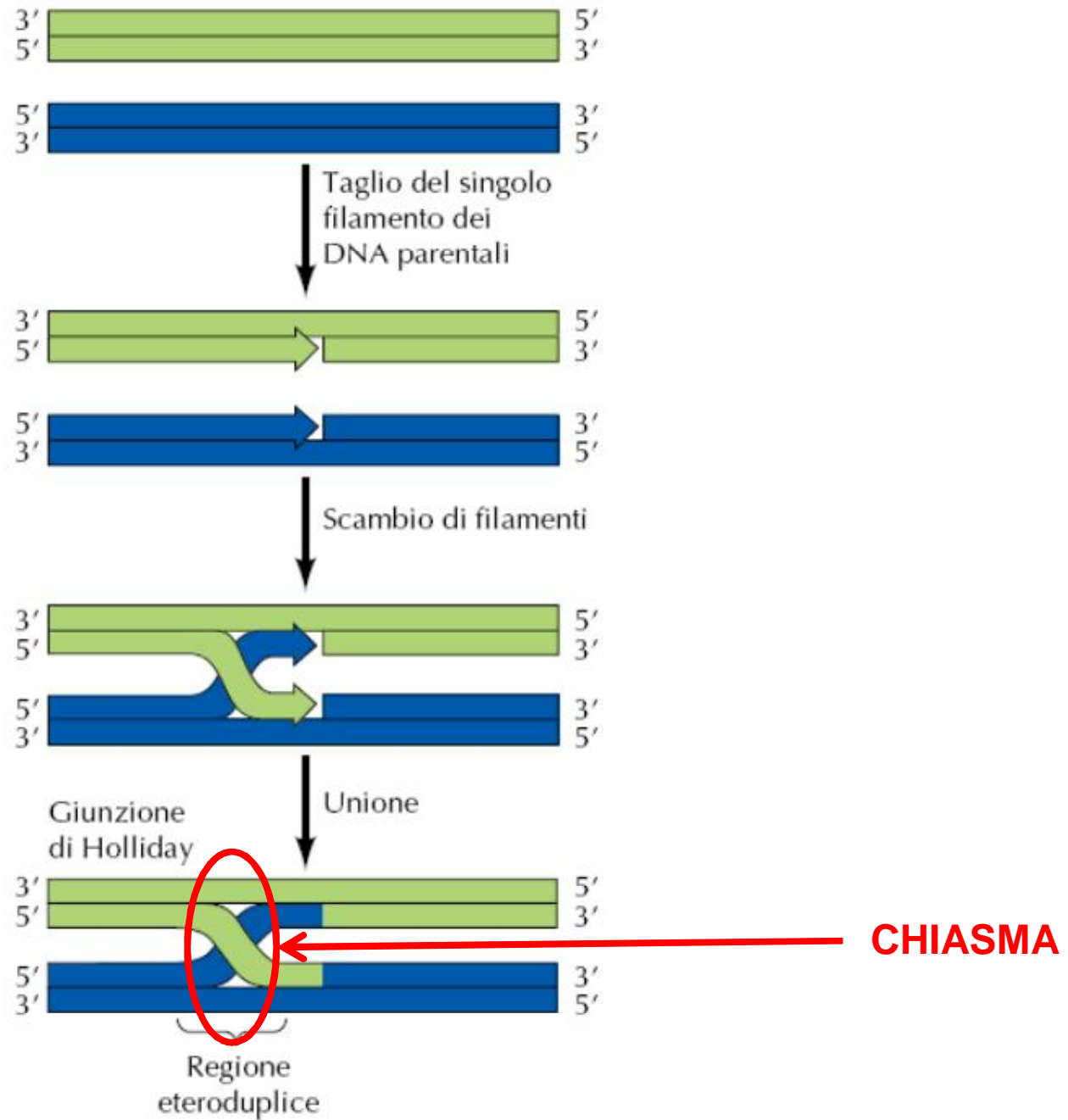


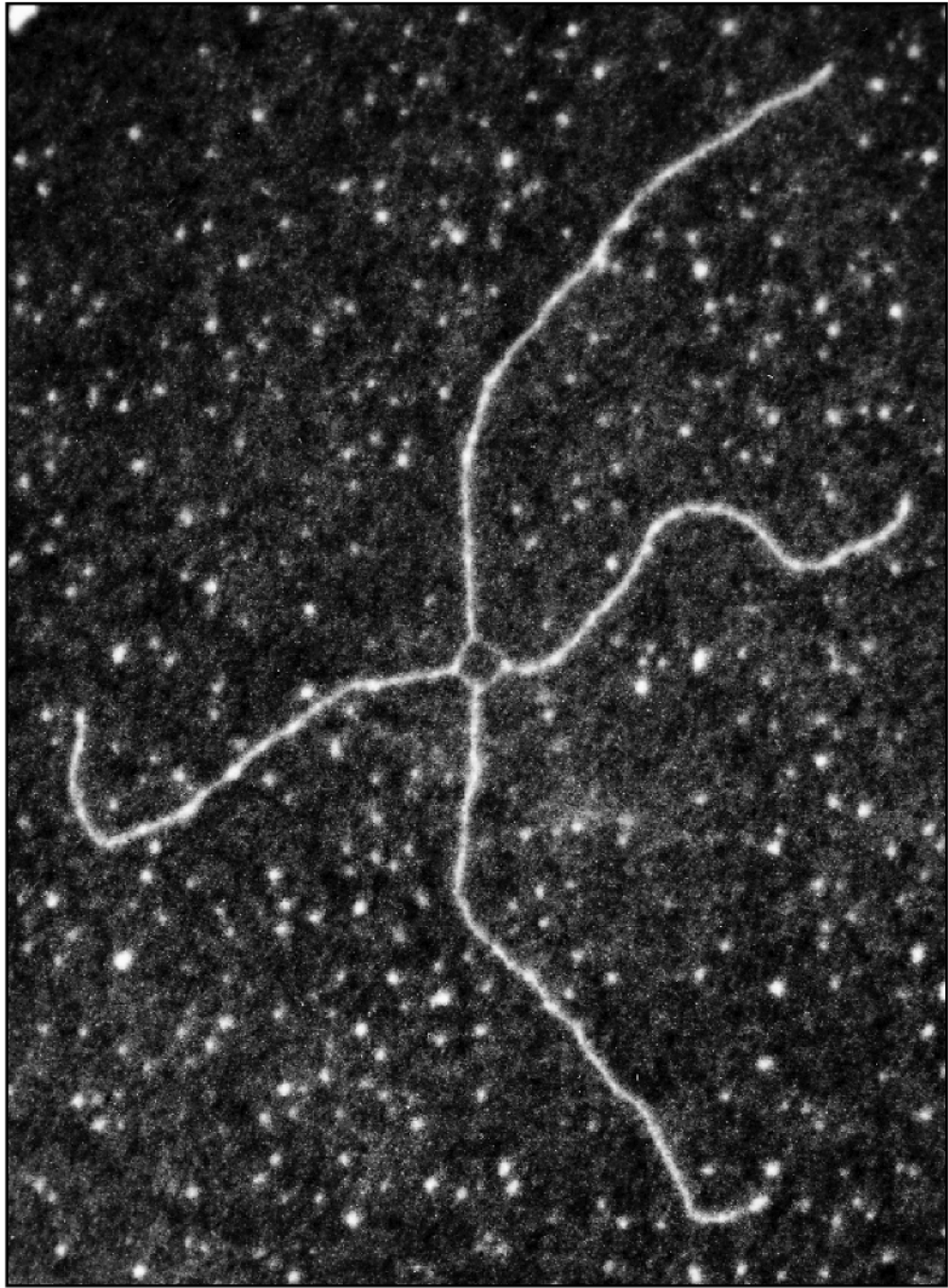
DNA ricombinanti



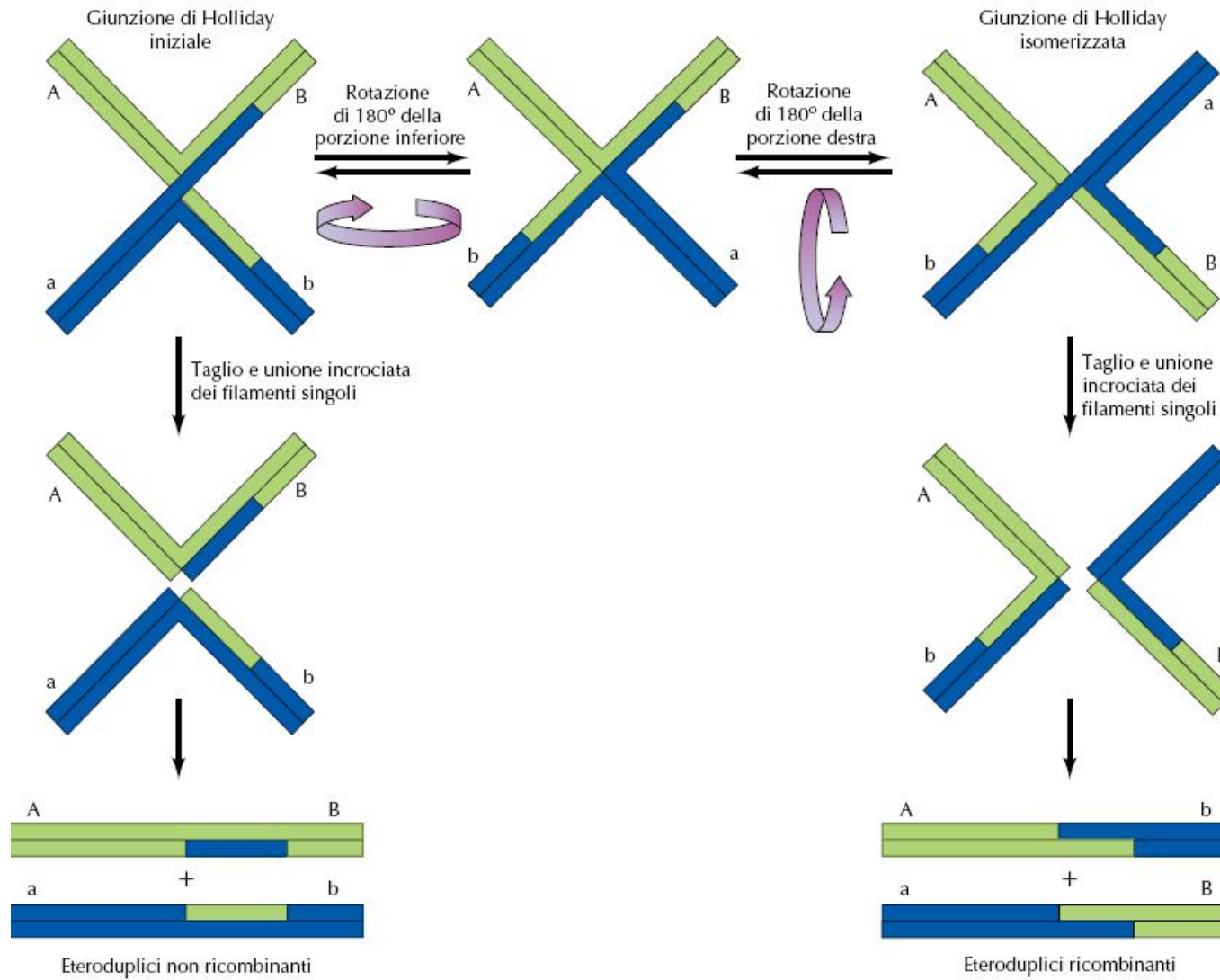
E' stato poi dimostrato che il modello