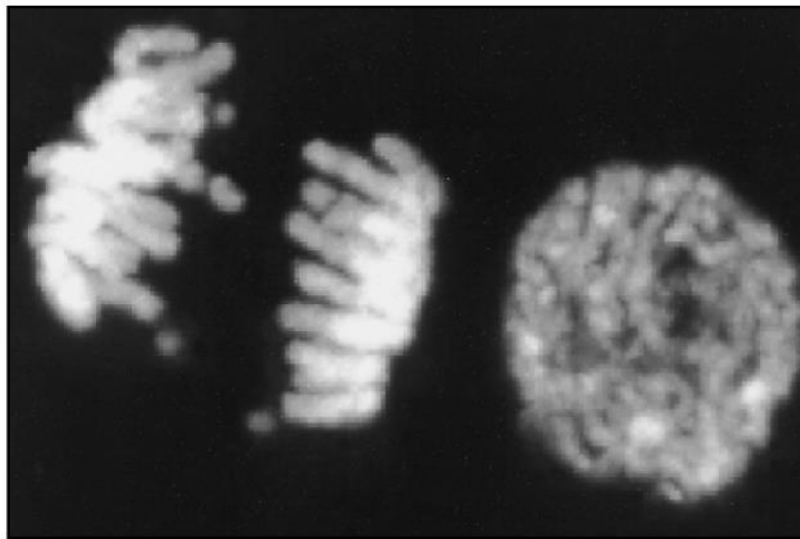


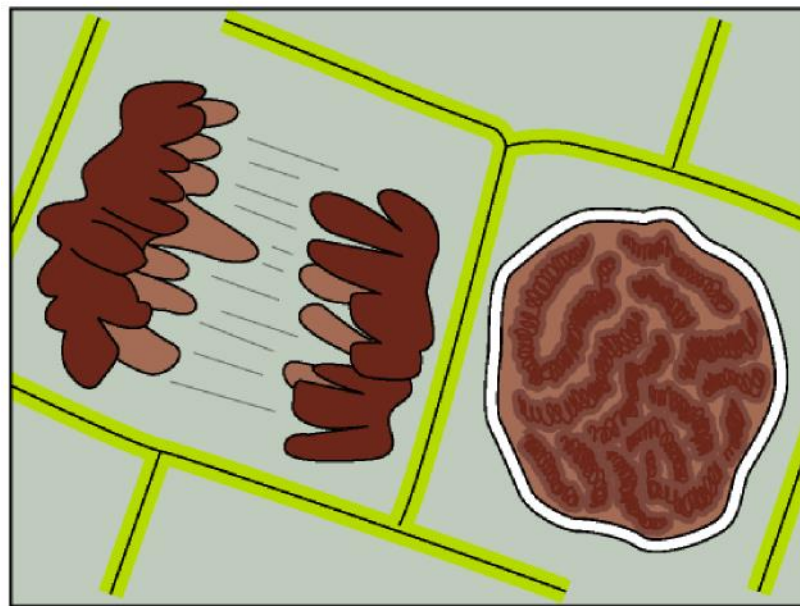
DNA e CROMOSOMI

Come il DNA si replica, si ripara e ricombina

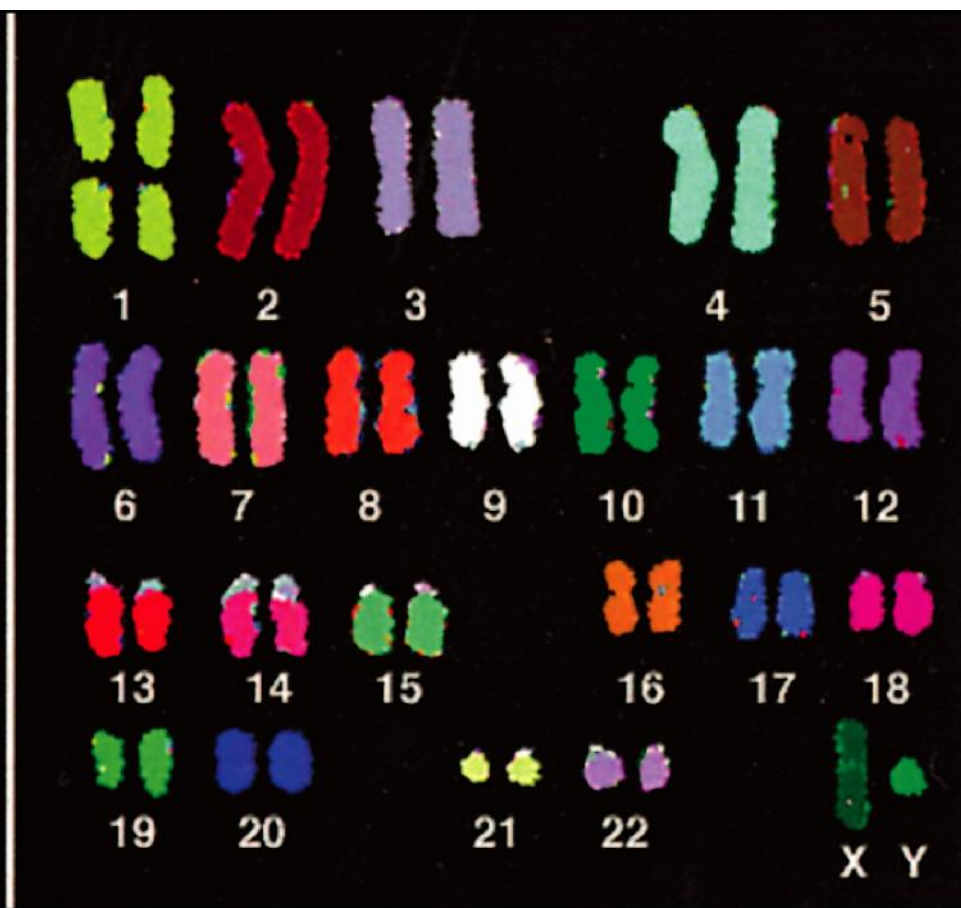
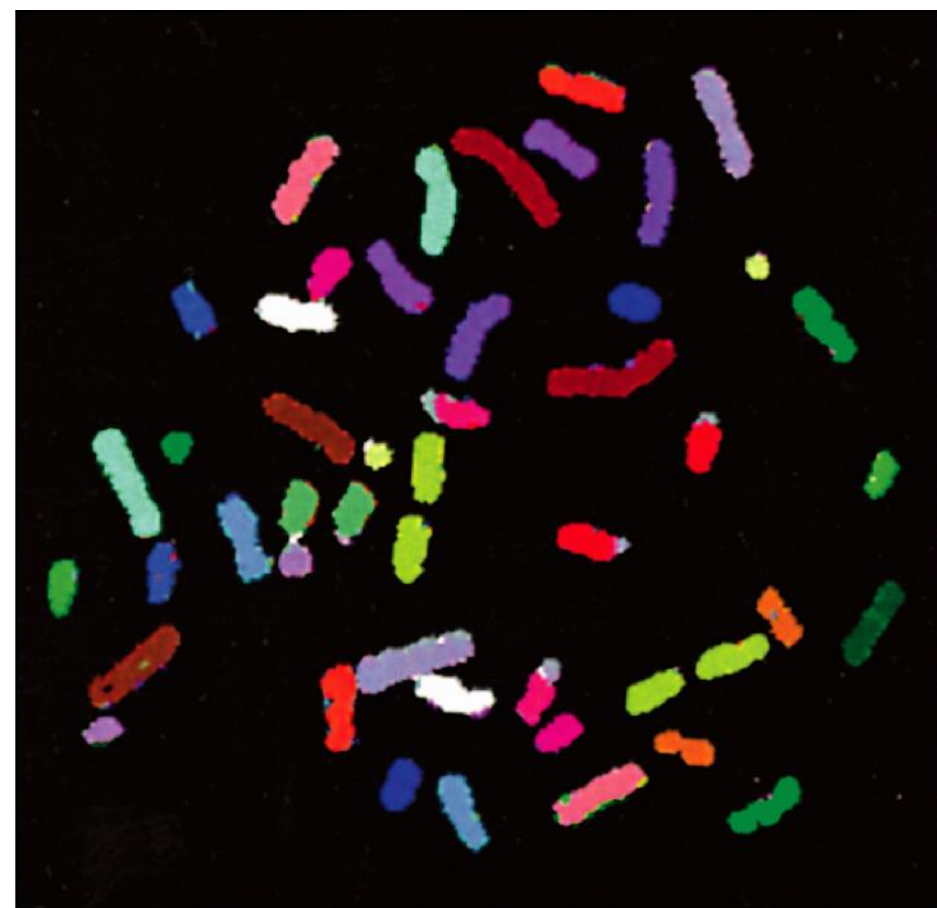


cellula
in divisione

cellula che non si sta
dividendo

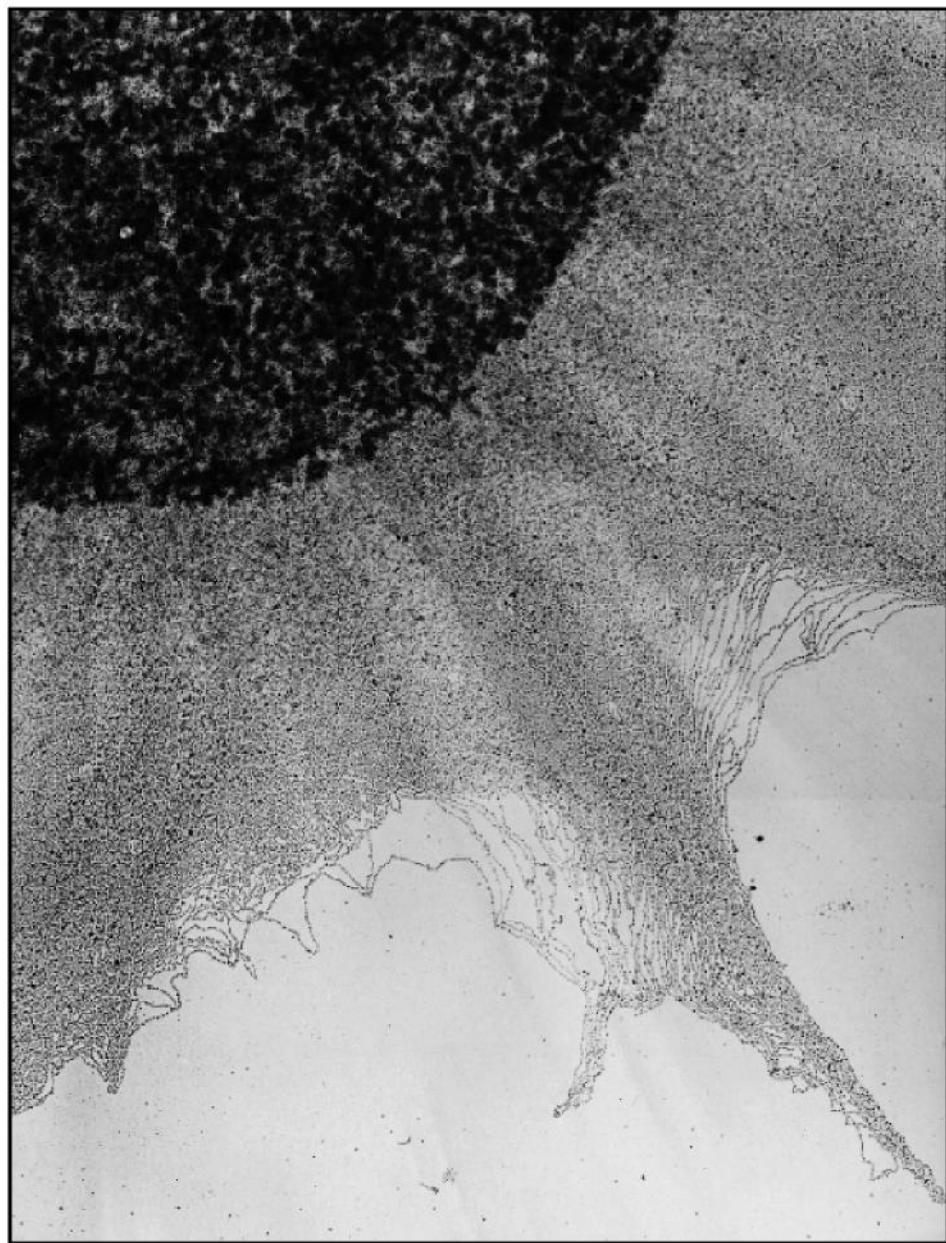


10 μm



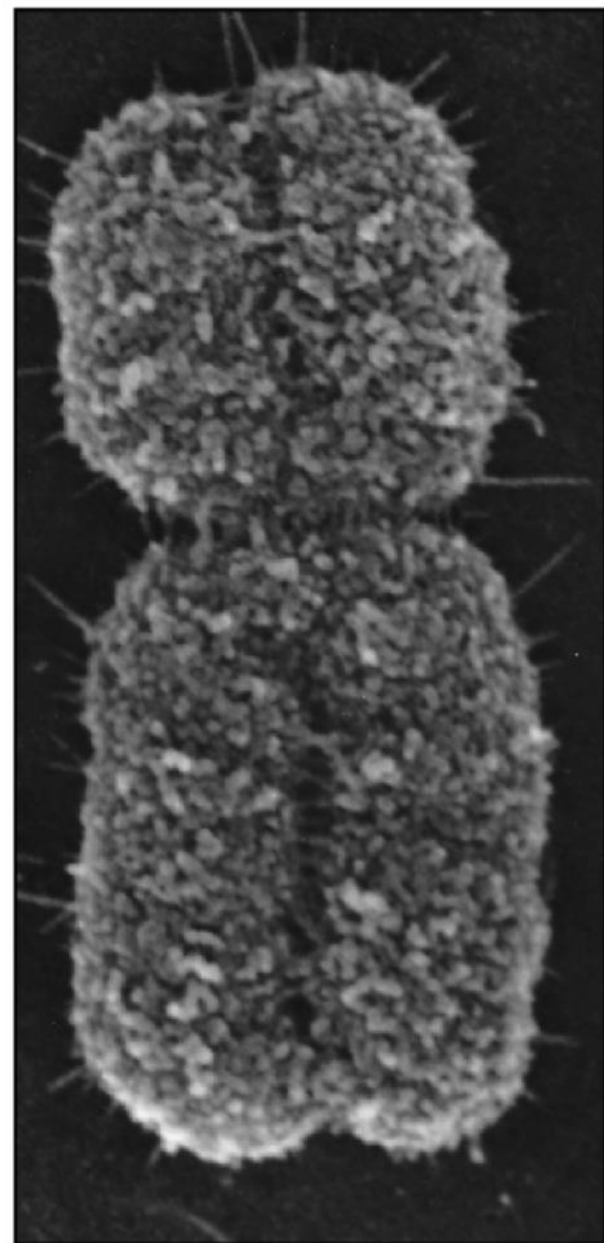
(A)

(B)



(A)

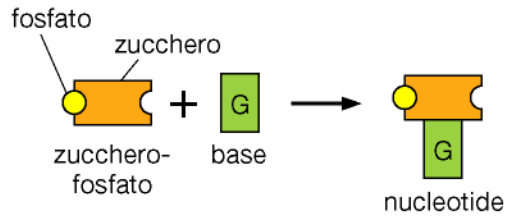
10 μm



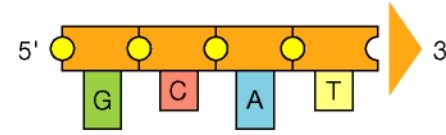
(B)

1 μm

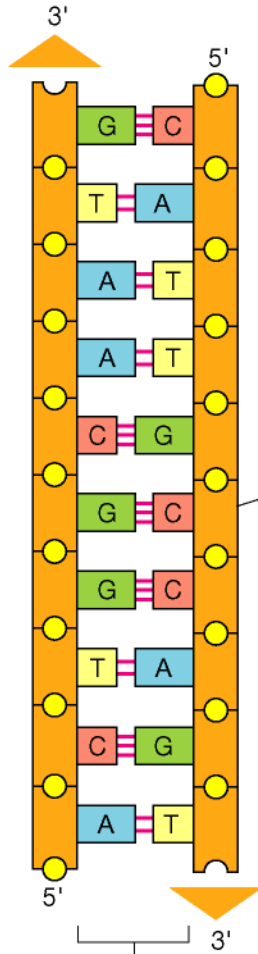
elementi costitutivi del DNA



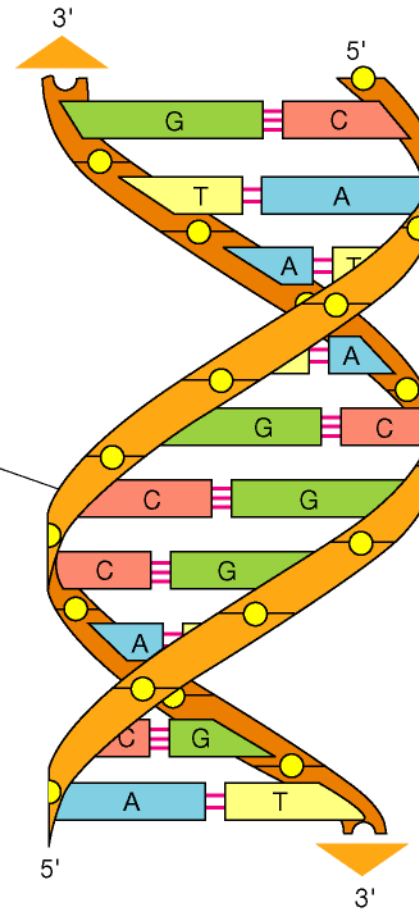
filamento di DNA



doppio filamento di DNA



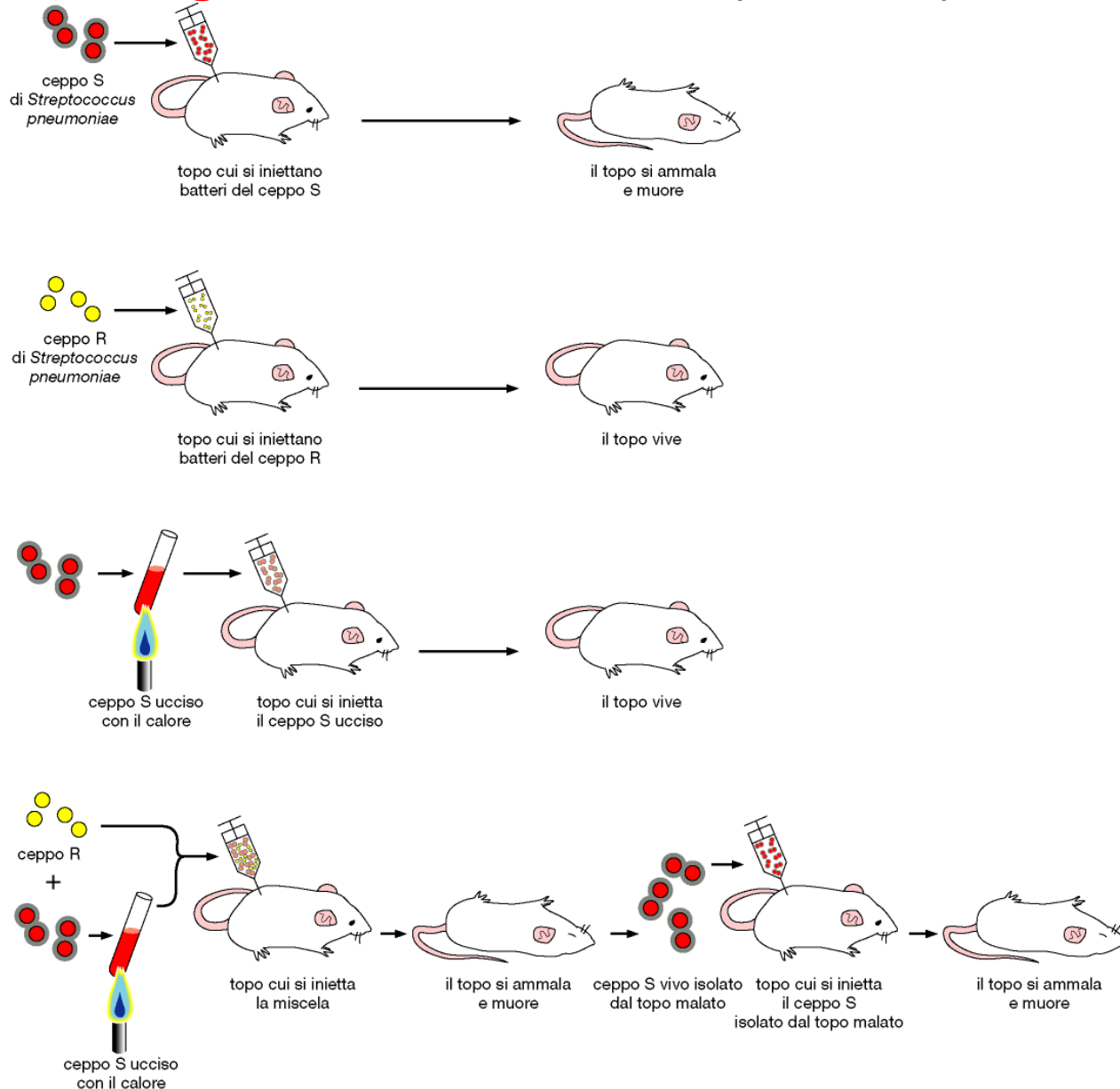
doppia elica di DNA



ossatura
zucchero-fosfato

coppie di basi unite
da legami idrogeno

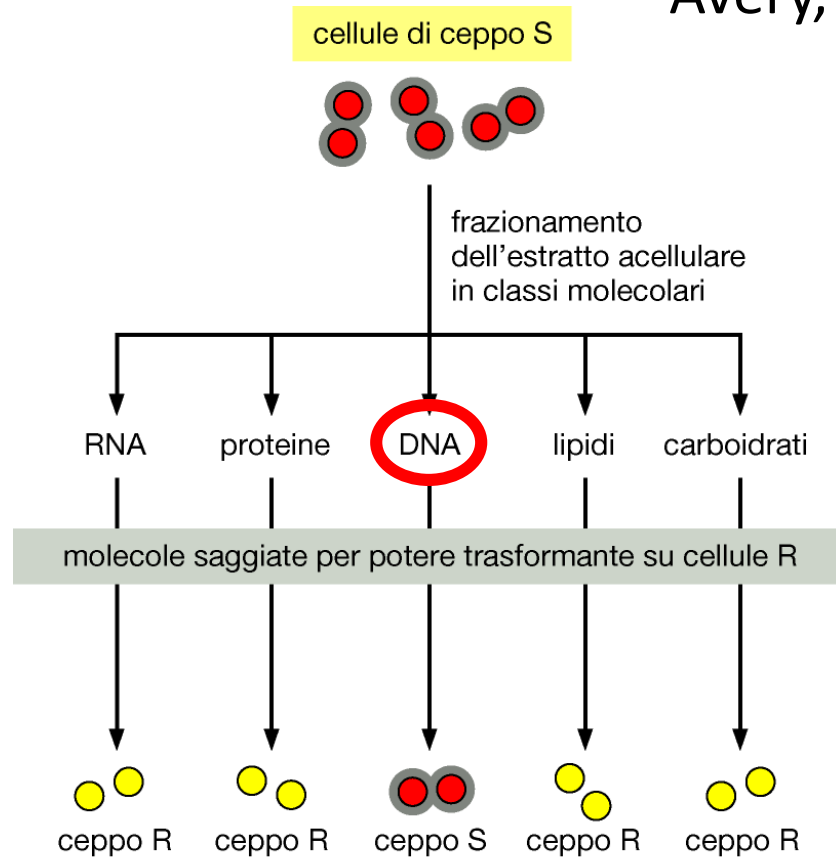
Nel 1928 venne dimostrato che il **DNA** è il **materiale genetico** dei batteri (Griffith)