corretto era quello della rottura e riunione

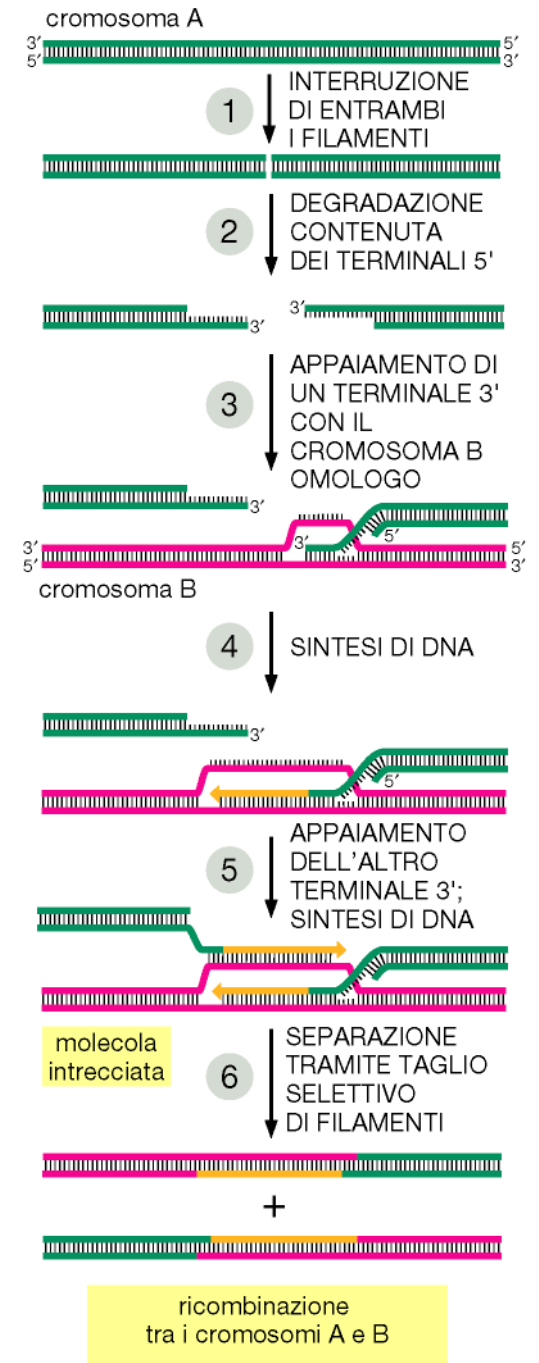
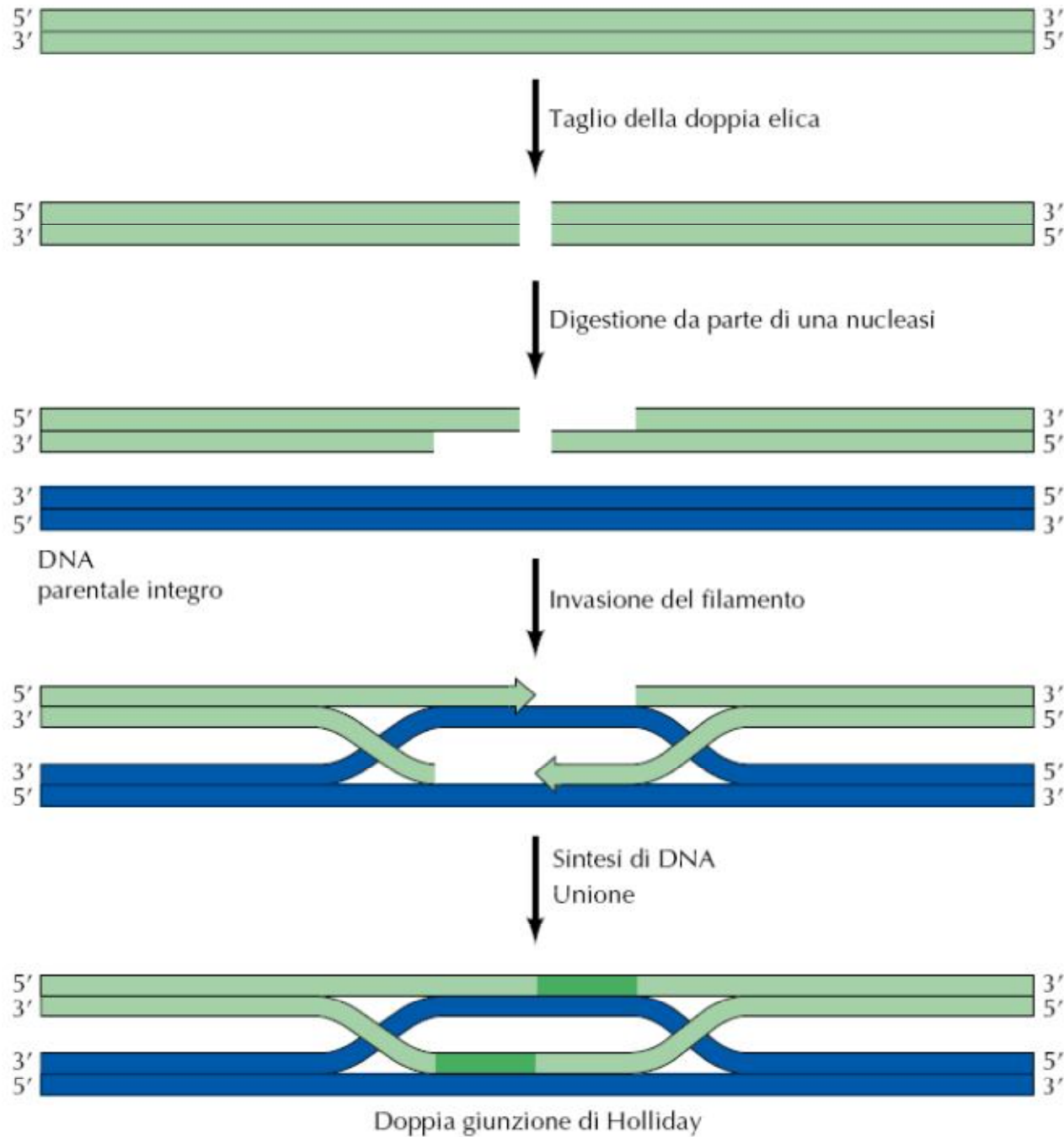
Il modello di Holliday per la ricombinazione omologa



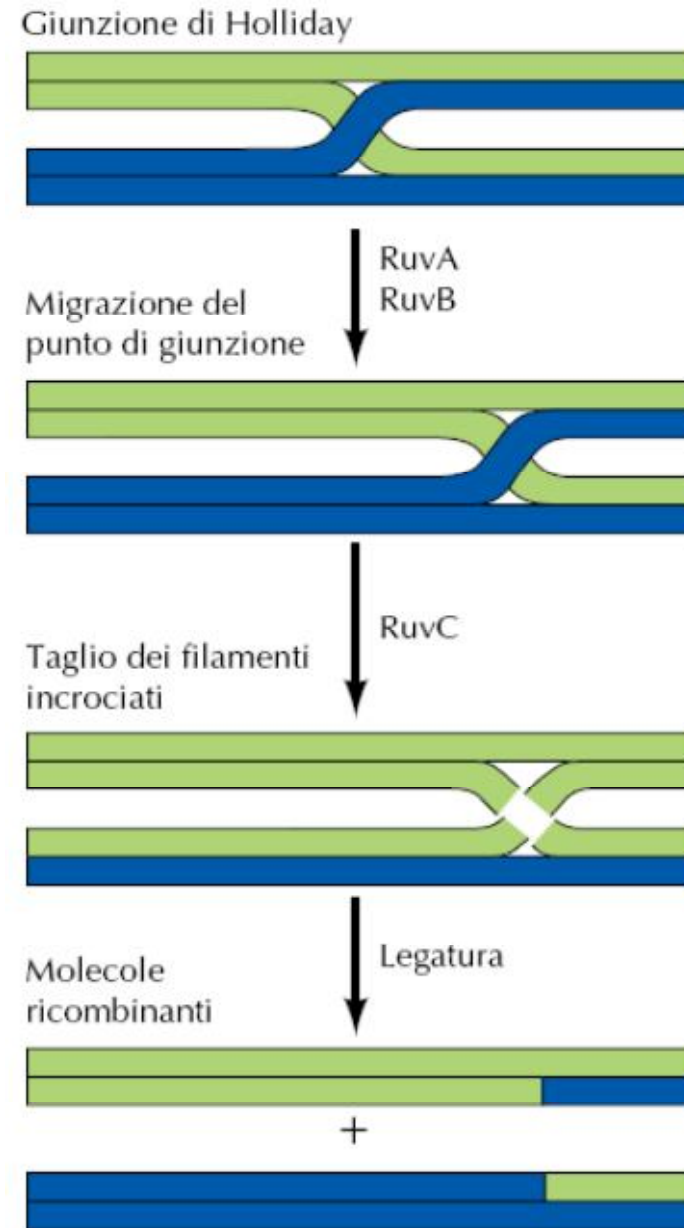
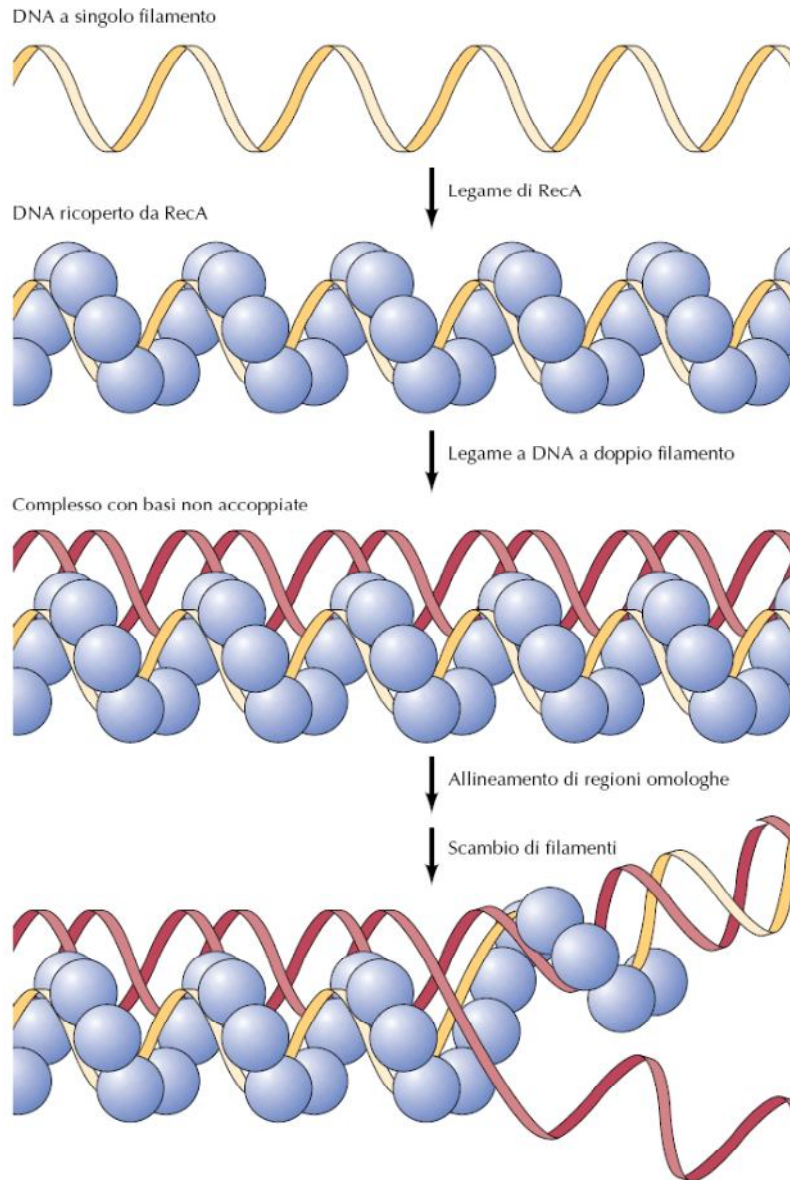