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

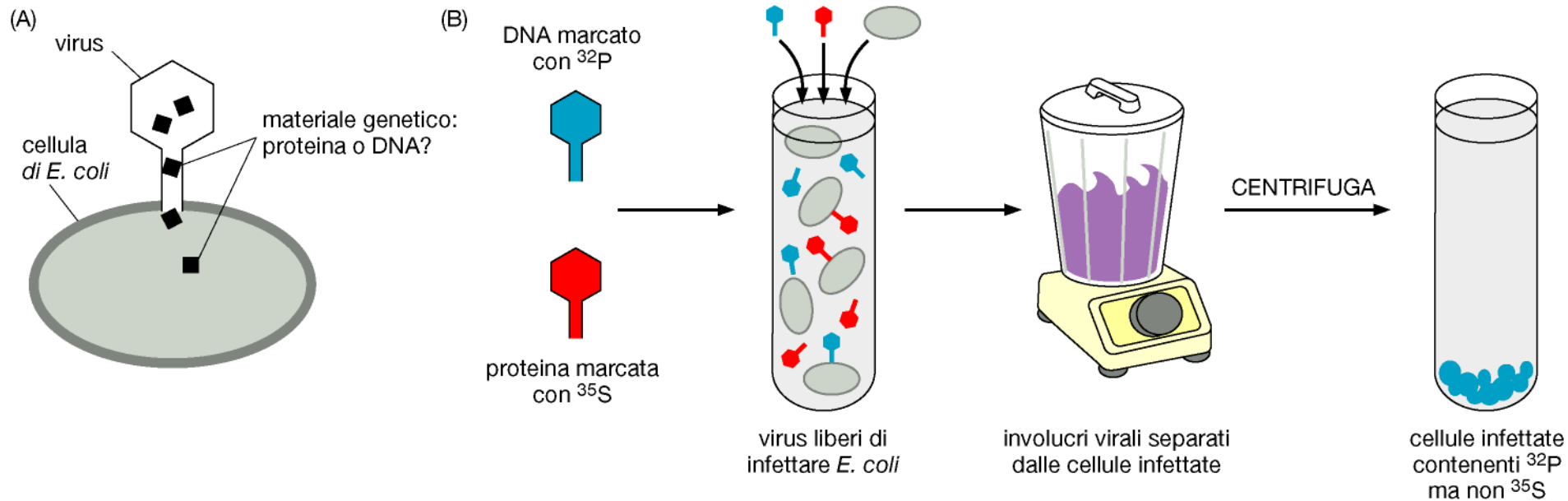
PRINCIPIO TRASFORMANTE

Avery, MacLeod, McCarty



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

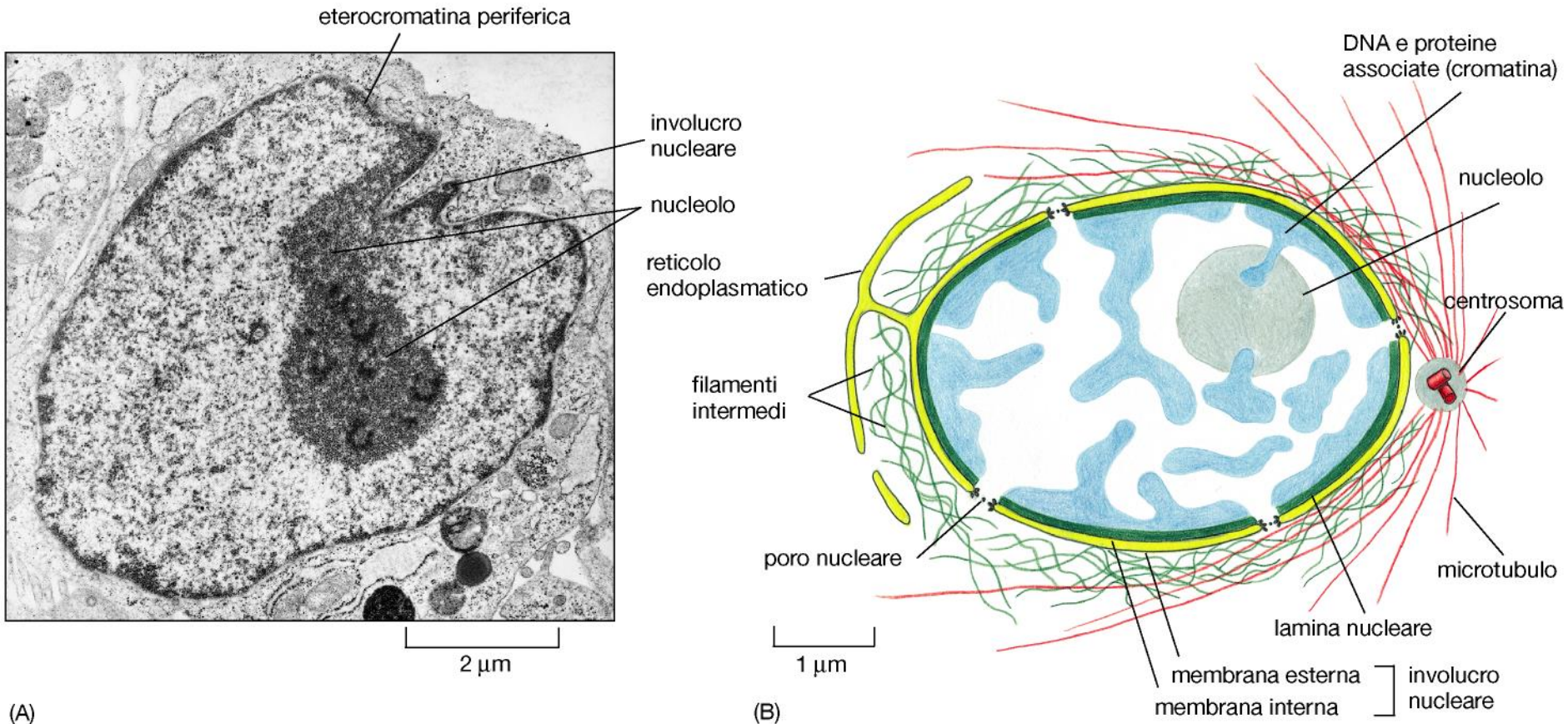
Nel 1952 venne dimostrato che il **DNA** è il **materiale genetico** dei virus (Hershey e Chase)
(In alcuni virus il materiale genetico è l' **RNA**)



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

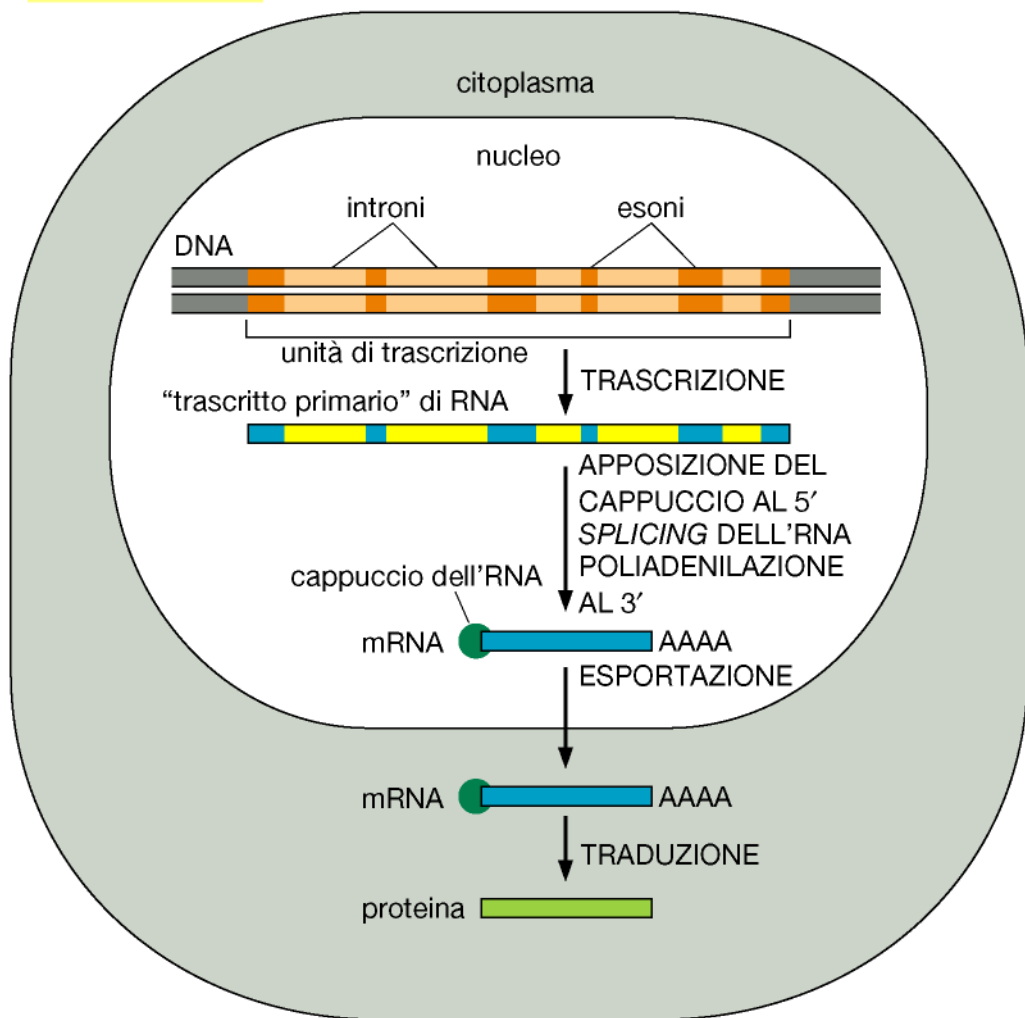
Esperimenti di **trasfezione** (equivalente negli eucarioti della trasformazione batterica) hanno dimostrato che il **DNA è il materiale genetico anche delle cellule animali**

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

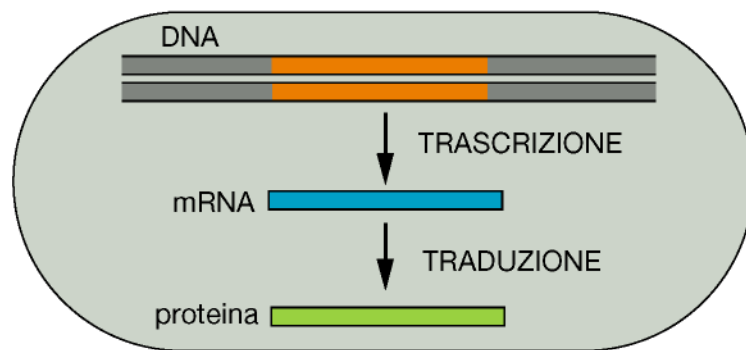


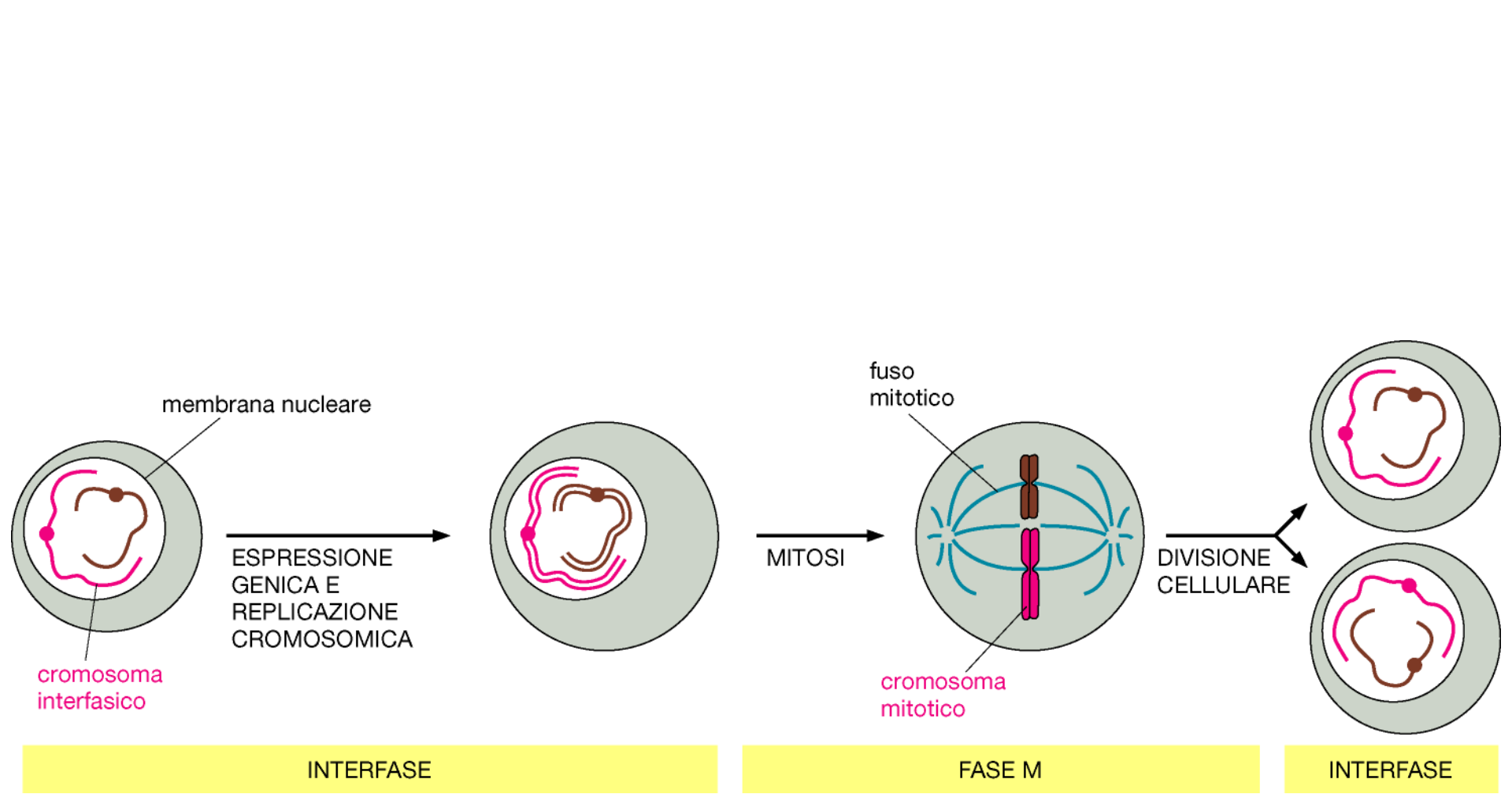
- per proteggere le lunghe e fragili molecole di DNA da urti meccanici
- per mantenere separate spazialmente e temporalmente trascrizione e traduzione
- perché il meccanismo dello *splicing* non venga disturbato dai ribosomi

(A) EUCARIOTI

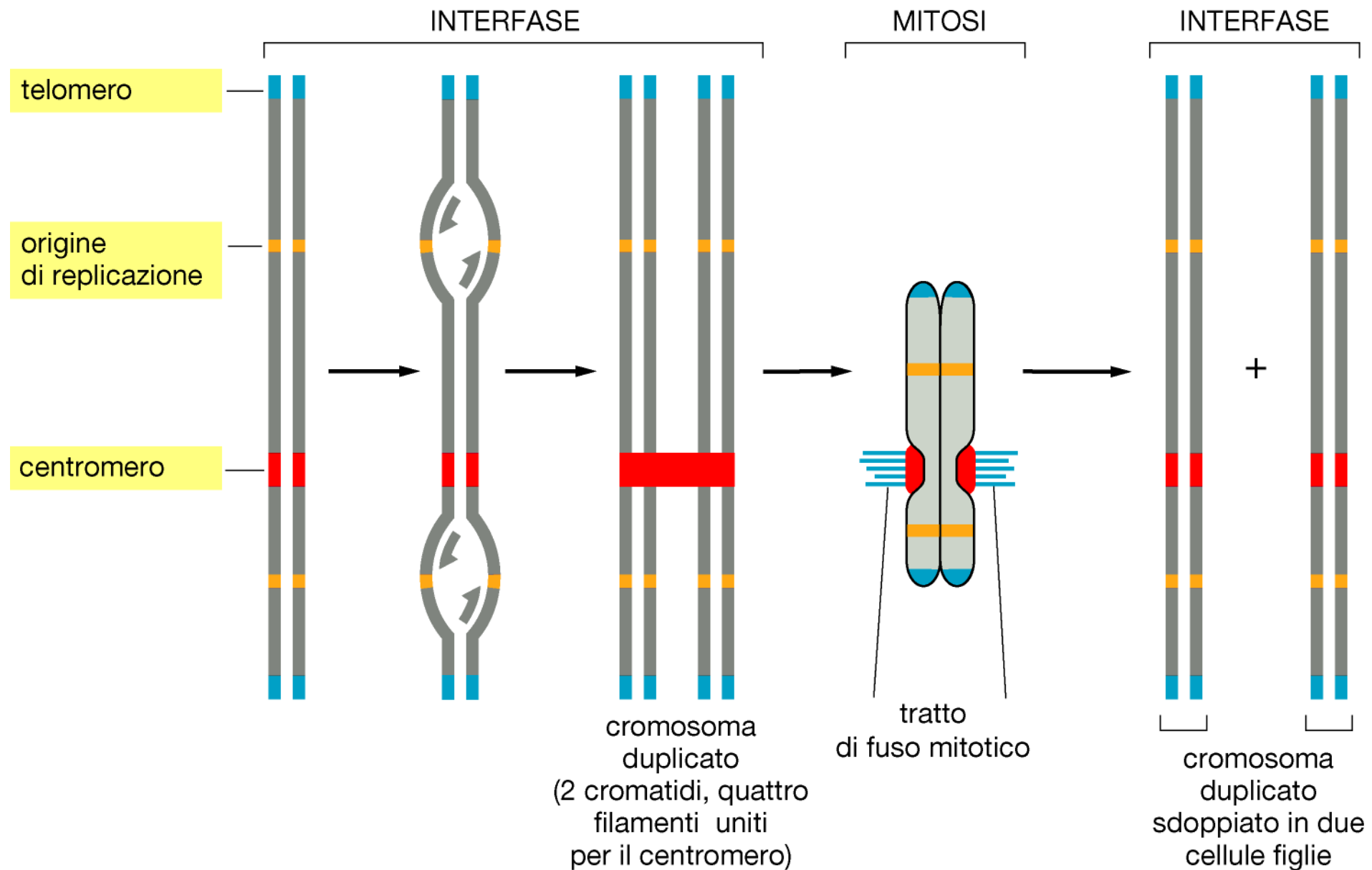


(B) PROCARIOTI

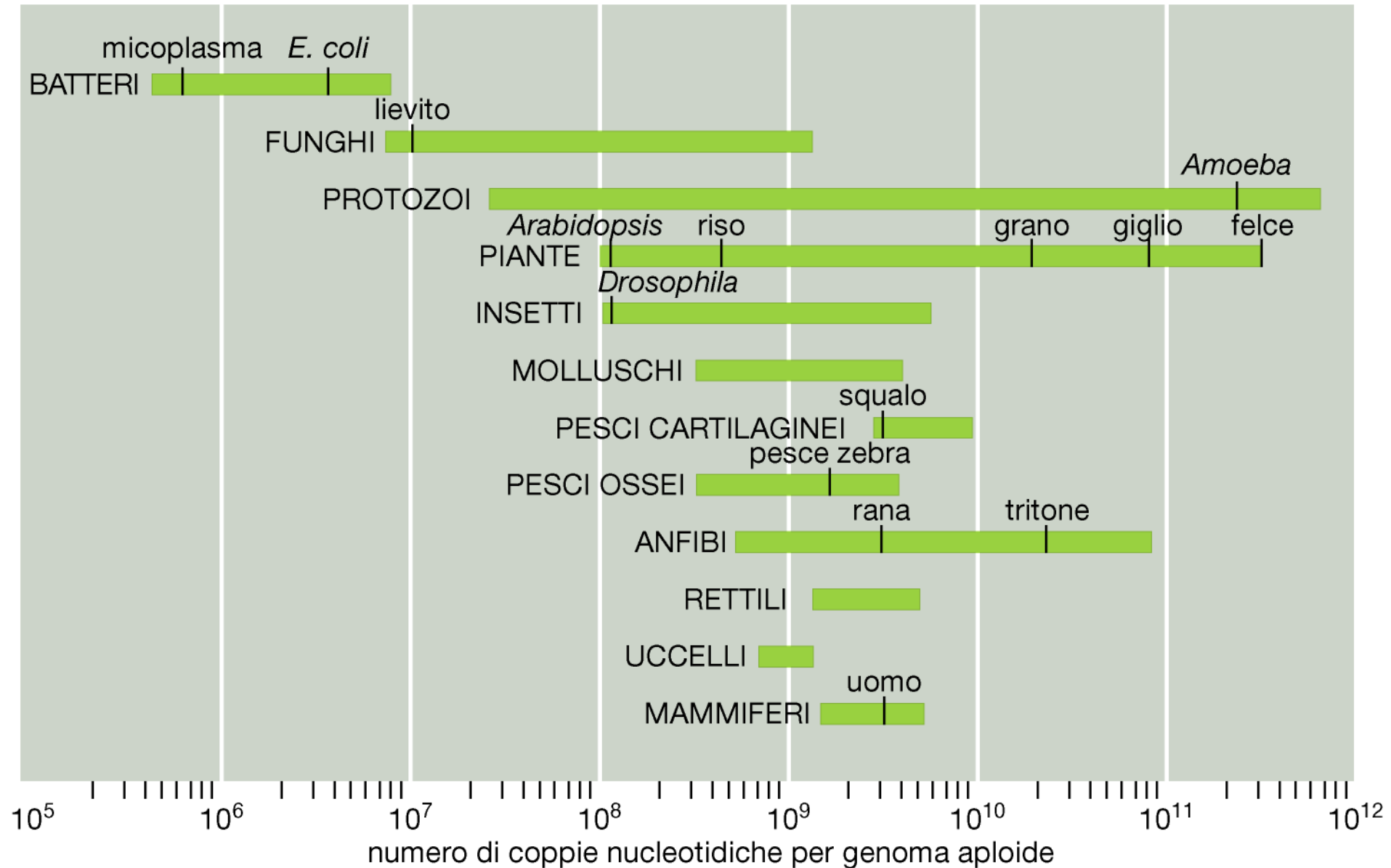




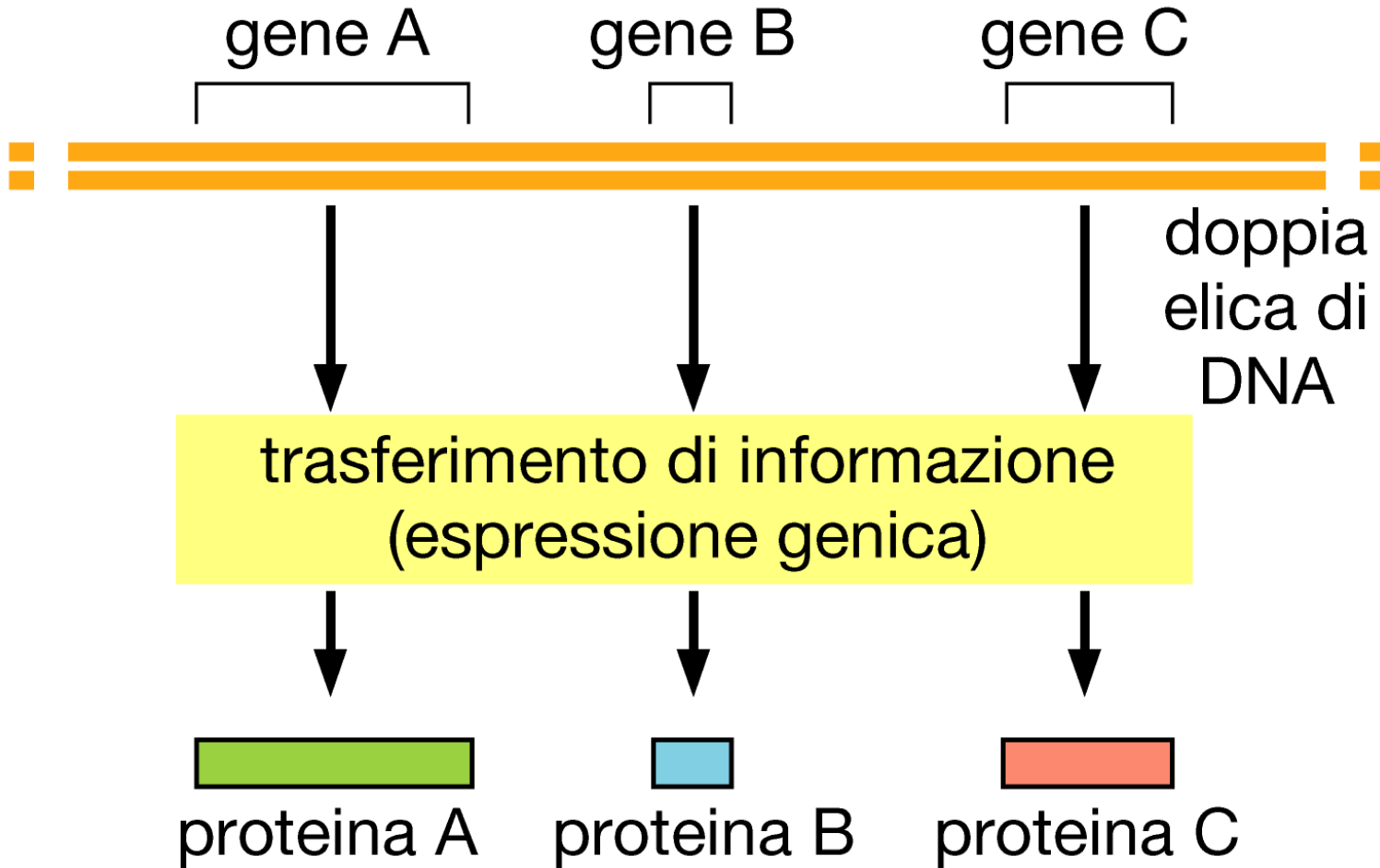
I tre elementi della sequenza di DNA necessari a produrre un cromosoma eucariotico stabile