Giunzione di Holliday





Gli enzimi coinvolti nella ricombinazione omologa E. Coli



Ricombinazione sito specifica: avviene tra sequenze specifiche di

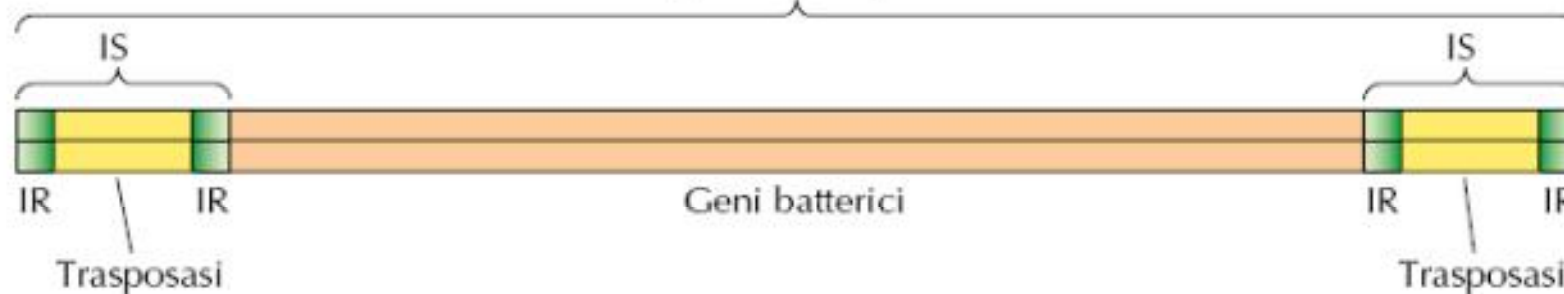
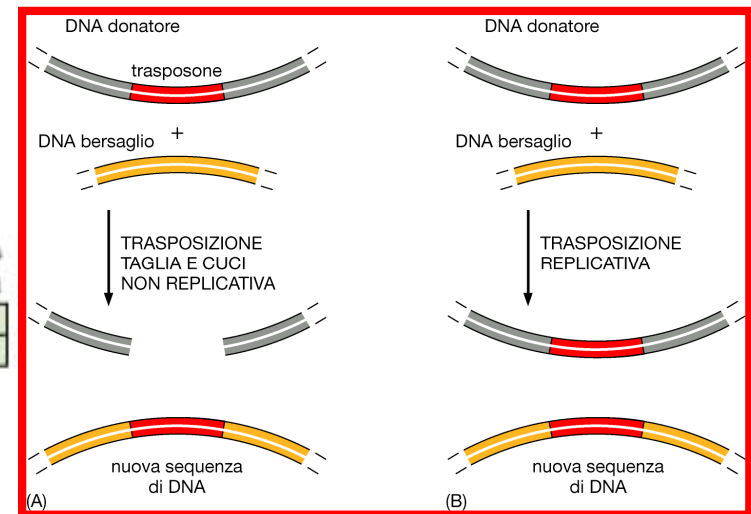
DNA, sequenze dissimili, di solito omologhe solo per un breve tratto

Svolge il suo ruolo principale nella disseminazione di tratti di DNA detti

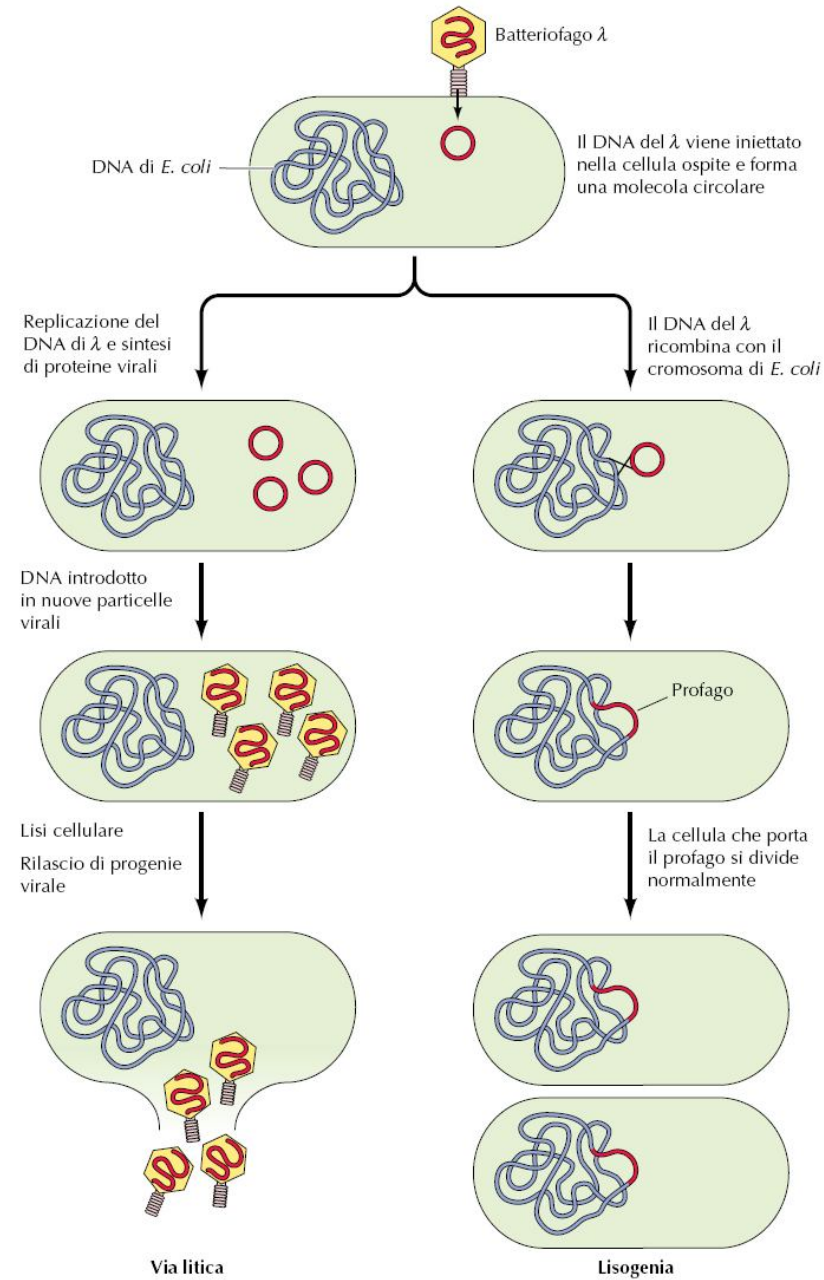
elementi genetici mobili (~ 45% genoma umano)