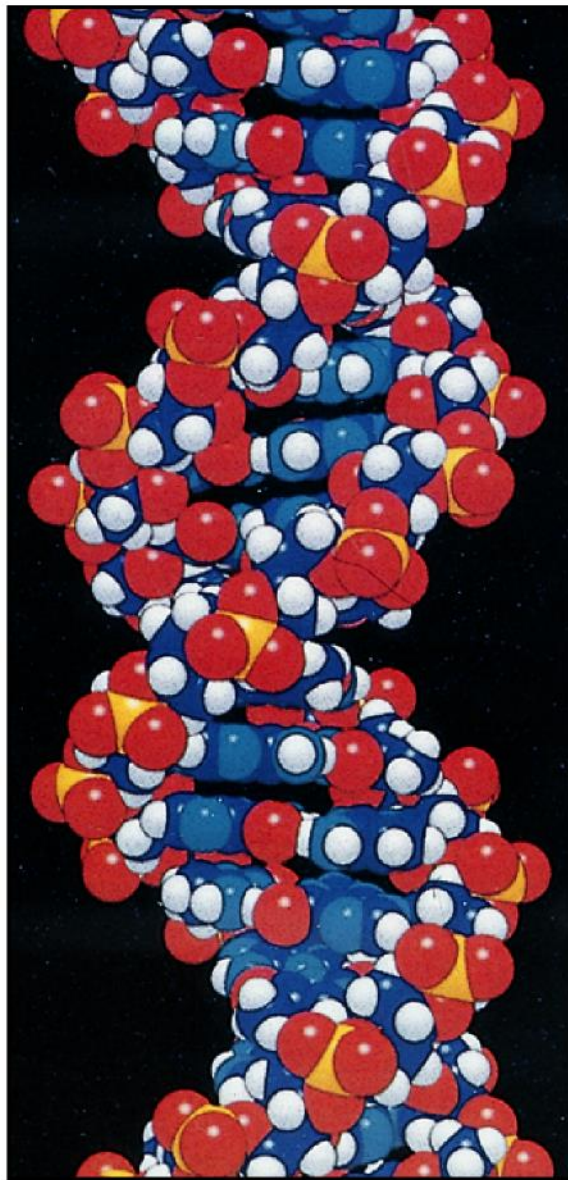
Quantità di DNA presente in un genoma aploide



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



```
CCCTGTGGAGCCACACCCTAGGGTTGGCCA
ATCTACTCCAGGAGCAGGGAGGCCAGGAG
CCAGGGCTGGGCATTAAGTCAGGGCAGAG
CCATCTATTCCTTACATTTGCTTCTGAGAC
AATCTGTTCACTAGCAACTCAACAGACA
CCATGGTGGACCTGACTCTCTGAGGAGAGT
CTCCCGTTACTGCCCTGTGGGCAGGTGA
ACCTGGATGAAGTTGGTGTGAGGCCCTGG
GCAGTTGGTATCAAGGTTACAGAGCAGGT
TTAAGGAGACCAATAGAAGCTGGGCATGTG
GAGACAGAGAAGACTCTTGGGTTCTGATA
GGCACTGACTCTCTGCCCTATGCTGTAT
TTTCCACCCITAGCTGCTGGTGGTCTAC
CCTTGGACCCGAGGTTCTTTGAGTCCCTT
GGGGATCTGTCACCTCTGATGCTGTATG
GGCAACCTTAGGTGAGGCTCATGGCAAG
AANGTCTCGTCCCTTAGTATGCCCTG
GCTCACCTGGACAACCTCAGGGCACCTTT
GCCACACTGAGTGGCTGCACTGTGCAAG
CTGCACGGATCTGAGACTTTCAGGCTG
AGTCTAAGGACCCTTGATGTTTCTTCC
CCCTTCTTCTATGGTTAAGTTCATGTCTAT
AGAAAGGGAGAGAGTAAACAGGCTACAGTT
AGAATGGGAACAGAGCAATGATTGCATCA
GTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTAGTTTC
TTTTATTTGCTGTGATAACAAATGTTTTC
TTTTGTTAATCTTCTCTCTTTTTTTTT
CTTCTCCGCAATTTTACTTATTACTTAA
TGCCTTAAGACTGTGTATACAAAAGGAAA
TATCTGTAGATACATTAAGTAACTTAA
AAMAATTTACACAGCTCGCCACTACAT
ACTATTTGGAATATATGTGCTTATTTGC
ATATTCAATCTCCCTACTTTATTTCTT
TTATTTTAAATGATAGATAATCAATTAAC
ATATTTATGGGTTAAGGTAAATGTTTAA
TATGTACACATAATGACCAATCAGGGT
AATTTGCAATTTGTAATTTAABAAATGCT
TCTCTTTAATTAATCTTTTGTGTACTC
TATTTCTAATCTTTCCCTAATCTCTTTC
TTTCCAGGCAATTAATGATATGATCAT
GCCTCTTTGCACCATTCTAAGAAATACAG
TGATAAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAAT
AHTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATA
ATTGTAACGTGATTAAGAGGTTTCAATATG
CTAATAGCAGCTACAAATCCAGTACCAATC
TGCCTTATTTATGGTGGGATAAGGCTG
GATTATCTGAGTCCAGCTAGGCCCTTTT
GCTAATCATGTTGATAGCTCTTATCTTCC
CCCACAGCTCTTGGCAAGGTTCTCTCTG
TGTCTGGCCATCATTTTGGCAAGAAAT
CACCCUACCACTGCAGGCTGCTATCAGNA
AGTGTGGCTGGTGGCTTATGCCCTGCG
CCACAGTATCACTAAGCTGCTCTTCTG
TGTCCAATTTCTAATAAGGTTCTCTTGT
CCCTAAGTCCACTACTAANCTGGGGATA
TTATCAAGGCCCTGACGACTGGATCTG
CCAAATAAAGACTTTATTTCTAATGONA
TGATGATTTAATATTTCTGATATTTTT
ACTAAAAGGGAATGTGGGAGTCAAGTCA
TTTAAAACATAAAGAAATGATGAGCTGTC
AAACCTTGGGAAAATACACTATATCTTAAA
CTCCATGAAAGAAAGTGGGCTGCACCCAG
CTAATGCACATTTGGCAACAGCCCTGATGC
CTATGCCCTTATTCATCCCTCAGAAAAGGAT
```



0,34 nm

solco
secondario

solco
principale

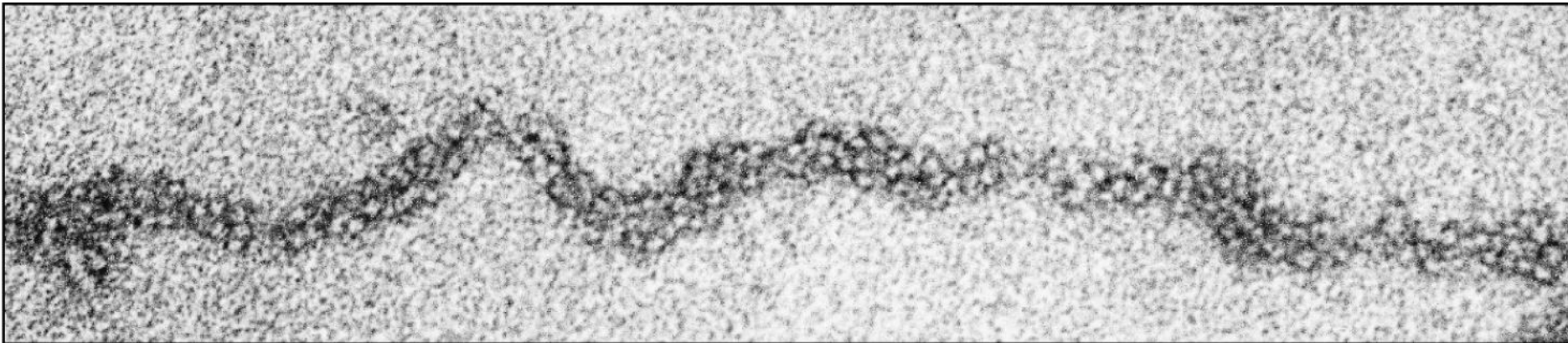
2 nm

I cromosomi contengono
proteine legate a specifiche
sequenze del DNA

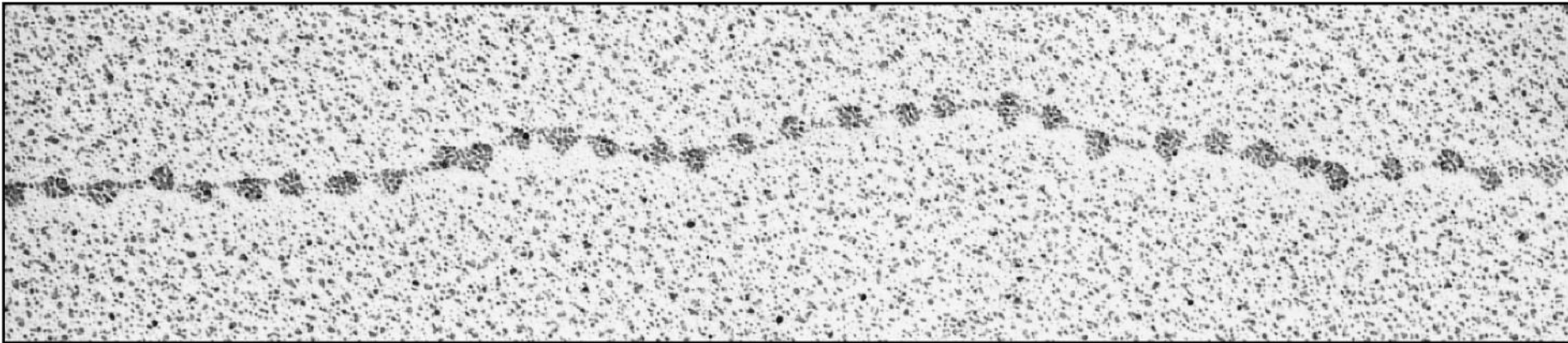
La geometria dell'elica di
DNA dipende dalla sequenza
nucleotidica (la struttura più
stabile è la **forma B**,
elicoidale destrorsa; la **forma
A** è un'altra elica destrorsa; la
forma Z è una doppia elica
sinistrorsa

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**

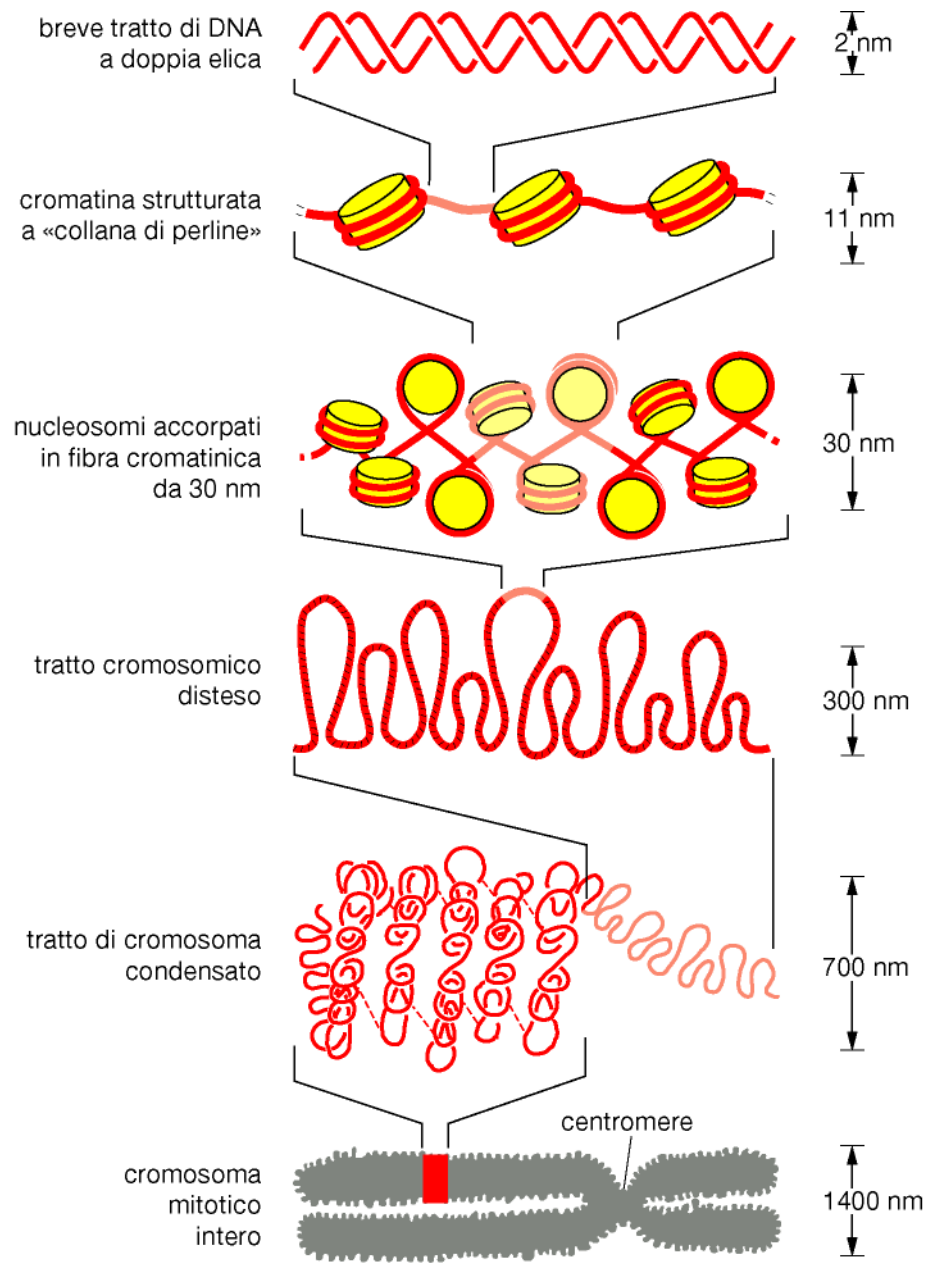
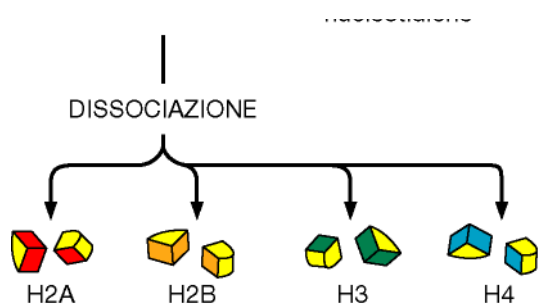
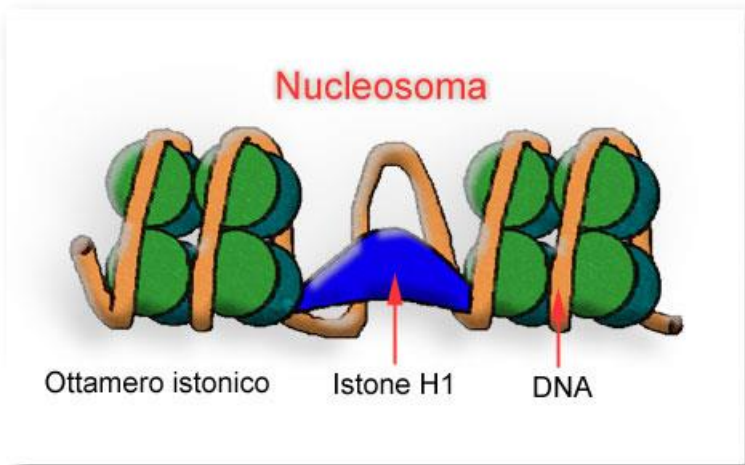
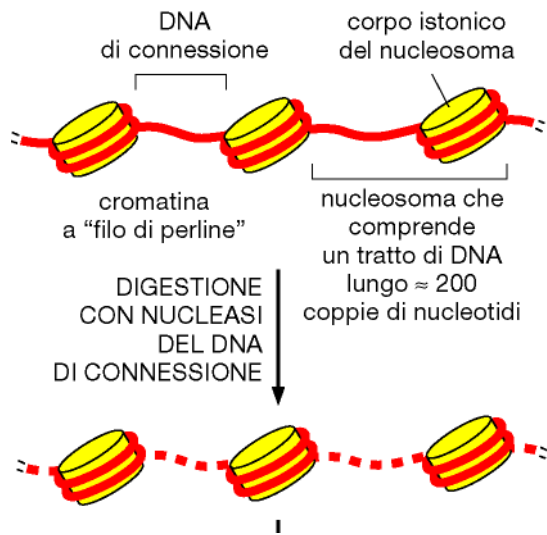


(A)

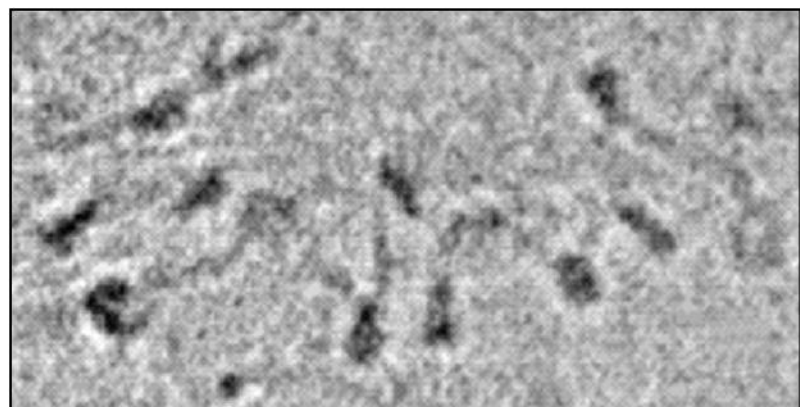


50 nm

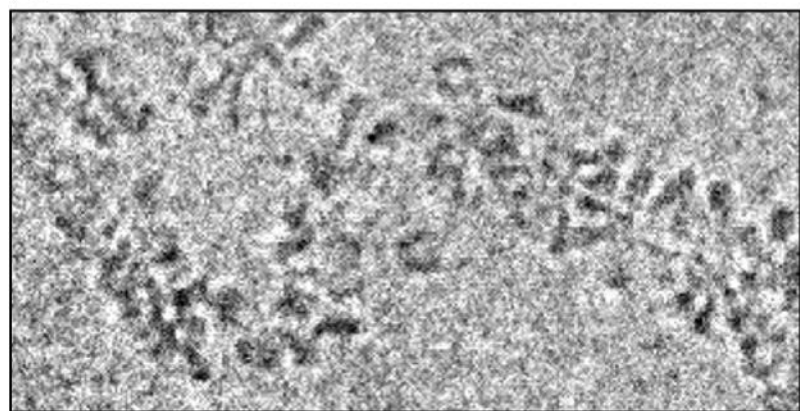
(B)



RISULTATO NETTO: OGNI MOLECOLA DI DNA RISULTA STIPATA IN UN CROMOSOMA MITOTICO 10000 VOLTE PIÙ CORTO DI QUANDO È DISTESO

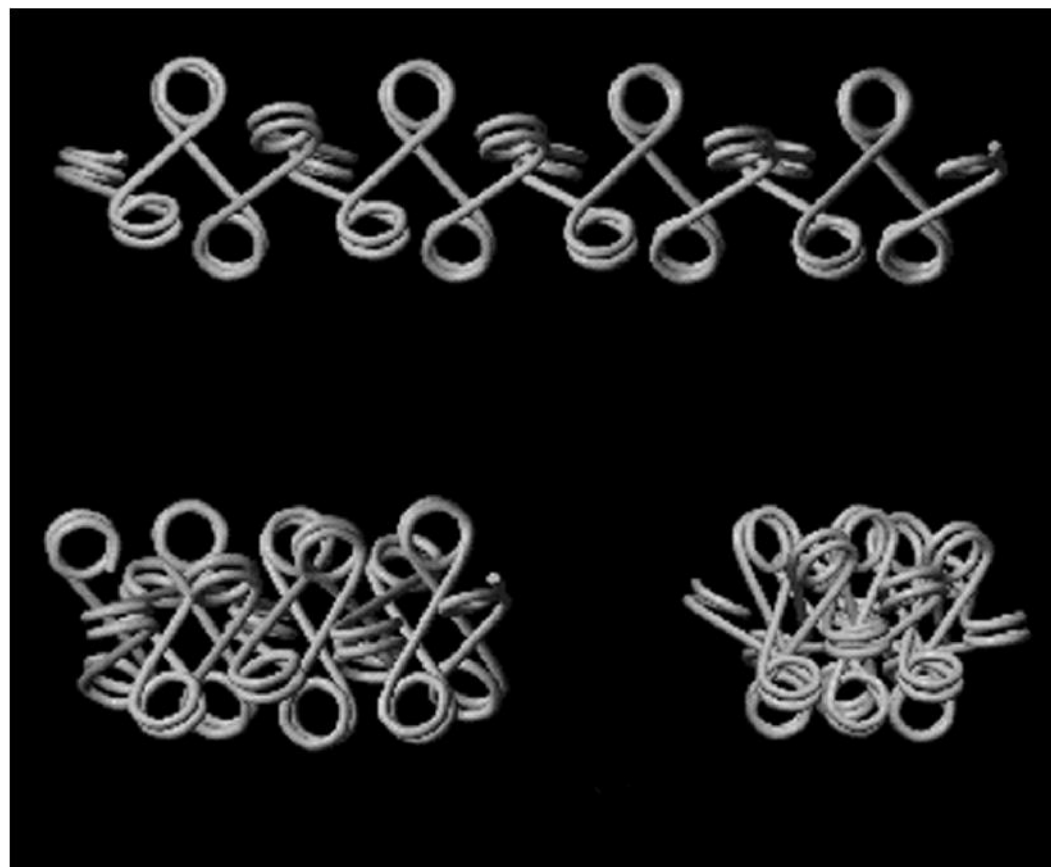


(A)

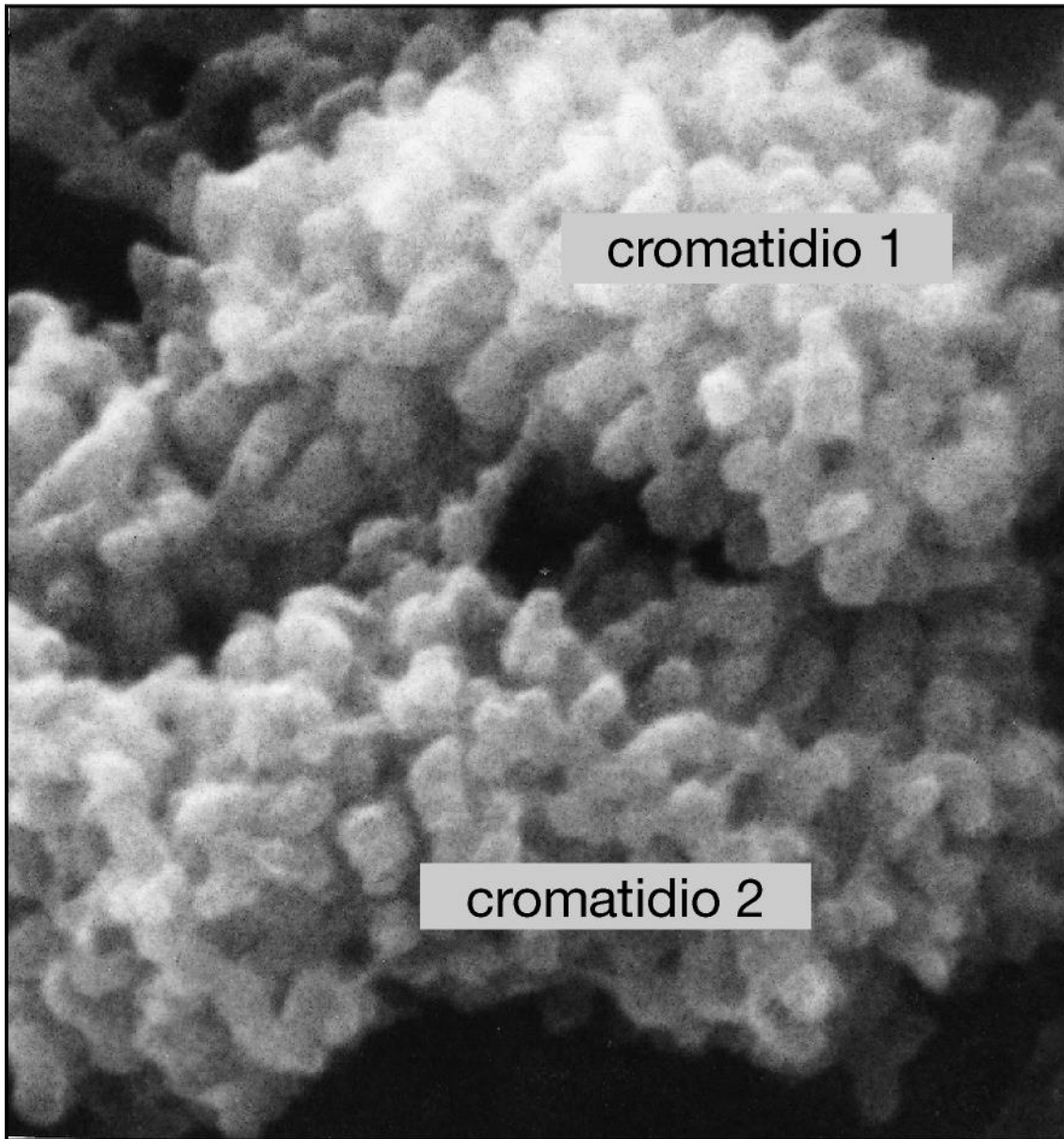


(B)