Gli elementi genetici mobili codificano le molecole di cui hanno bisogno per spostarsi

Nei batteri i più frequenti sono i **trasposoni a solo DNA**, che si muovono grazie a enzimi detti **trasposasi**



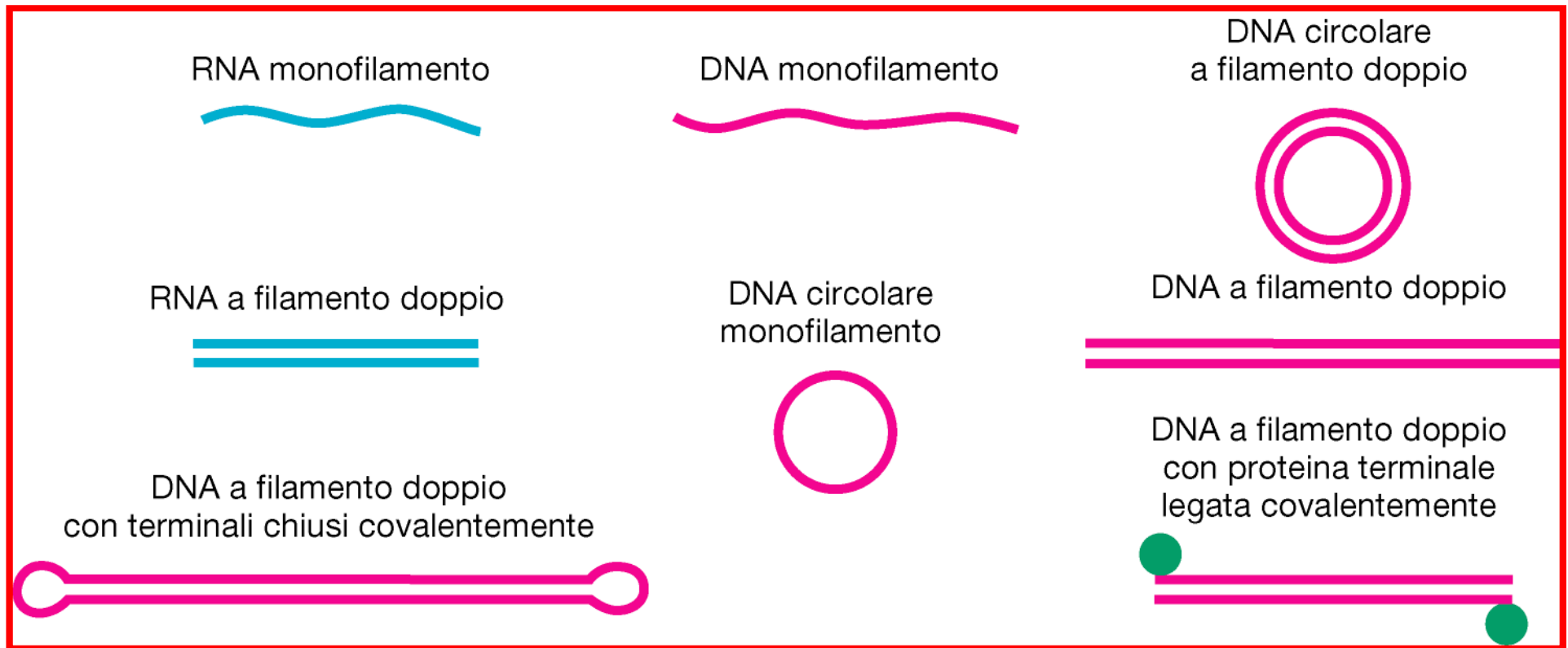
Via litica e via lisogena del batteriofago λ



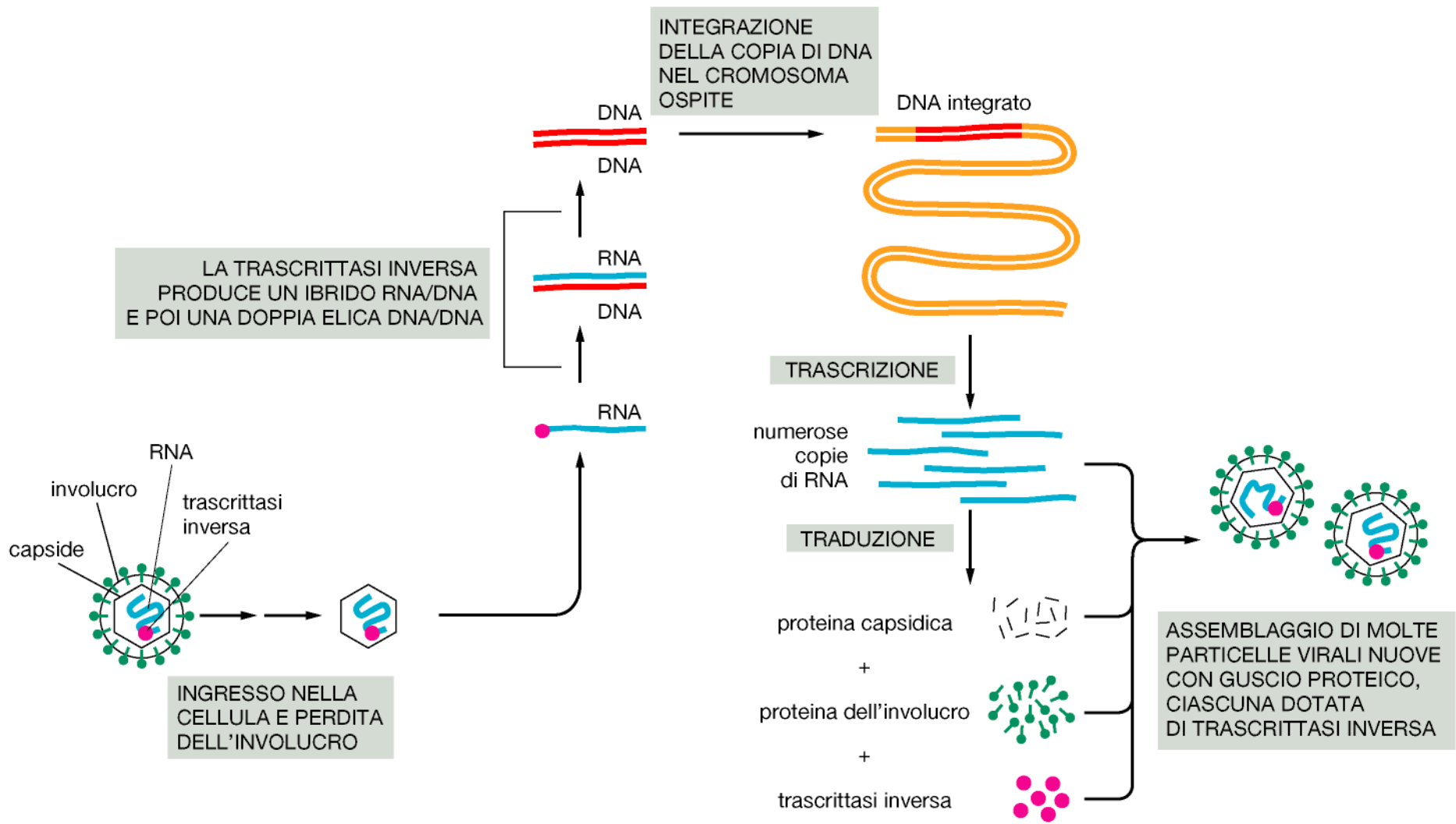
I virus sono elementi genetici a mobilità completa capaci di uscire dalla cellula