50 nm




(C)



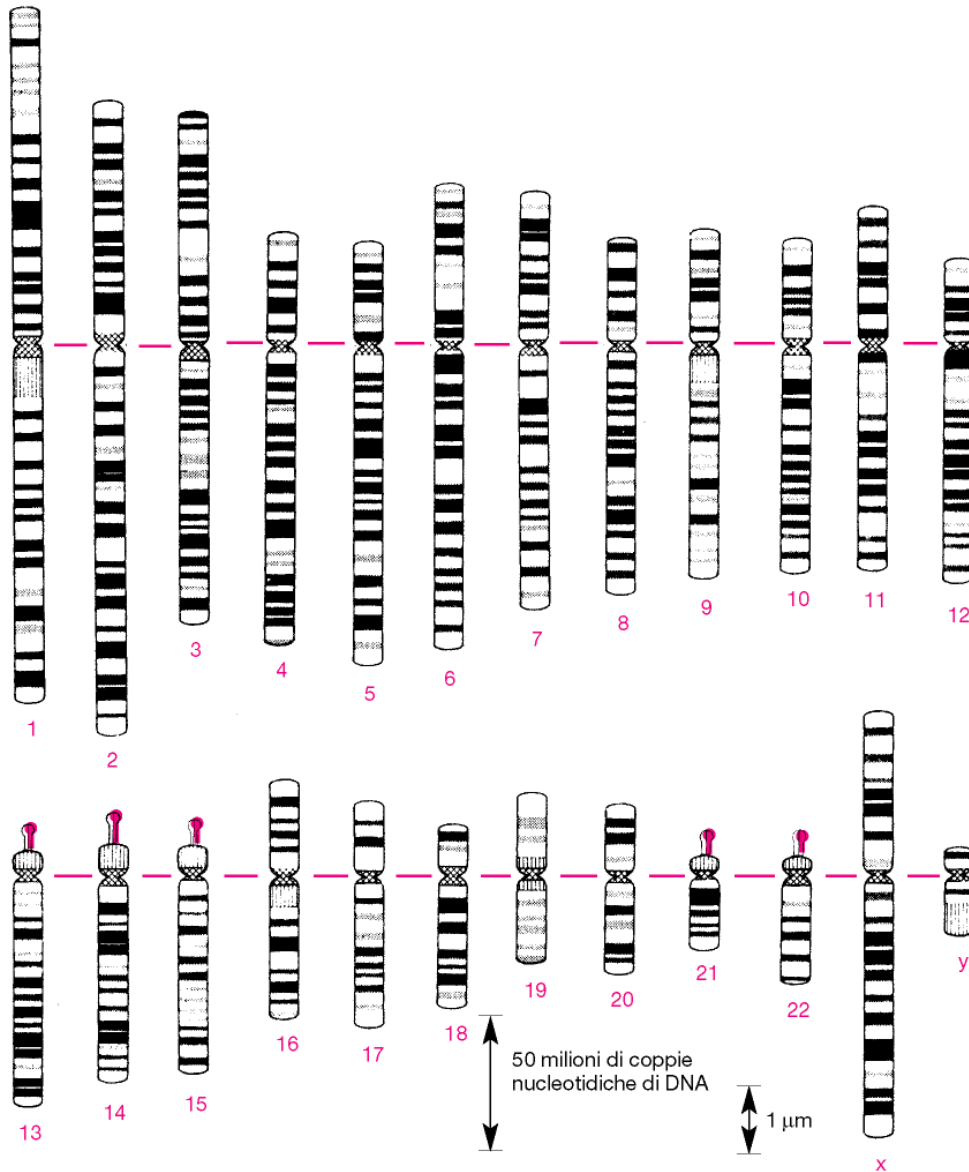
cromatidio 1

cromatidio 2


0,1 μm

Rappresentazione schematica di cariotipo umano

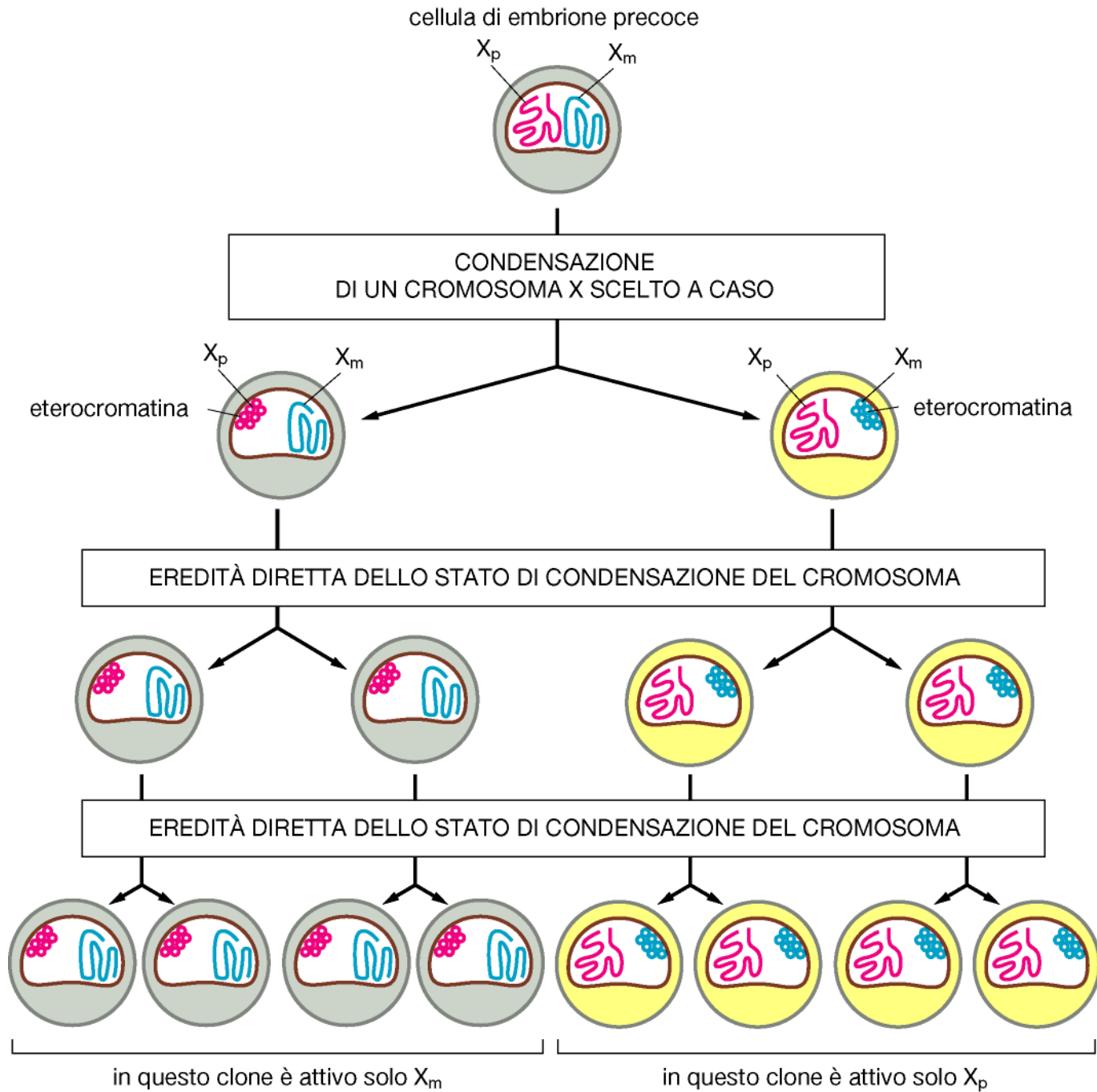
Bande G, qui scure, ricche in **A-T**; **bande R**, qui bianche, ricche in **G-C**



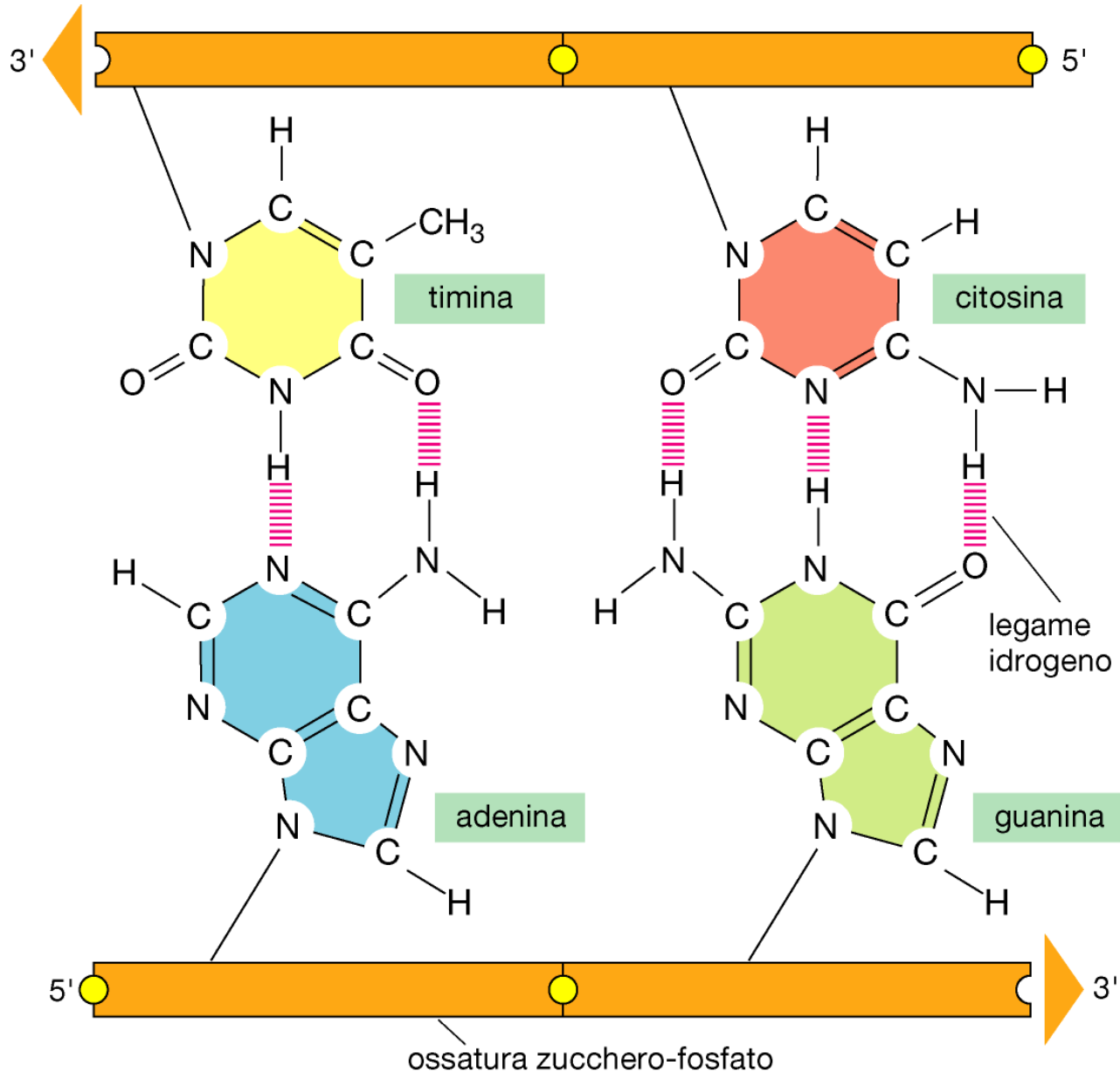
I geni sono contenuti sia nelle bande G che nelle bande R

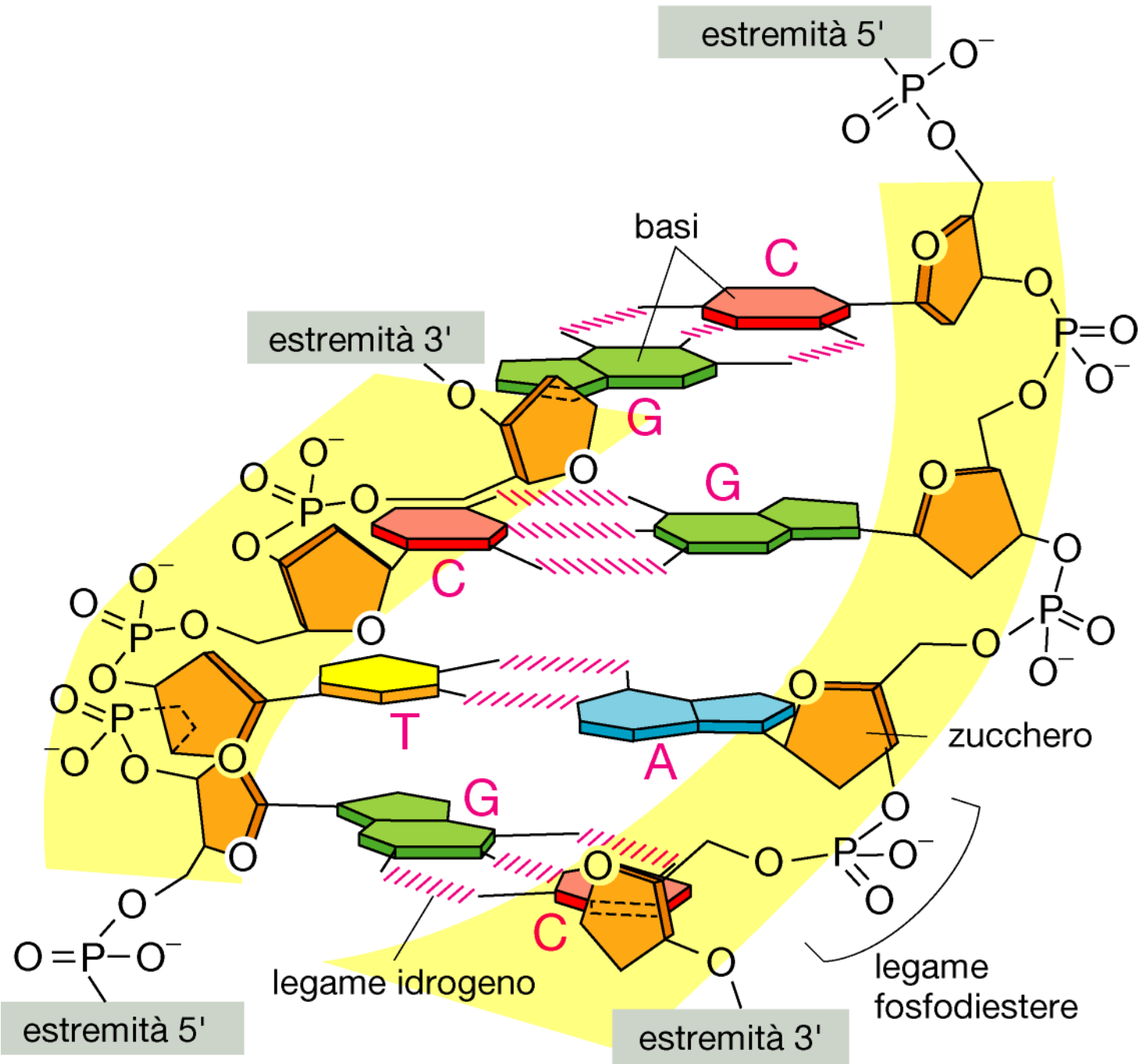
La cromatina si addensa meno nelle regioni interessate alla trascrizione

La cromatina è costituita da **EUCROMATINA**, non particolarmente addensata, ed **ETEROCROMATINA**, molto addensata e inattiva dal punto di vista della trascrizione

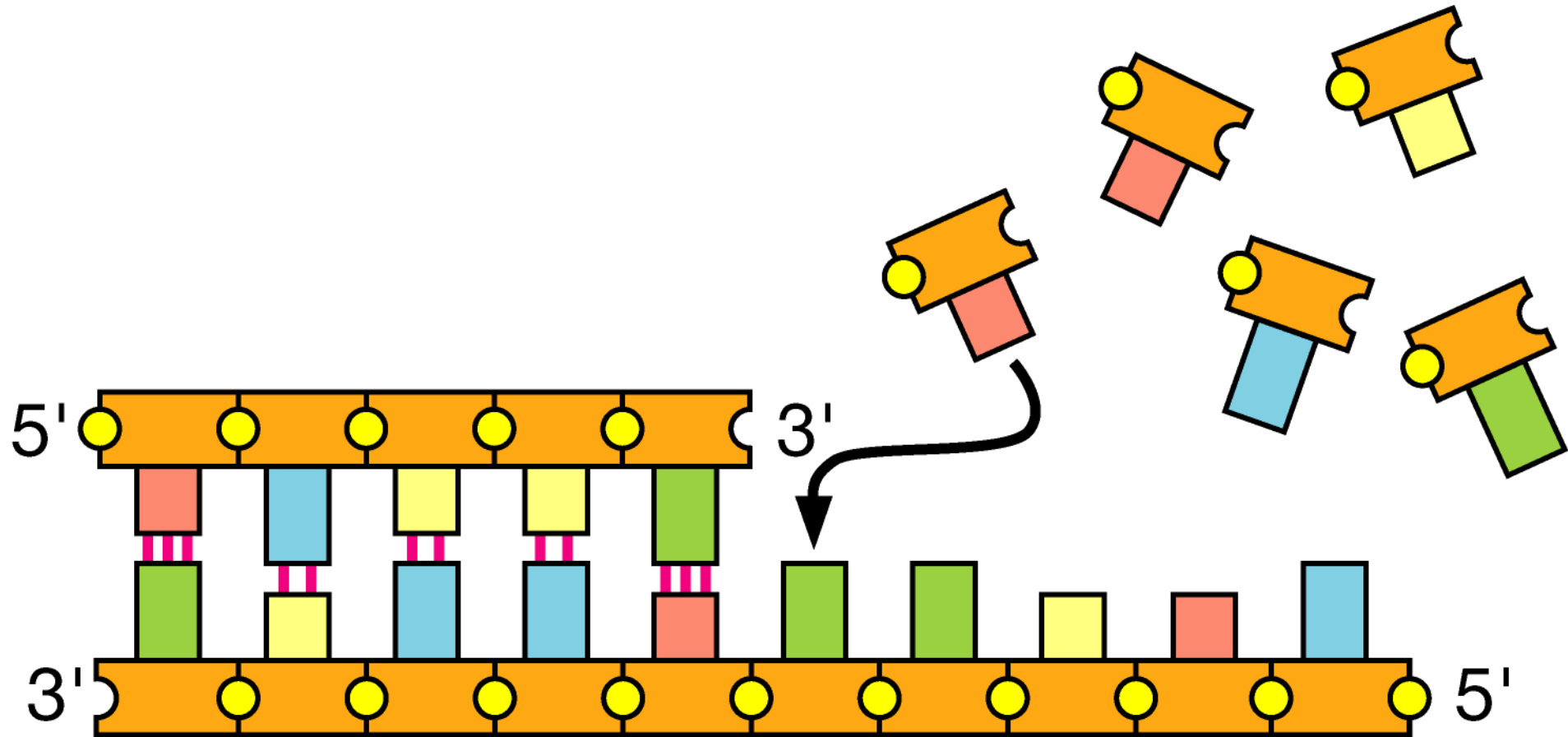


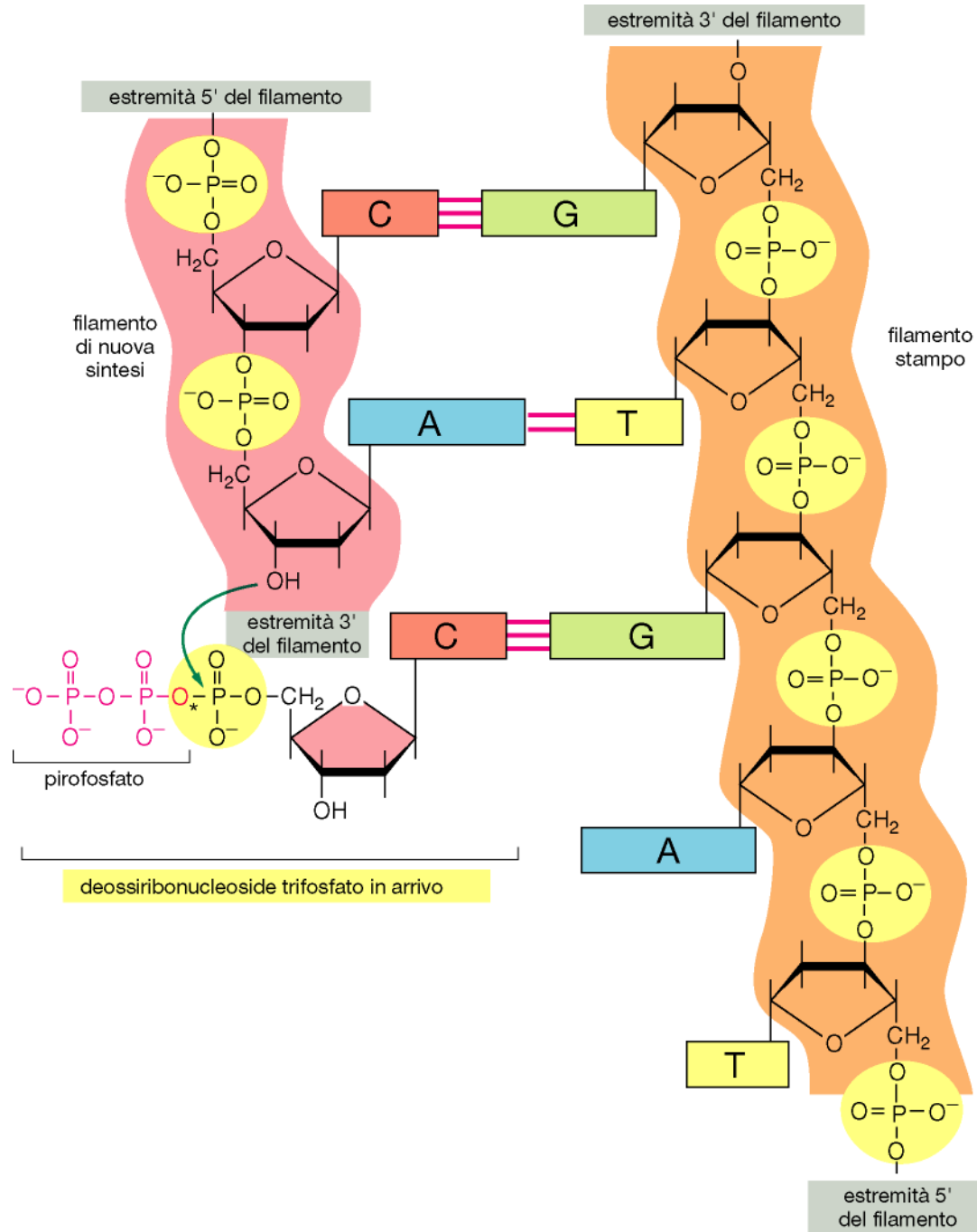
Replicazione del DNA



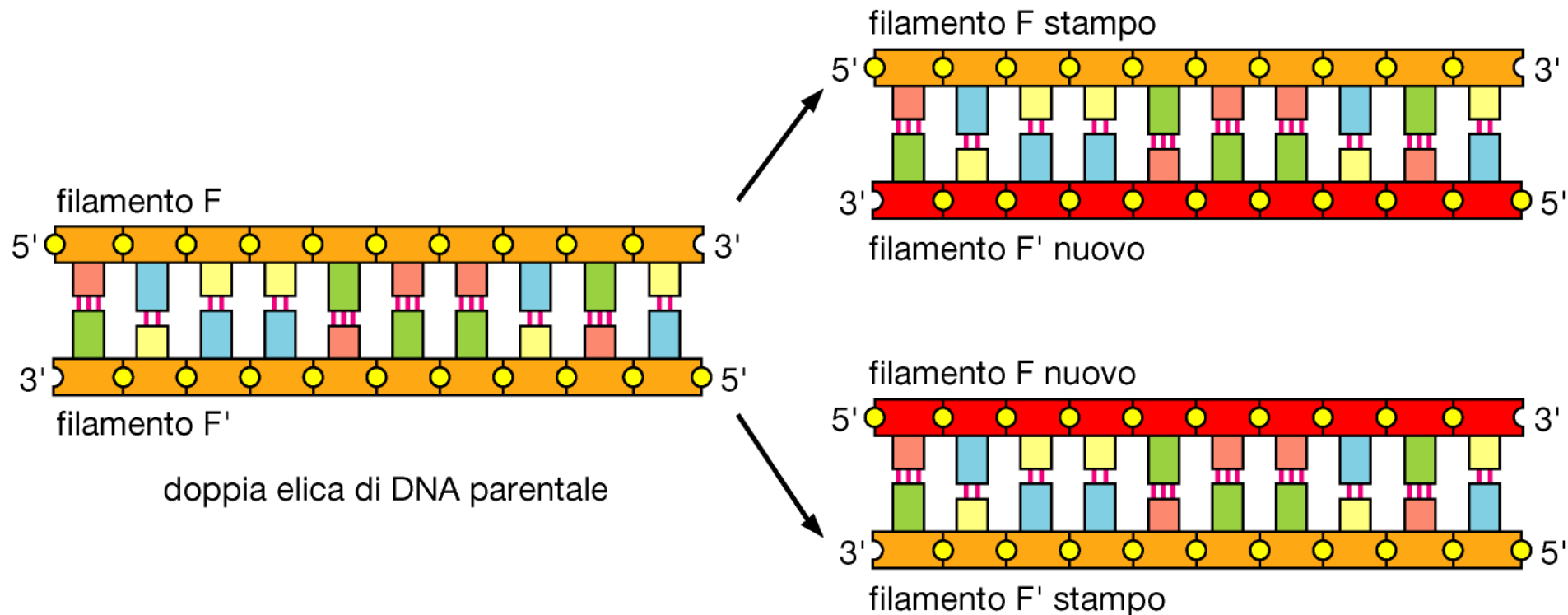


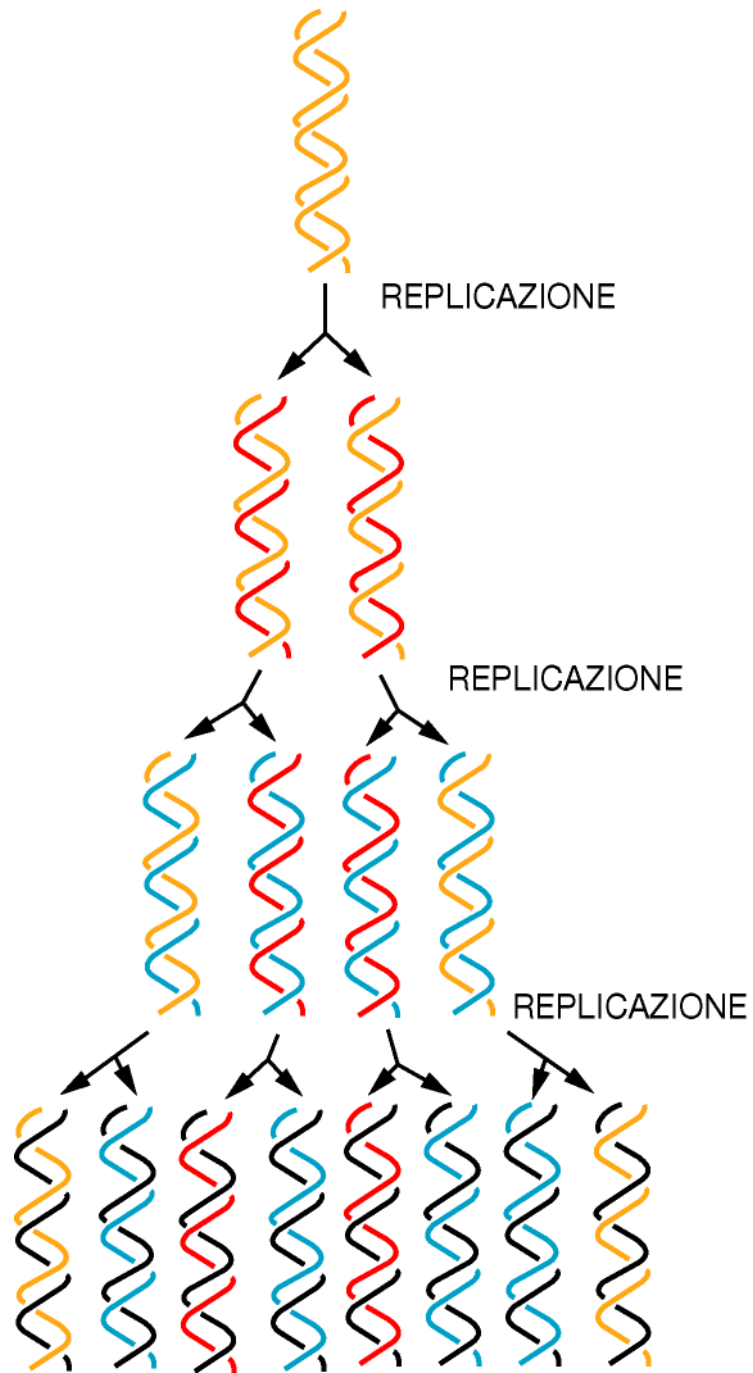
L'allungamento della catena avviene sempre in direzione
5' - 3'

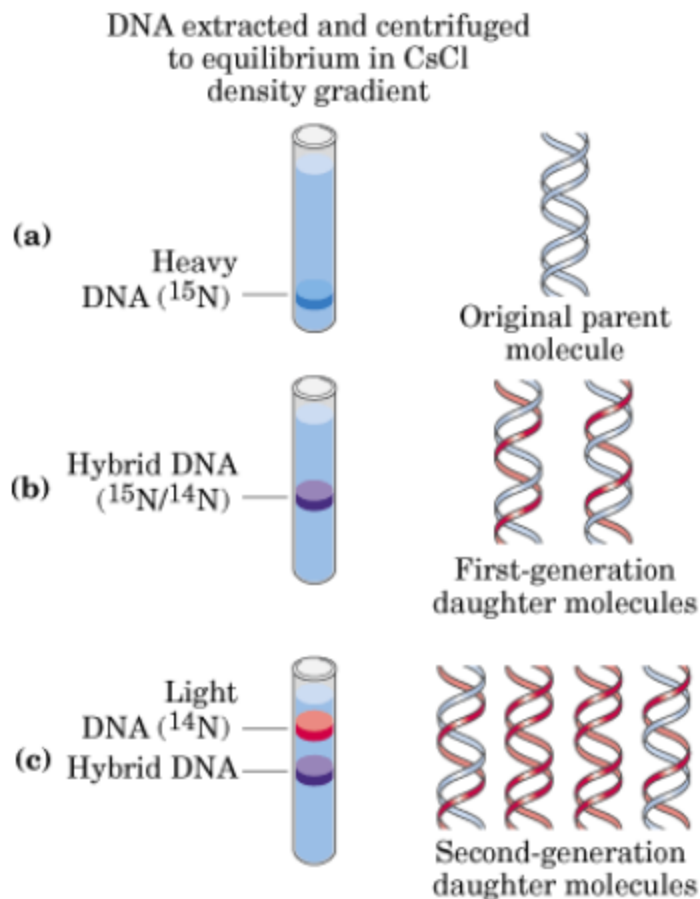




Il meccanismo di replicazione è **semiconservativo**, infatti ogni filamento funge da stampo per la formazione di un intero nuovo filamento. Ciascuna **cellula figlia** eredita una doppia elica contenente **un filamento vecchio e uno nuovo**.







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)

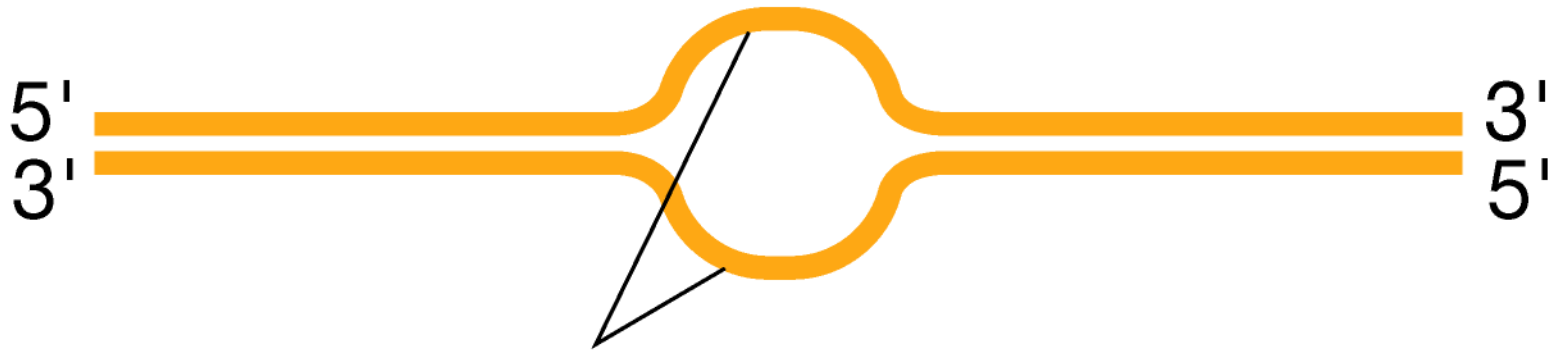
Questo esperimento conferma l'ipotesi della **replicazione semiconservativa**, in base alla quale durante la replicazione le nuove molecole di DNA sono formate da un filamento parentale ed uno neosintetizzato

origine
di replicazione

DNA
a doppia
elica

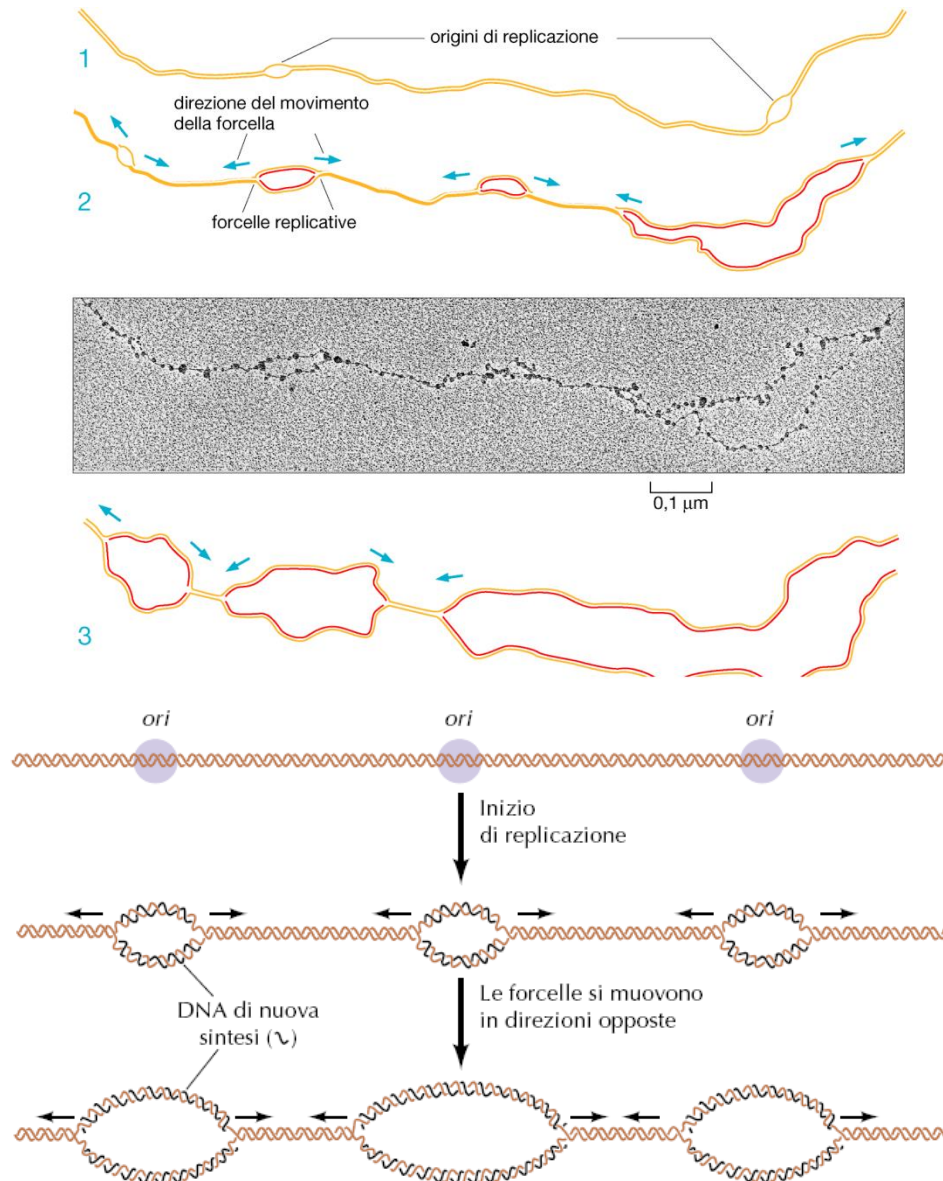


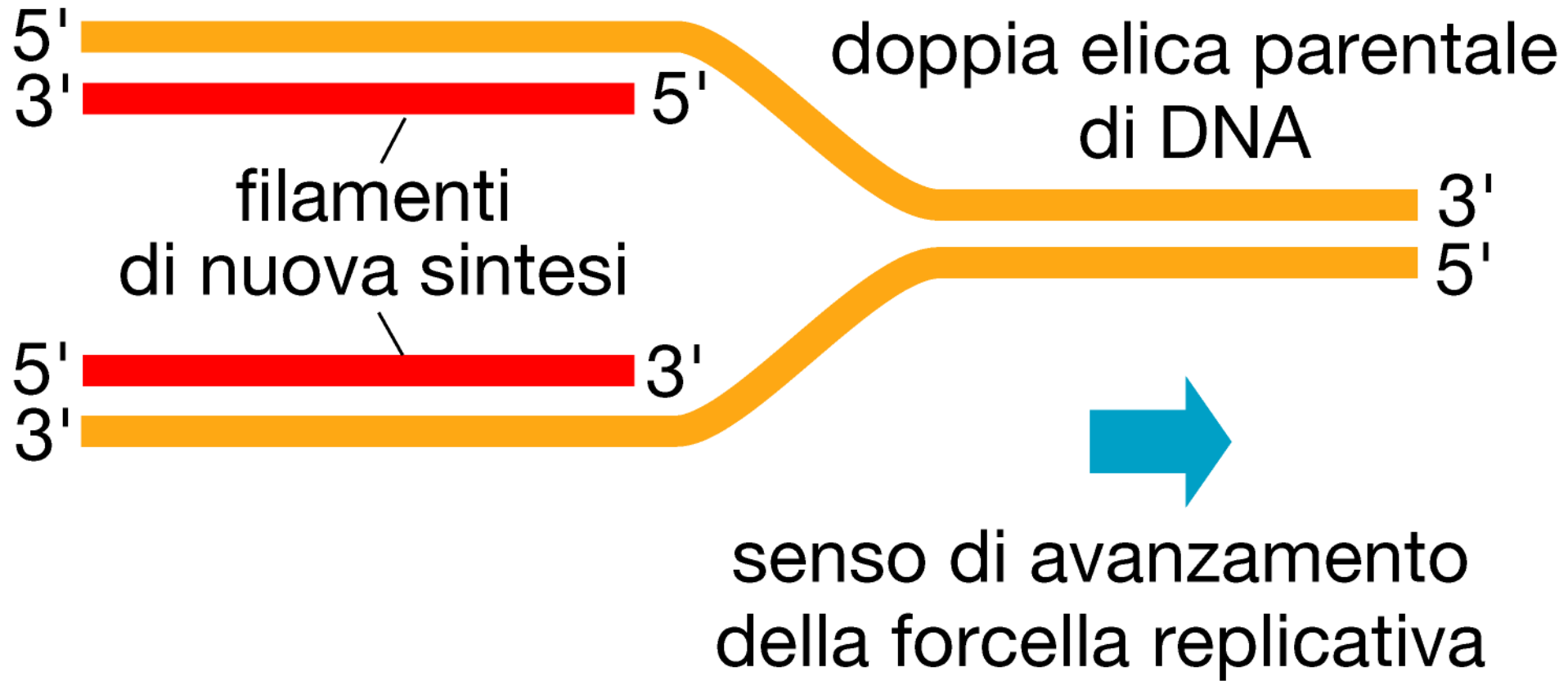
doppia elica aperta
con l'aiuto
di proteine iniziatrici



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

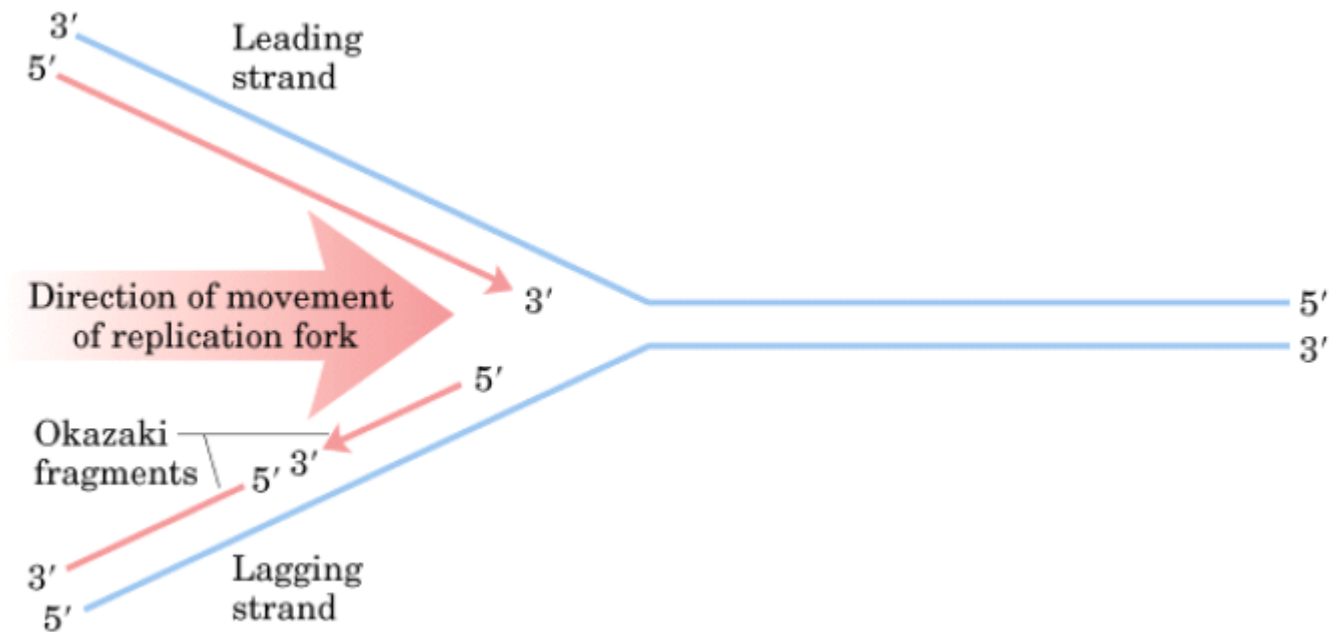
Si ritiene che una forcella replicativa si arresti solo quando si imbatte in un'altra in movimento in senso opposto oppure quando raggiunge l'estremità del cromosoma

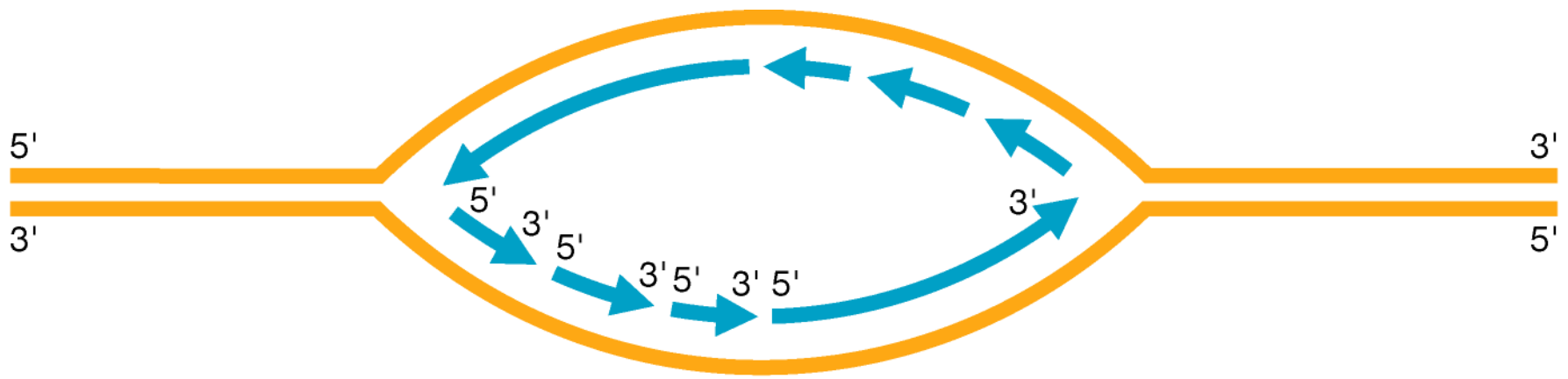




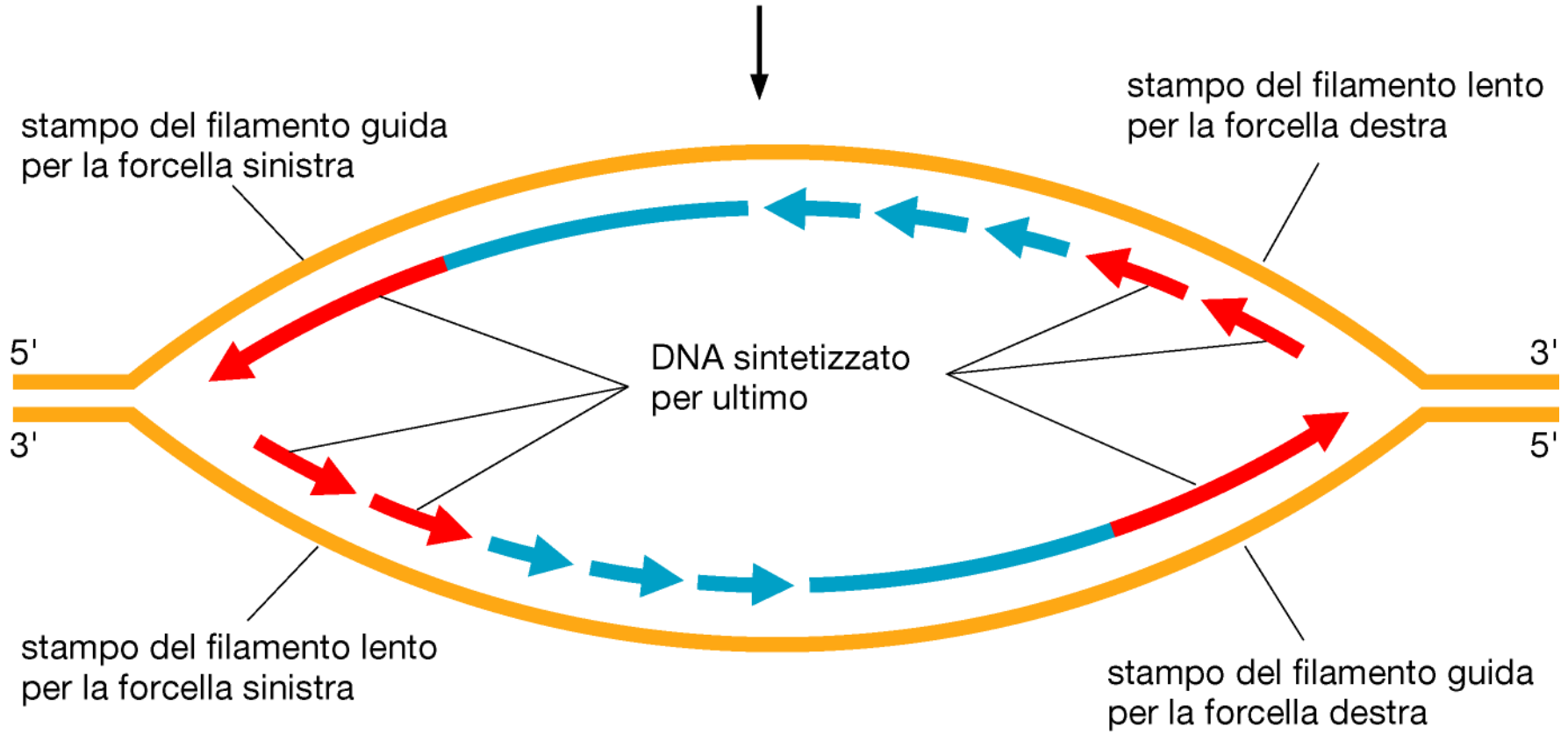
Sintetizzandosi entrambi i filamenti figli in direzione 5' – 3', il DNA sintetizzato sul filamento lento deve essere costruito inizialmente sotto forma di una serie di brevi molecole dette