Sono poco più che geni rivestiti da un involucro protettivo. Per riprodursi dipendono dalle cellule ospiti

Genomi virali



Nel retrovirus l'informazione genetica fluisce in direzione opposta a quella consueta



Trasposoni a solo DNA

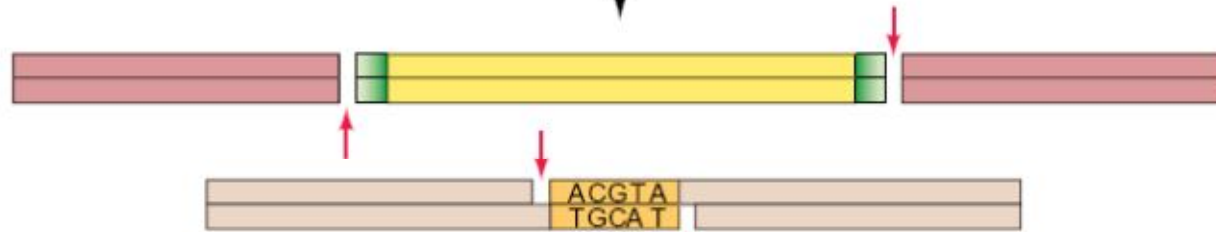
Trasposone integrato nel sito donatore



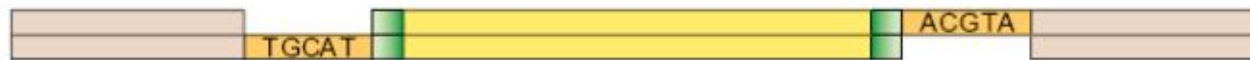
Sito bersaglio



La trasposasi taglia alle estremità delle ripetizioni invertite del trasposone e introduce tagli sfalsati nel DNA bersaglio



Estremità sporgenti del DNA bersaglio unite al trasposone



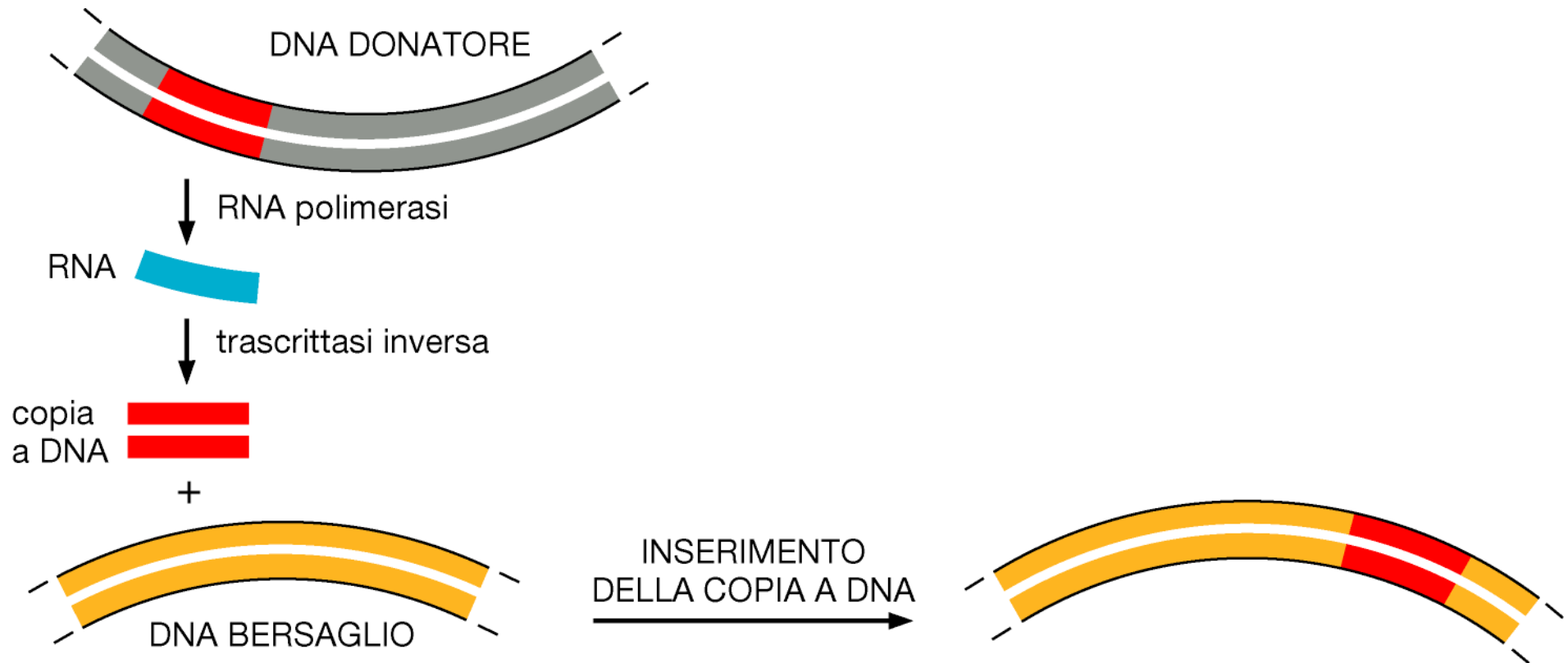
Interruzioni riparate mediante sintesi di DNA