FRAMMENTI DI OKAZAKI

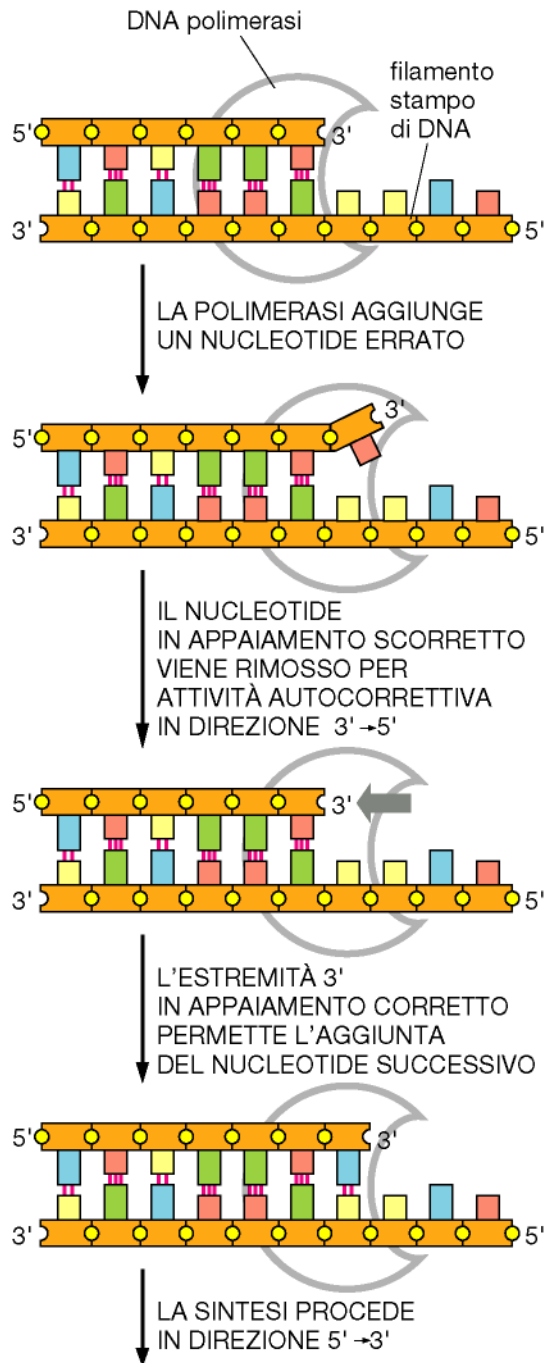




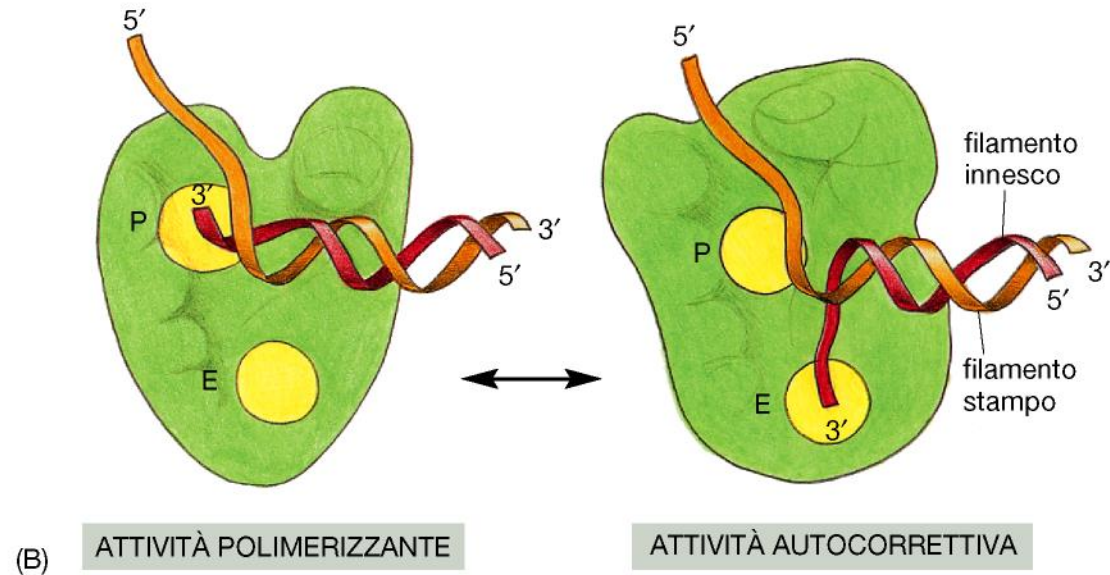
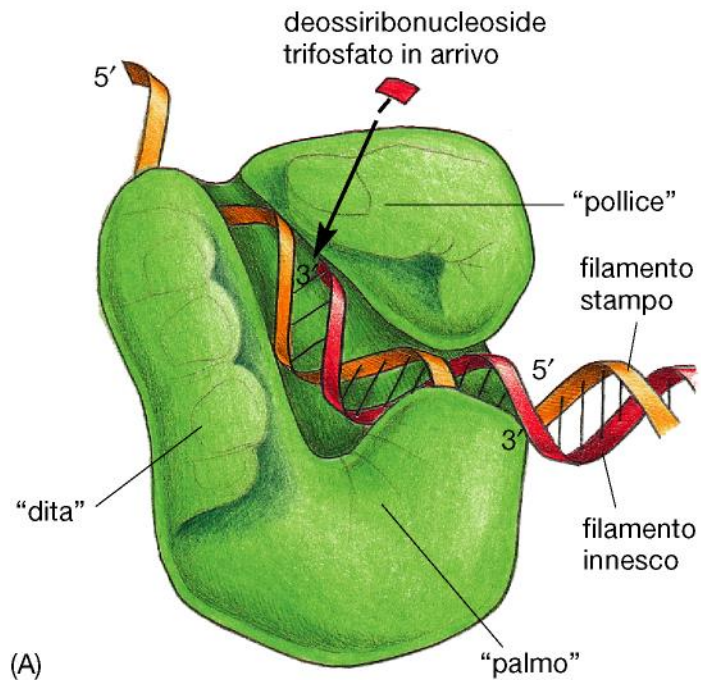
← direzione di spostamento della forcella replicativa →

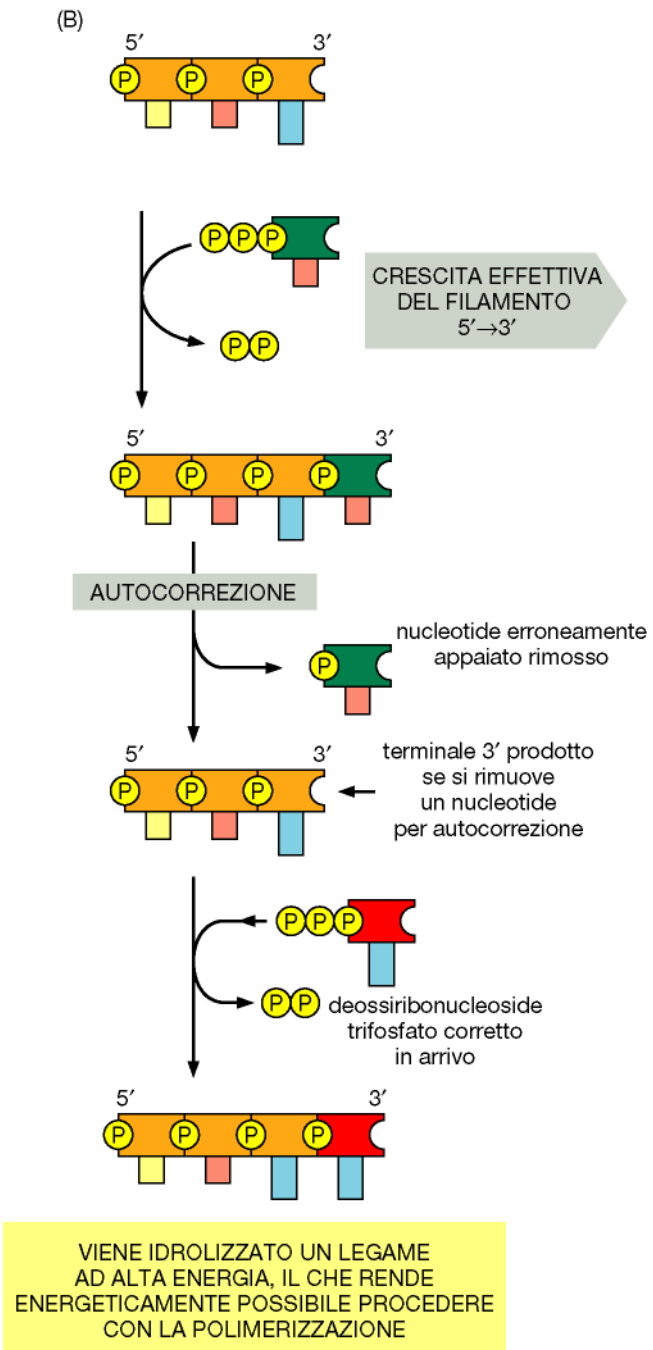
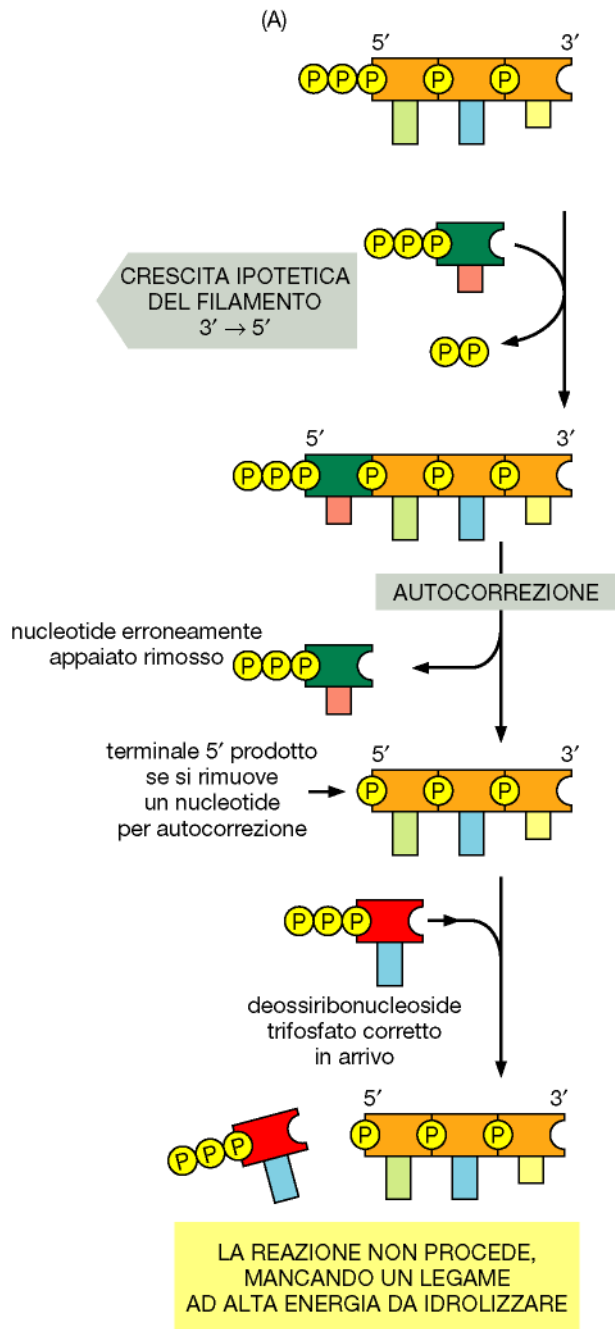


Per essere altamente fedele, la duplicazione del DNA esige un meccanismo di **“CORREZIONE DELLE BOZZE”**



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**)





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

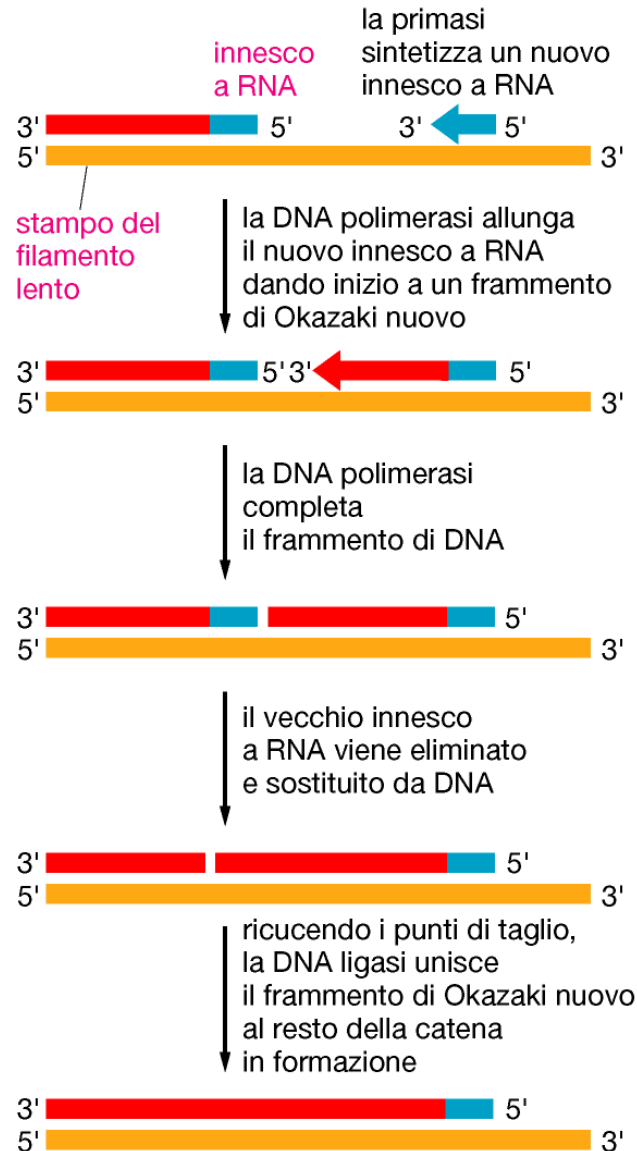
DNA polimerasi: nel **batterio** la **III** si occupa dell'allungamento, la **I** di riempire delle lacune e rimuovere gli inneschi; negli **eucarioti** la **α** ha attività primasica e polimerasica; la **δ** estende i primer, è probabilmente responsabile dell'allungamento sia del filamento lento che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

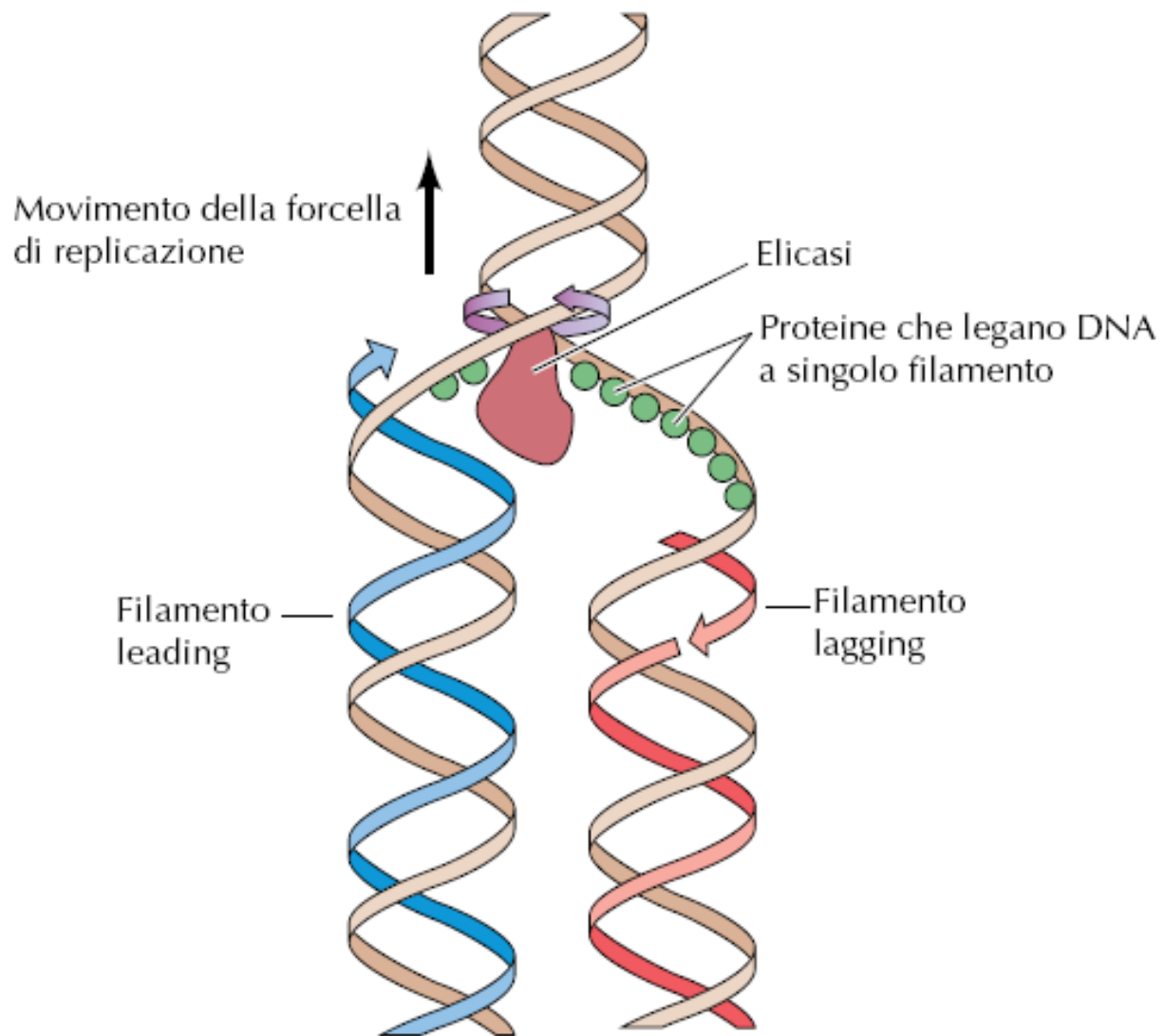
Ligasi: sutura del DNA

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

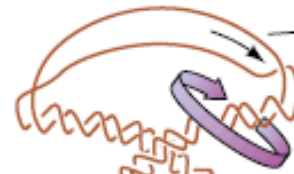
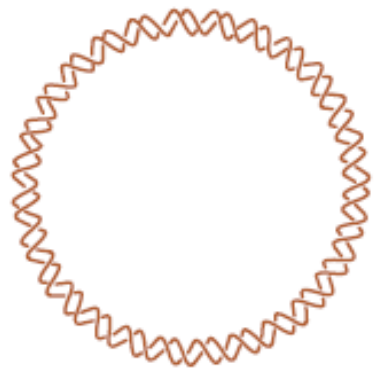
PRIMOSOMA

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





(A)

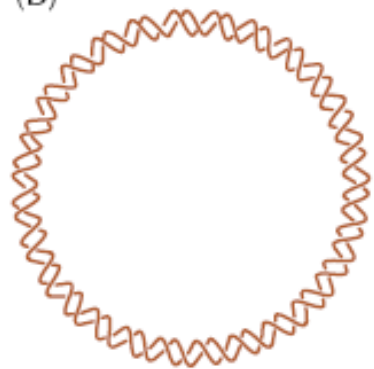


Svolgimento del DNA parentale

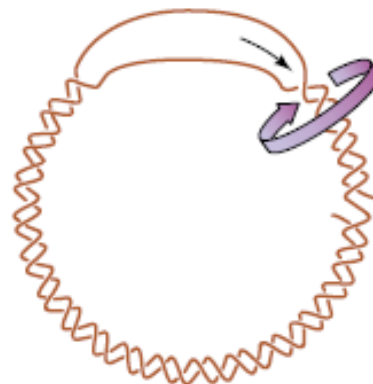


Attorcigliamento dei filamenti di DNA davanti alla forcella di replicazione

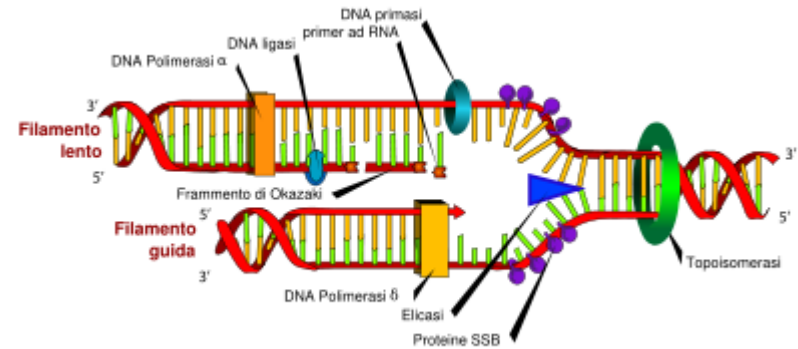
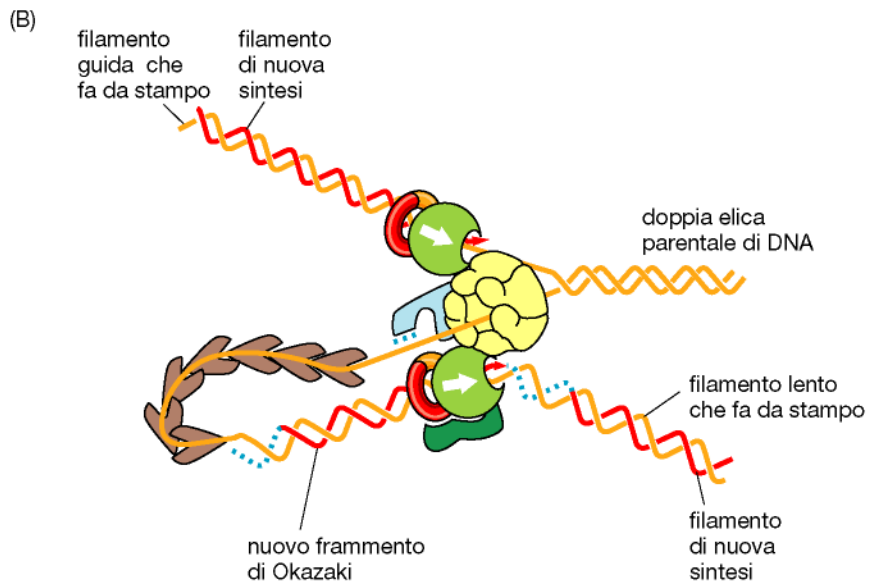
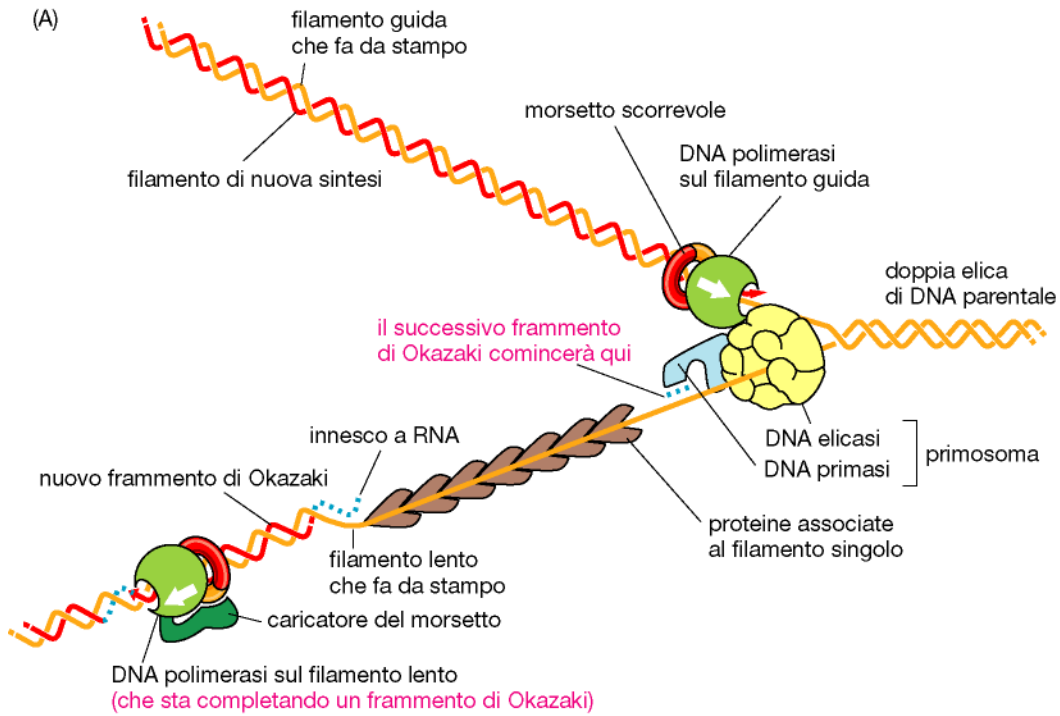
(B)

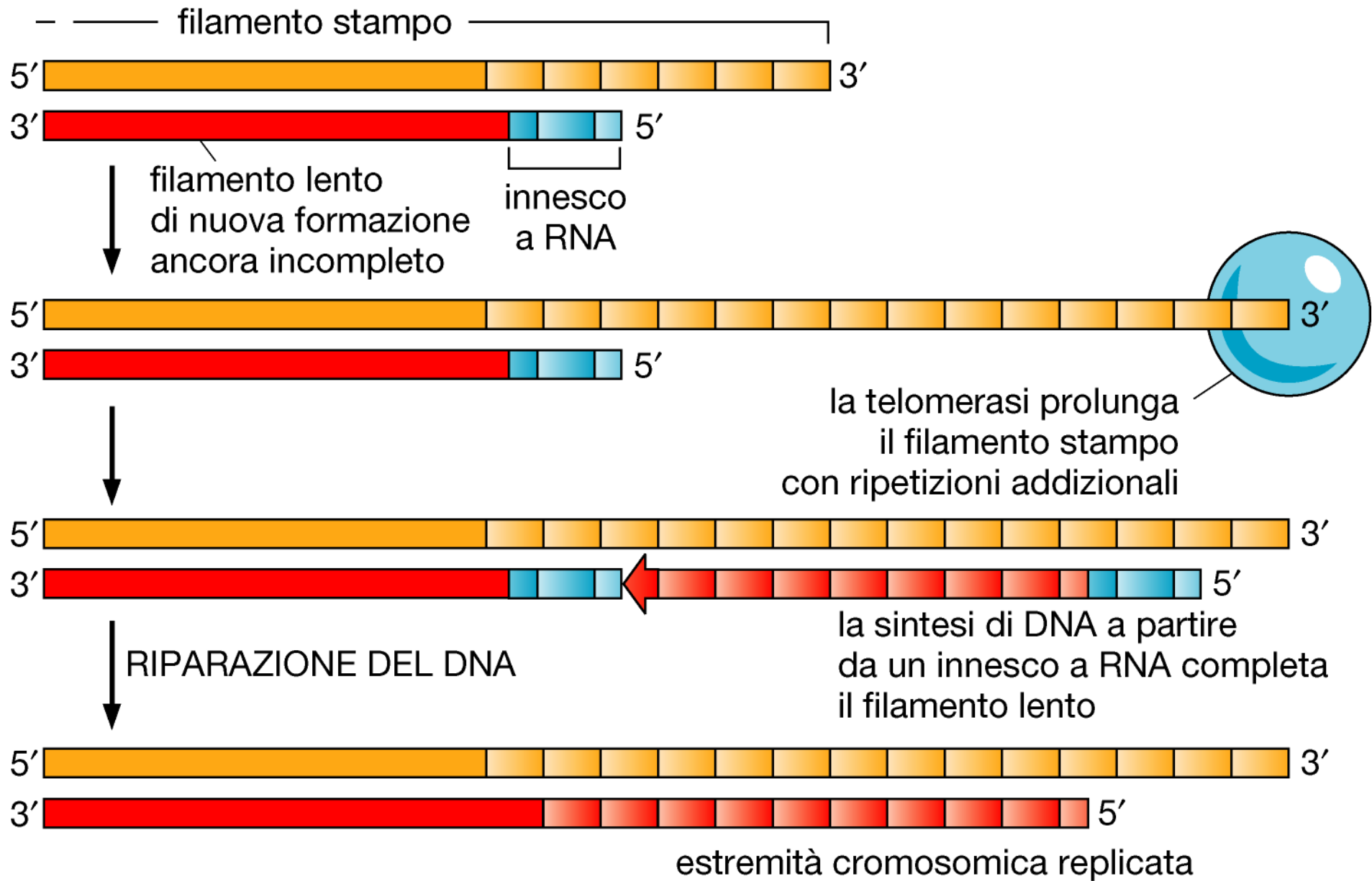


Topoisomerasi

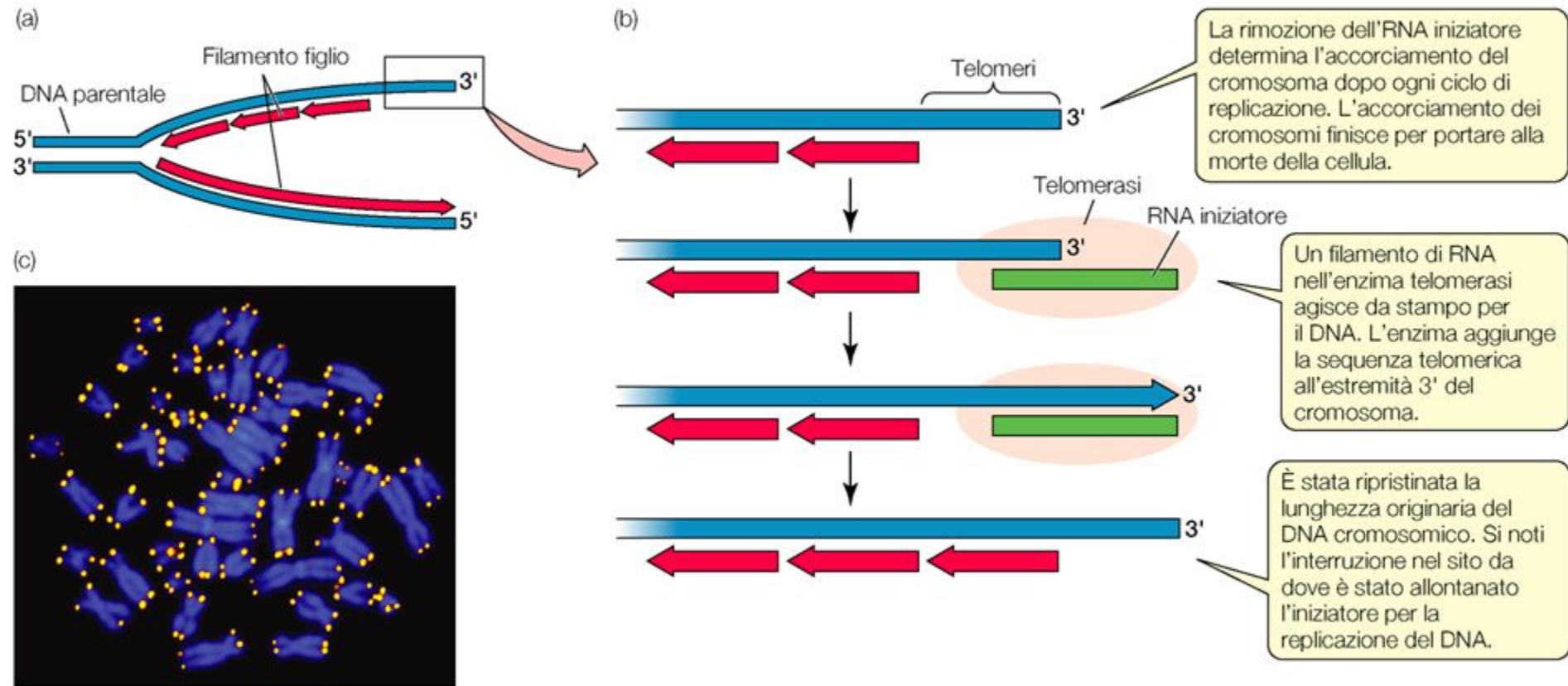


Il taglio transiente serve da perno per permettere la libera rotazione dei filamenti di DNA





Accorciamento dei telomeri e telomerasi



Telomeri nell'uomo: TTAGGG * 2500

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)

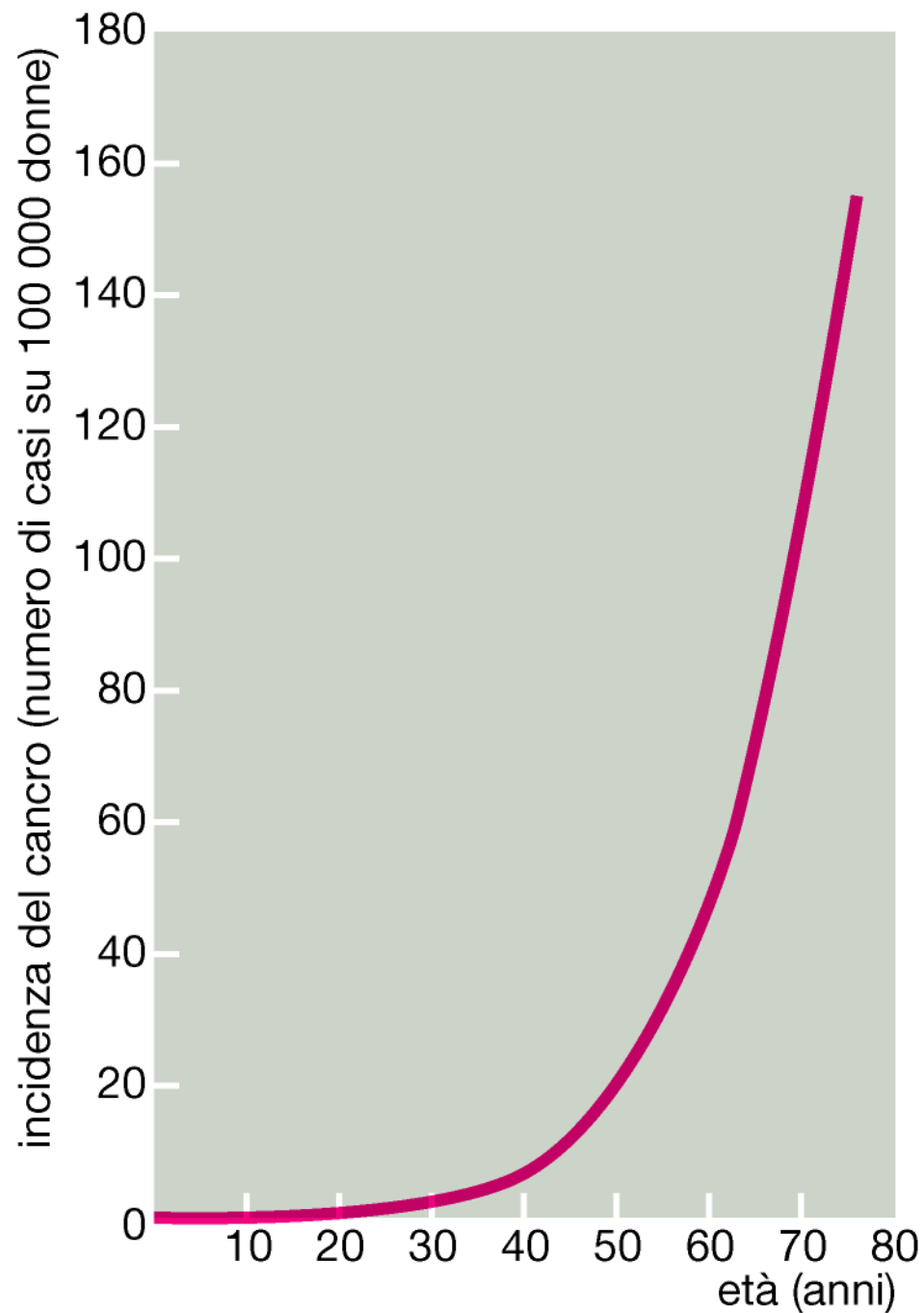
(A)



5 μ m

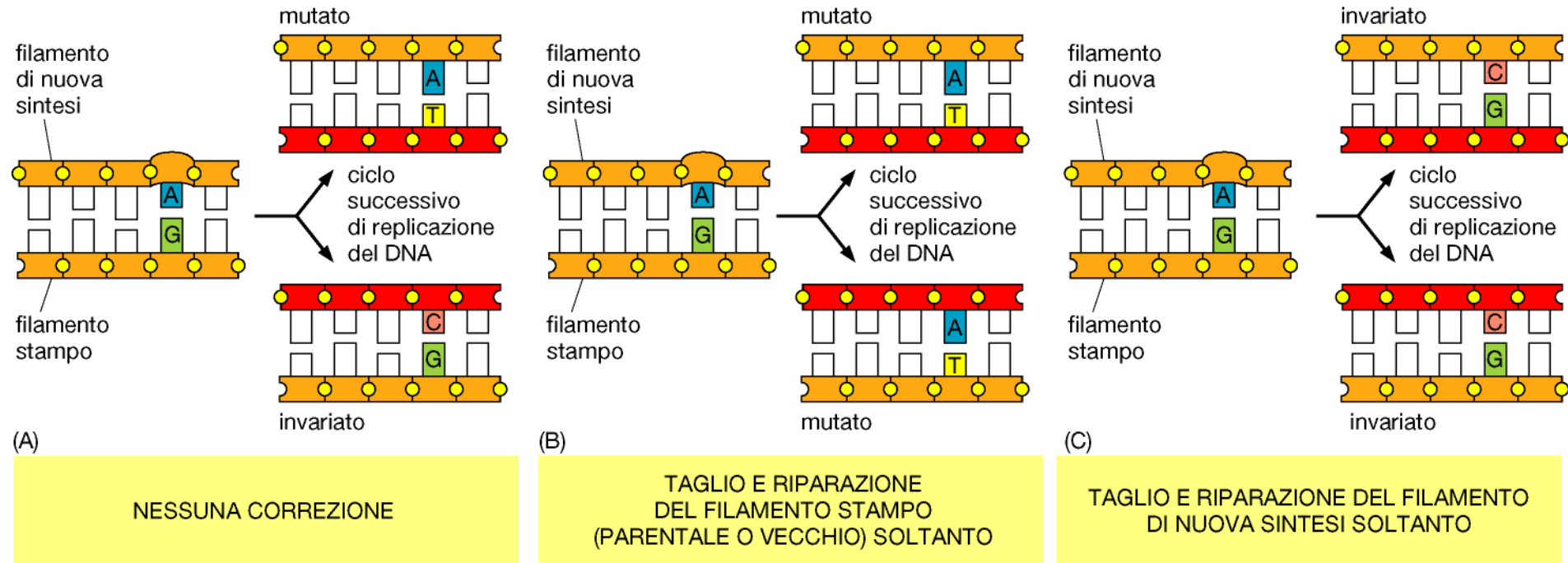


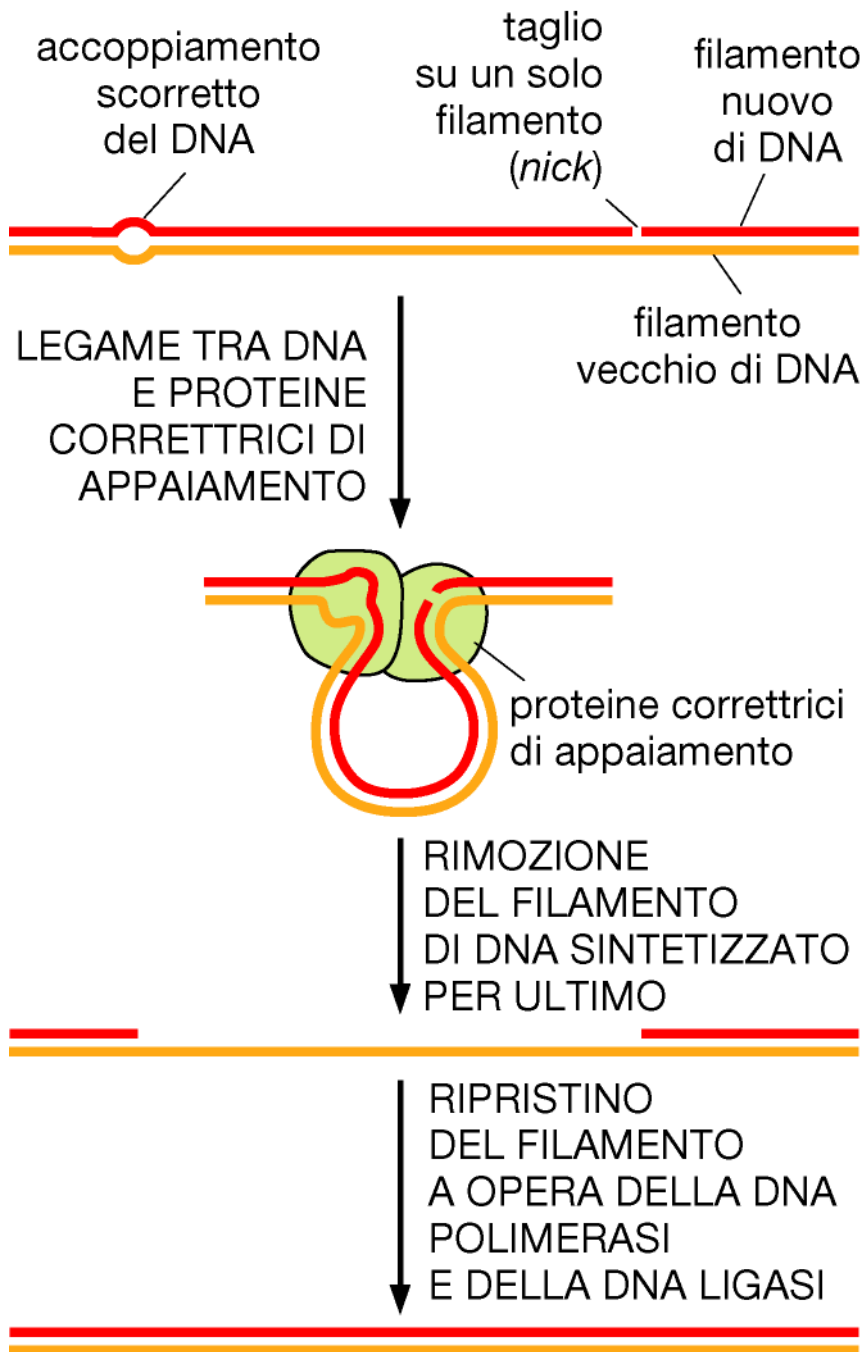
5 μ m



Correttore di appaiamento del DNA

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



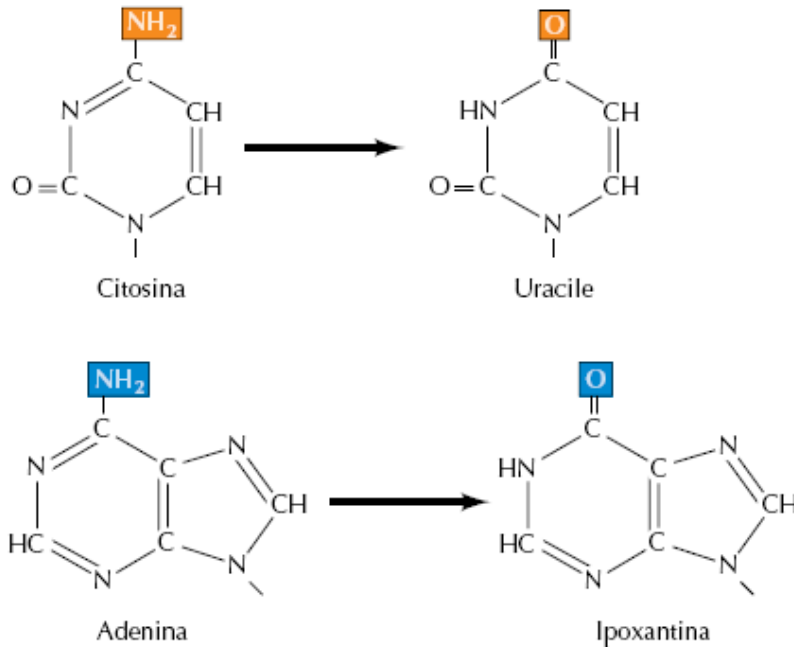


Le proteine correttrici di appaiamento rimediano agli errori occorsi durante la replicazione del DNA

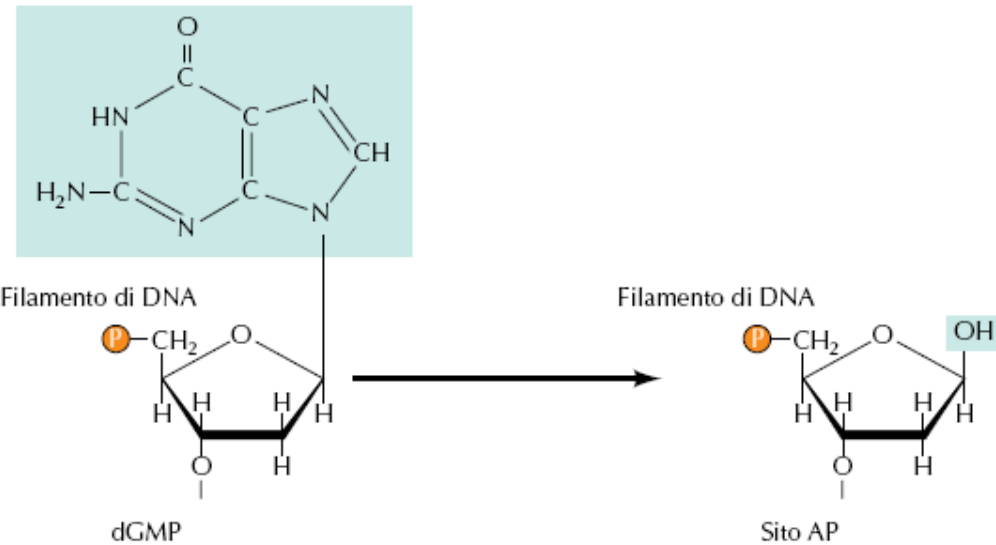
Il DNA subisce ampi mutamenti a causa di fluttuazioni termiche