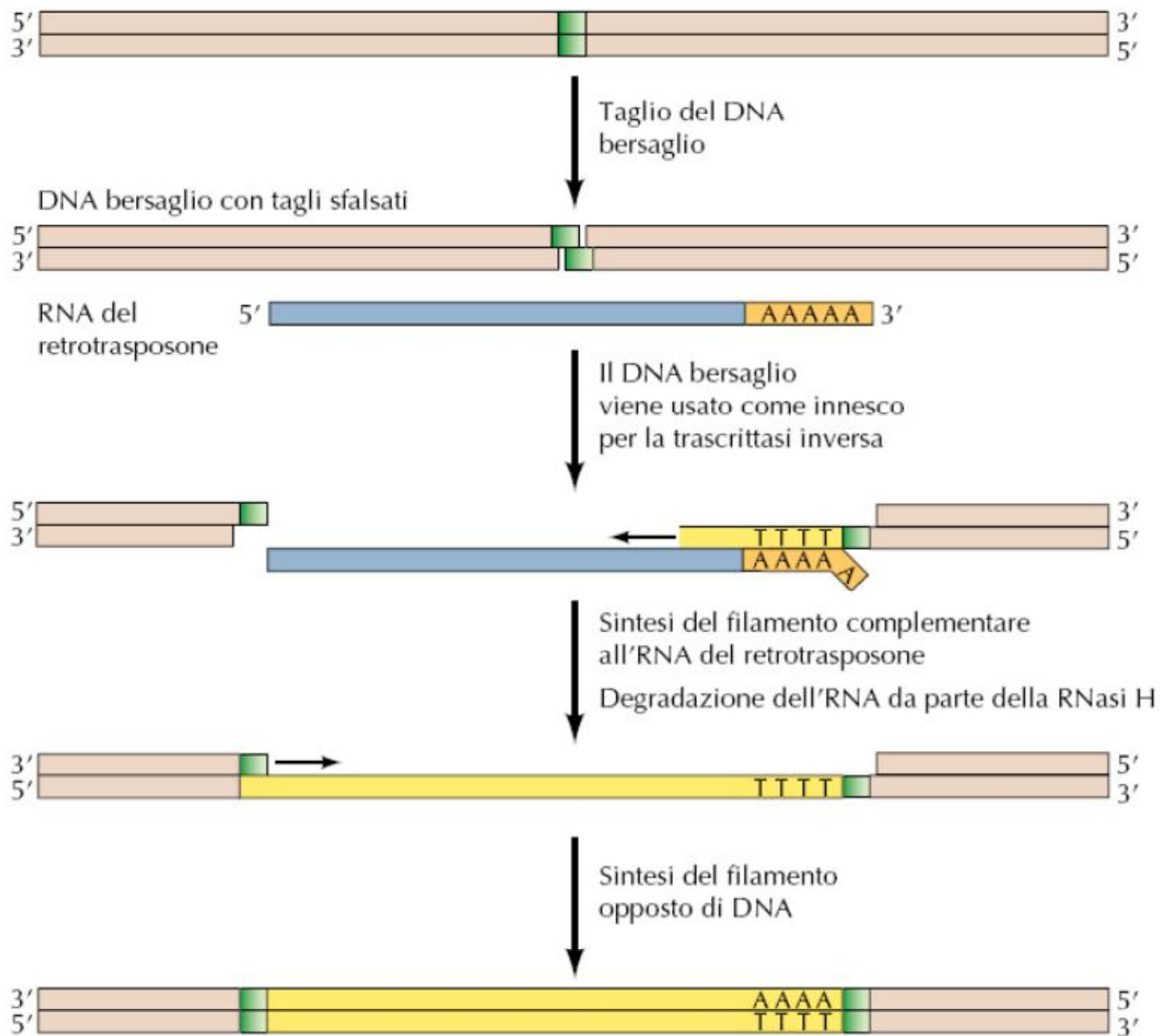


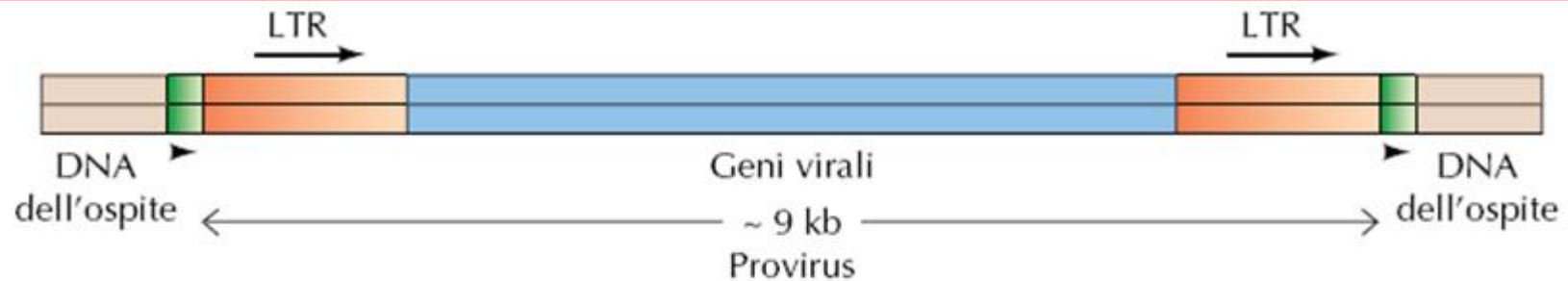
Ripetizioni dirette del DNA del sito bersaglio

Trasposizione mediante intermedi di RNA

RETROTRASPOSONI

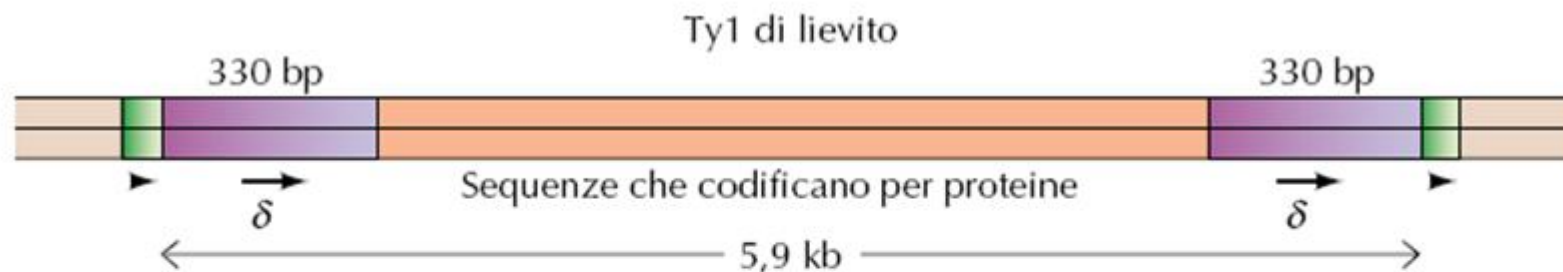






Organizzazione del DNA retrovirale

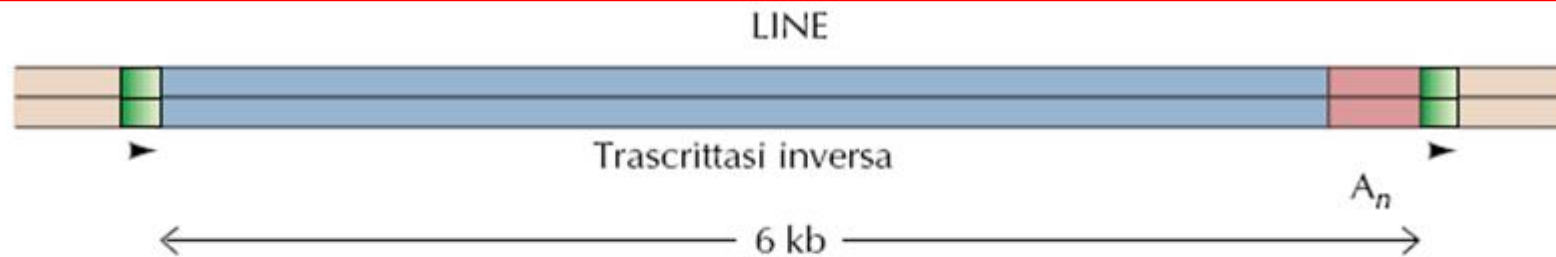
Il DNA provirale integrato è fiancheggiato da ripetizioni terminali lunghe (LTR), che sono ripetizioni dirette di parecchie centinaia di nucleotidi. I geni virali, compresi i geni per la trascrittasi inversa e per proteine strutturali della particella virale, si trovano fra le LTR. Il provirus integrato è fiancheggiato da brevi ripetizioni dirette del DNA dell'ospite.



Struttura di un retrotrasposone LTR

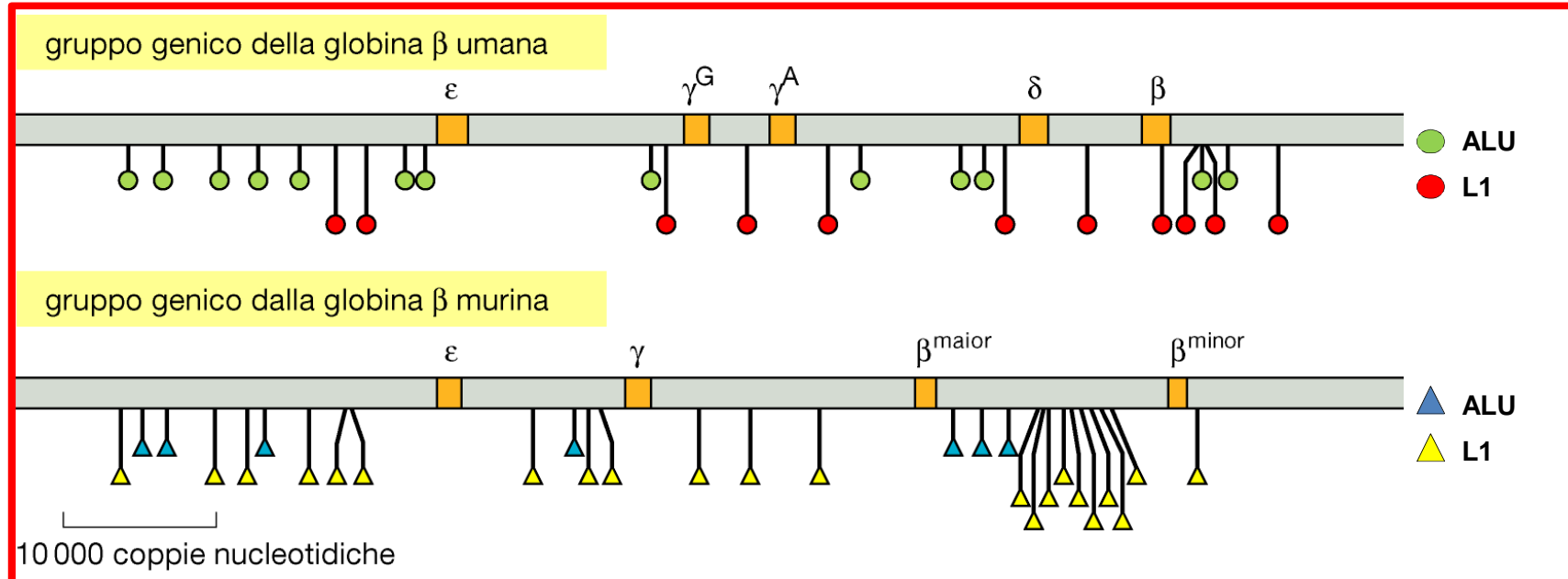
L'elemento trasponibile Ty1 di lievito mostra la stessa organizzazione di un retrovirus. Sequenze che codificano proteine, compresi i geni per la trascrittasi inversa e per le proteine di integrazione, sono fiancheggiate da LTR (chiamati elementi δ) di circa 330 coppie di basi (bp). Il trasposone integrato è fiancheggiato da brevi ripetizioni di DNA del sito bersaglio.

Nel genoma umano le due famiglie di sequenze trasponibili più rappresentate sono: **RETROTRASPOSONI** e sequenze **ALU**



Struttura di LINE umani (Long INterspersed Elements)

I LINE sono privi di LTR, ma codificano la trascrittasi inversa. Essi hanno tratti di sequenze ricche di A (designate A_n) alle loro estremità 3', che si pensa derivino dalla trascrizione inversa di code di poli-A aggiunte alle estremità 3' degli mRNA. Come gli altri elementi trasponibili, i LINE sono fiancheggiati da brevi ripetizioni dirette da DNA del sito bersaglio.



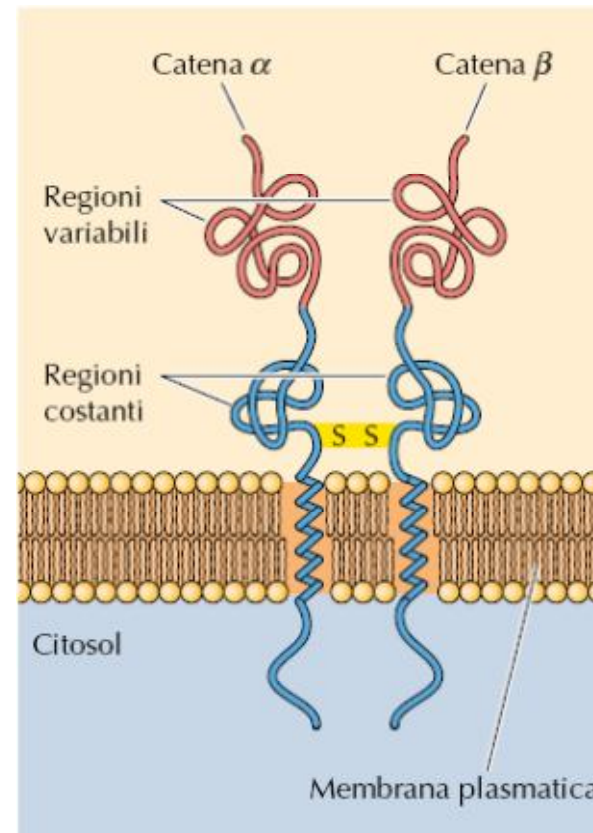
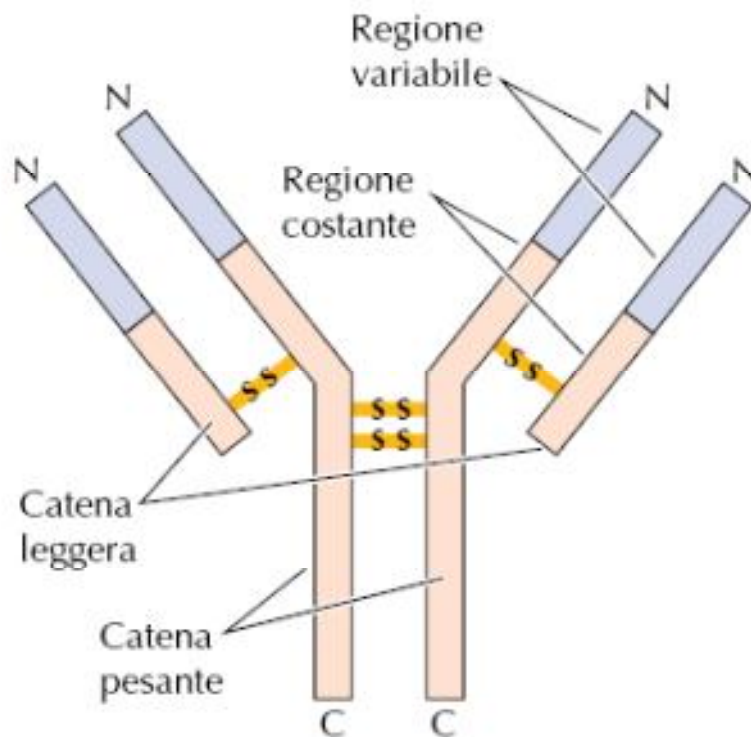
Altri esempi importanti di ricombinazione sito specifica

Riarrangiamenti programmati di geni nei genomi:

l'esempio del **SISTEMA IMMUNITARIO**

Cellule B
Immunoglobuline

Cellule T
Recettori di cellule T



Riarrangiamento dei geni delle catene leggere delle immunoglobuline