Danneggiamento spontaneo del DNA

(A) Deaminazione

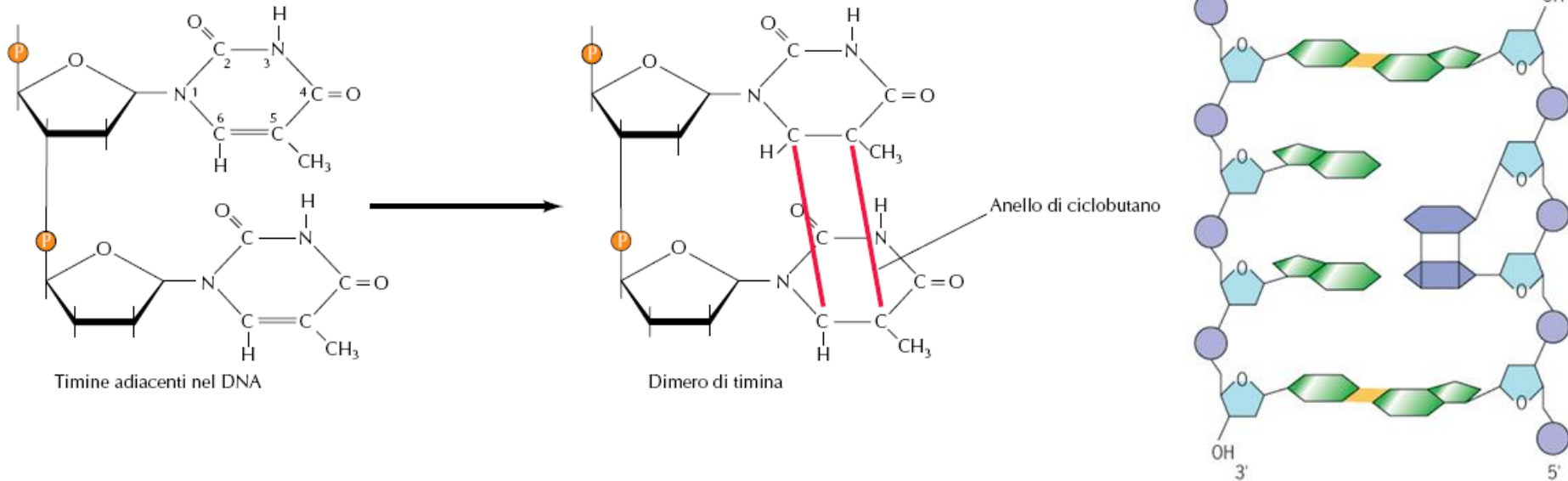


(B) Depurinazione

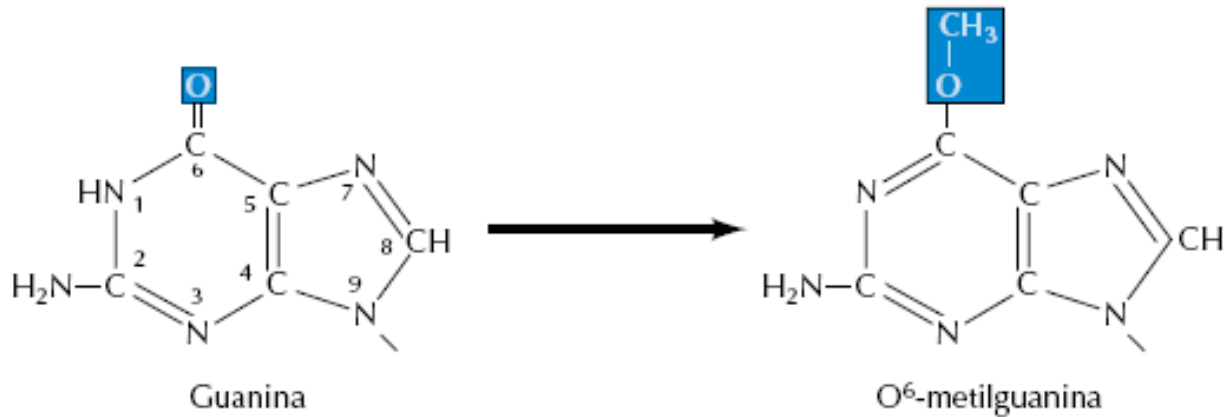


Danneggiamento del DNA indotto da radiazioni e agenti chimici

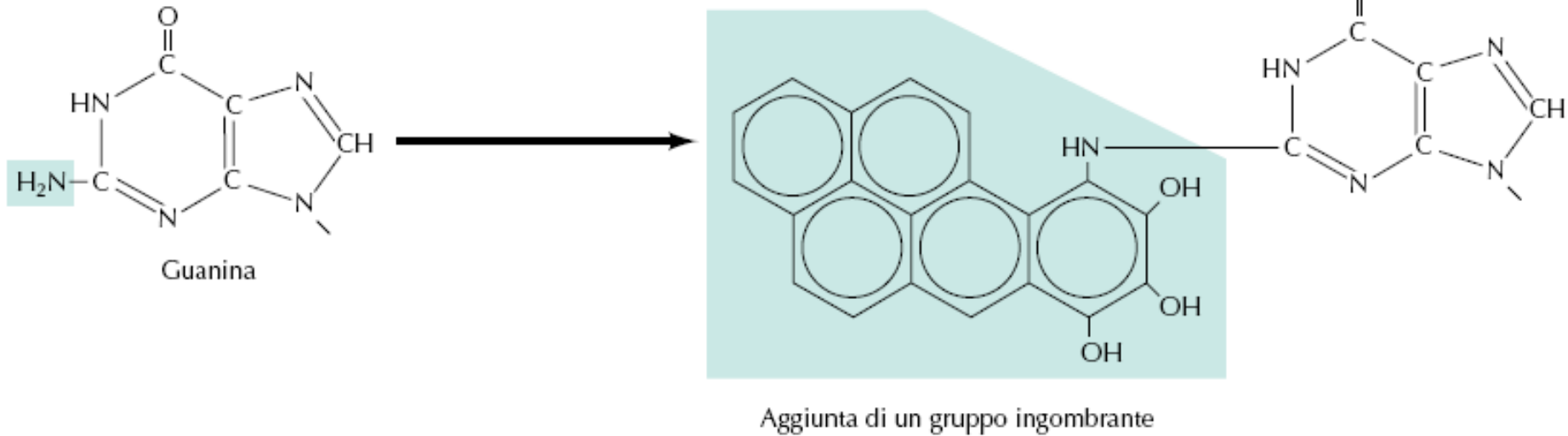
(A) Esposizione a luce UV



(B) Alchilazione

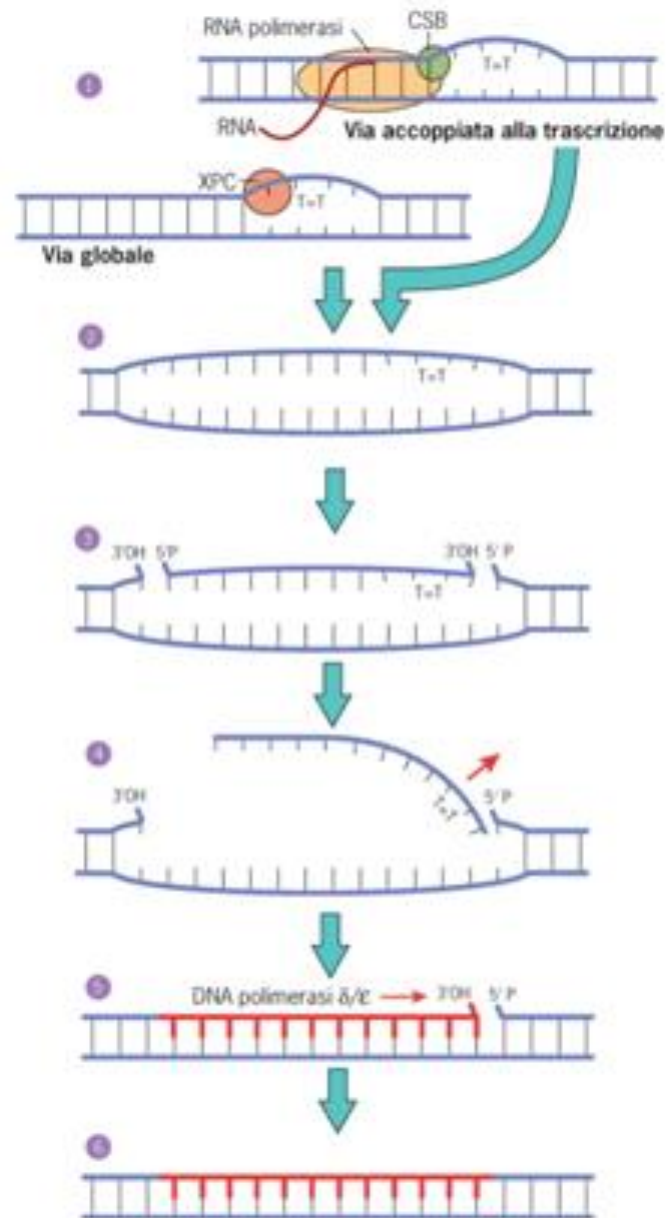


(C) Reazione con carcinogeno

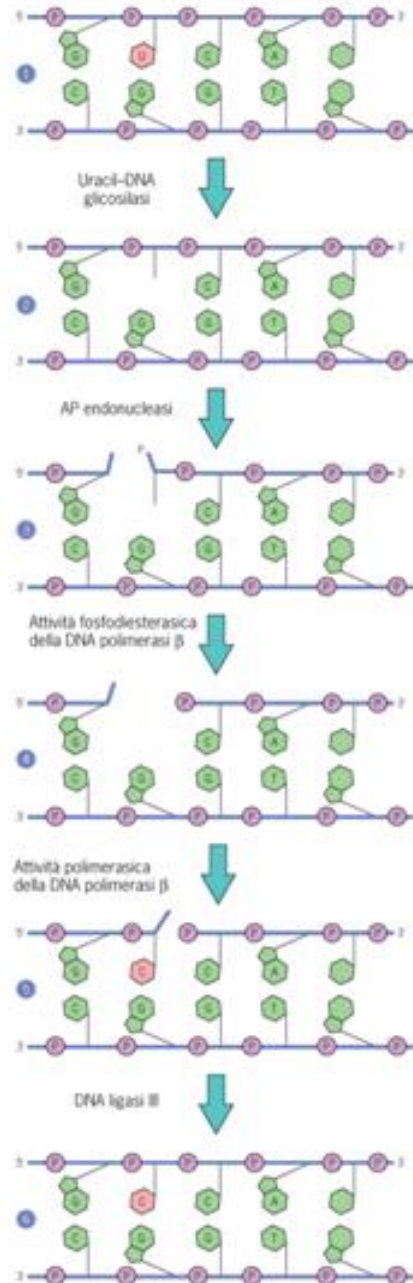


- **Nucleasi di restauro del DNA**: idrolizzano i legami fosfodiesterici creando una lacuna nell'elica
- **DNA polimerasi**: colma la lacuna basandosi sul filamento stampo
- **DNA ligasi**: salda l'incisione sul filamento completando il restauro
- I diversi tipi di danno vengono riconosciuti da enzimi 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**

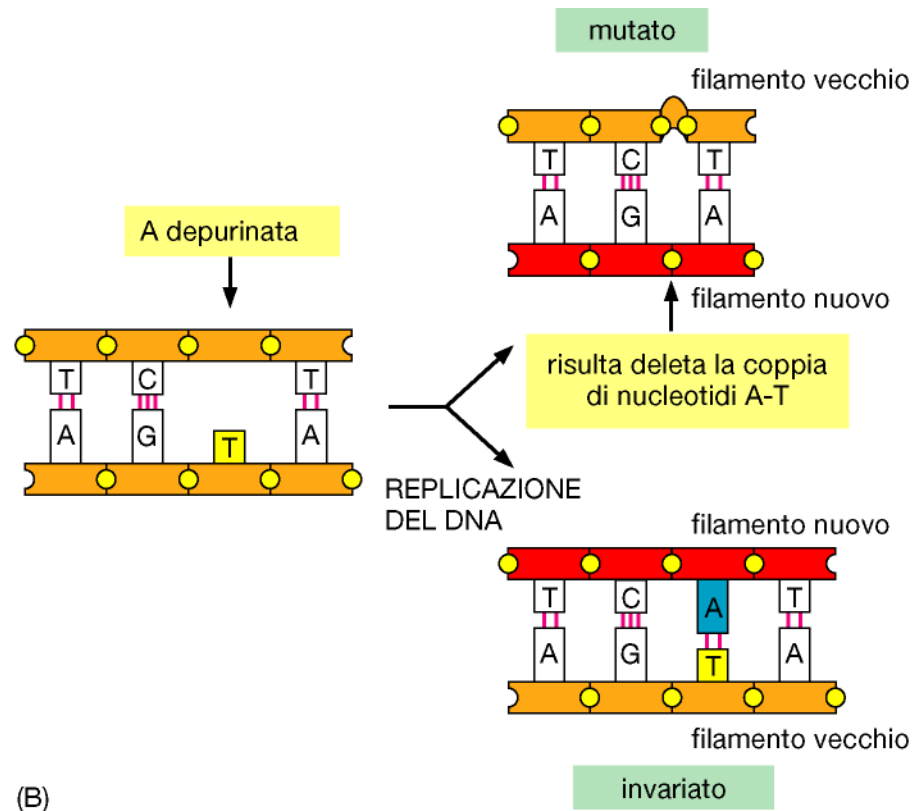
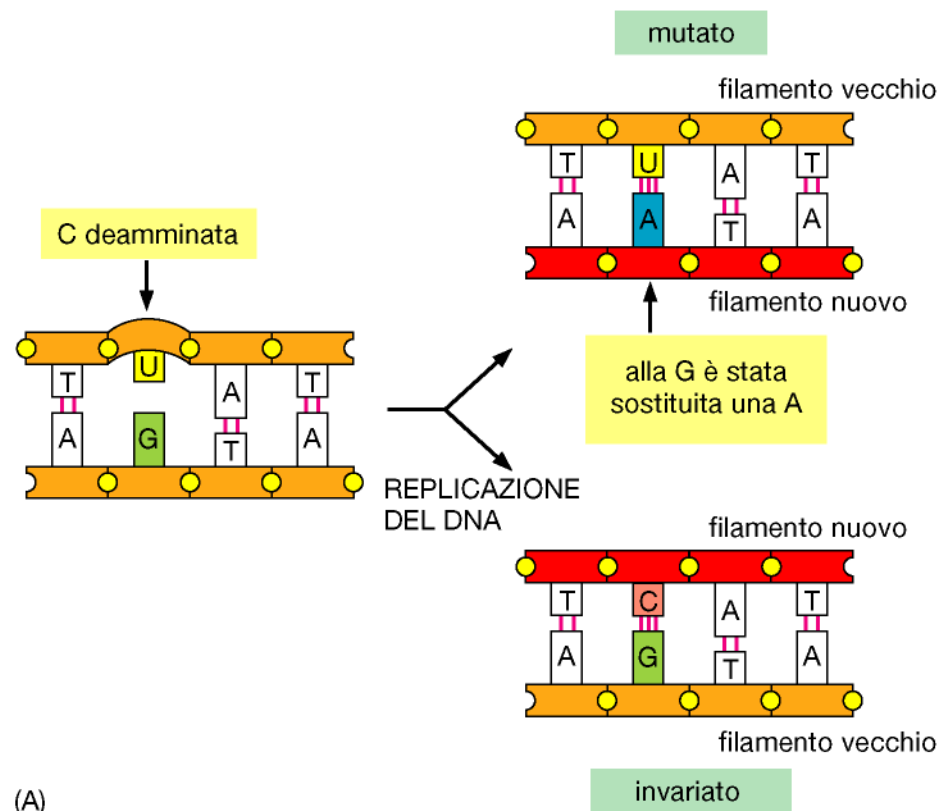
Riparazione per escissione nucleotidica



Riparazione per escissione di base



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



(A)

(B)



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**

Premio Nobel per la chimica alla scoperta dei meccanismi di riparazione del DNA

Aziz Sancar è nato nel 1946 a Savur, in Turchia, ed è attualmente affiliato all'Università del North Carolina a Chapel Hill, Stati Uniti.

Nel 1978 riuscì a clonare il gene del batterio *Escherichia coli* per la fotolitasi. Nel 1983 pubblicò uno studio in cui ricostruiva tutti i passi essenziali della **riparazione per escissione di nucleotidi**. Tra il 1984 e il 1989, dimostrò che la fotolitasi è in grado di convertire l'energia della luce in energia chimica, necessaria a innescare la rimozione dei dimeri di timina dal DNA.

Tomas Lindahl, nato a Stoccolma, in Svezia, nel 1938, è attualmente affiliato al Francis Crick Institute di Hertfordshire, nel Regno Unito.

Dimostrò che in un processo chiamato depurinazione i nucleotidi possono perdere in modo spontaneo le basi azotate adenina e guanina e che nel DNA c'è un tasso relativamente elevato di deaminazione della citosina, trasformandola in uracile. Scoperta di proteine del complesso macchinario noto come **riparazione per escissione di basi**.

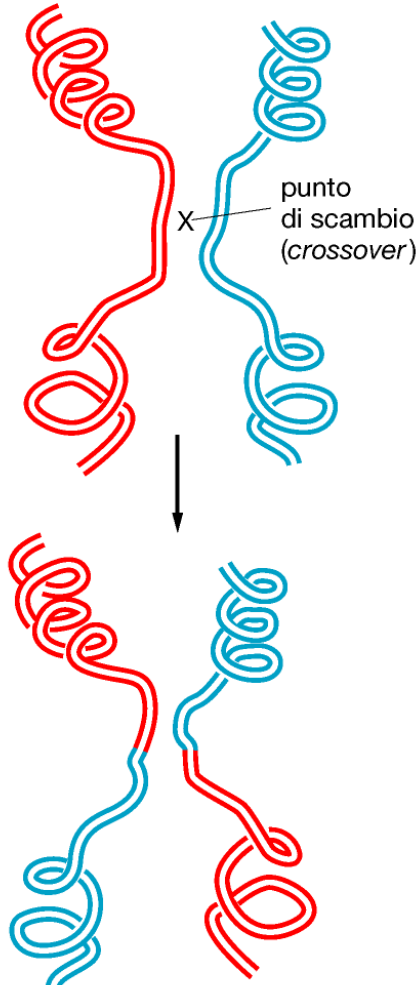
Paul Modrich, nato nel 1946, è affiliato attualmente all'Howard Hughes Medical Institute, di Durham, in North Carolina, Stati Uniti.

Nel 1983 dimostrò che un passaggio chiave della **riparazione degli errori di appaiamento** è la metilazione delle basi del DNA. Dimostrò inoltre che il processo di riparazione dipende dall'ATP e, nel 1989, ricostruì l'intero processo di riparazione in vitro, con la definizione di molte delle molecole implicate. Negli anni duemila, infine, le ricerche di Modrich si sono estese ai meccanismi di riparazione del DNA nelle cellule eucariote, con importanti risultati.

La ricombinazione del DNA

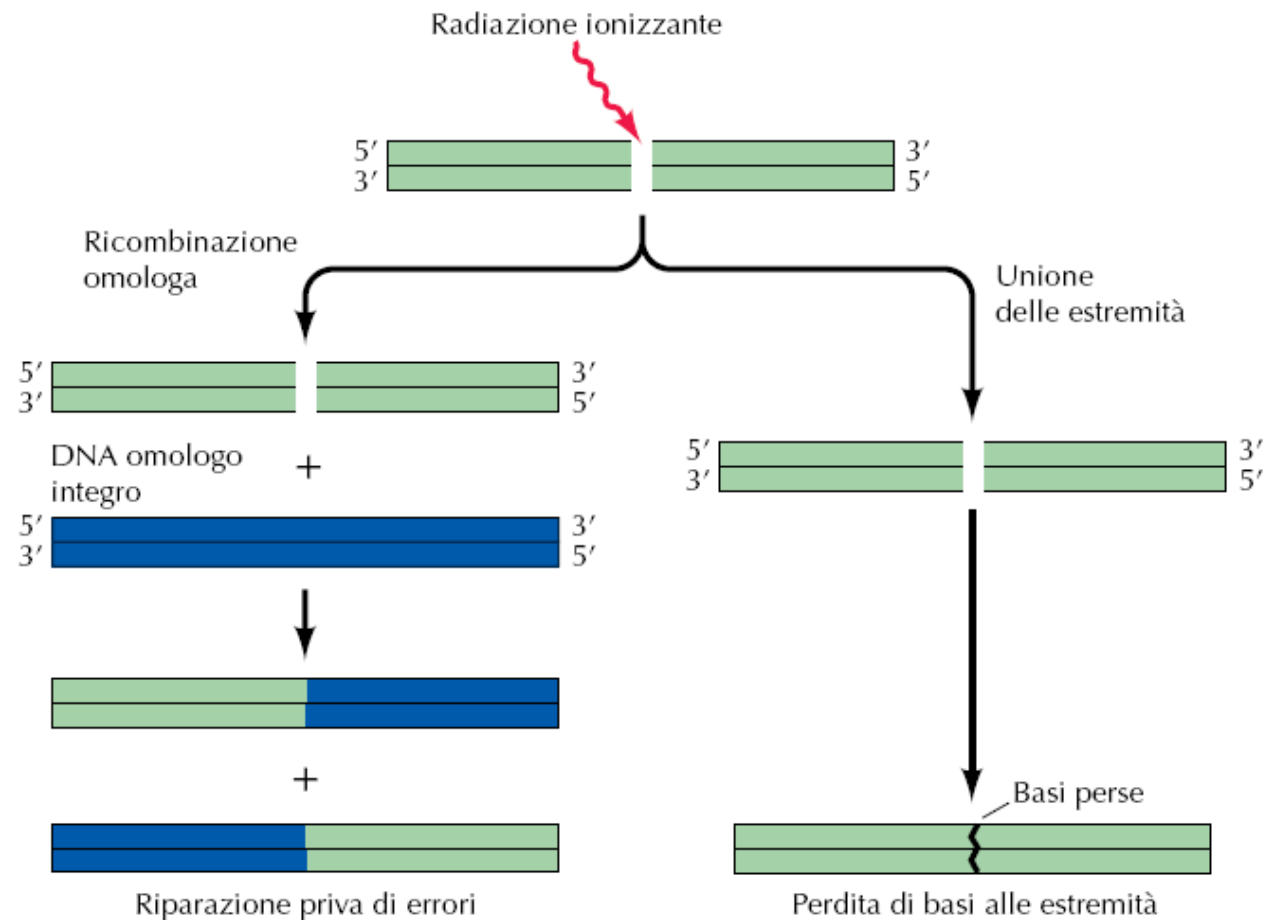
Ricombinazione omologa: scambio di informazione genetica ad alta precisione

due doppie eliche di DNA omologo



molecole di DNA scambiate (*crossed over*)

Riparazione da tagli del doppio filamento di DNA



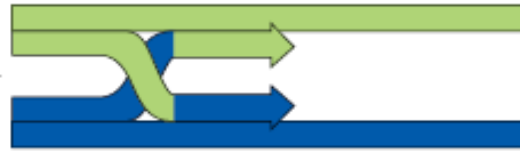
Ipotetici modelli di ricombinazione

Scelta della copia

Sintesi di nuovi DNA figli



Scambio per copiare l'altro stampo parentale

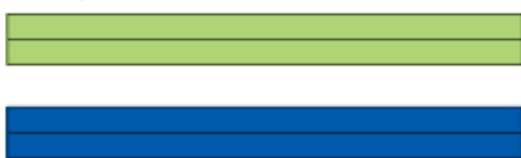


DNA figli ricombinanti



Taglio e unione

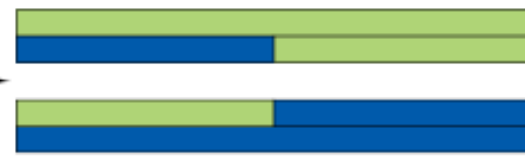
DNA parentali



Taglio e unione incrociata

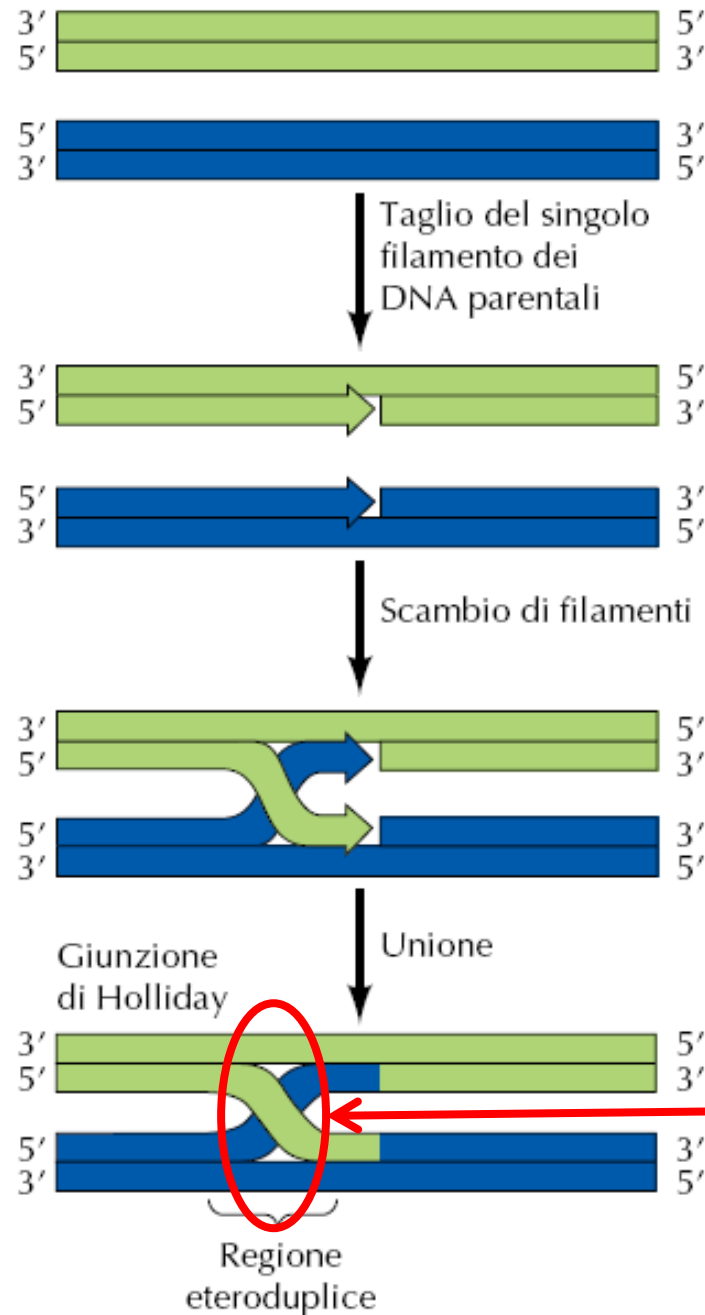


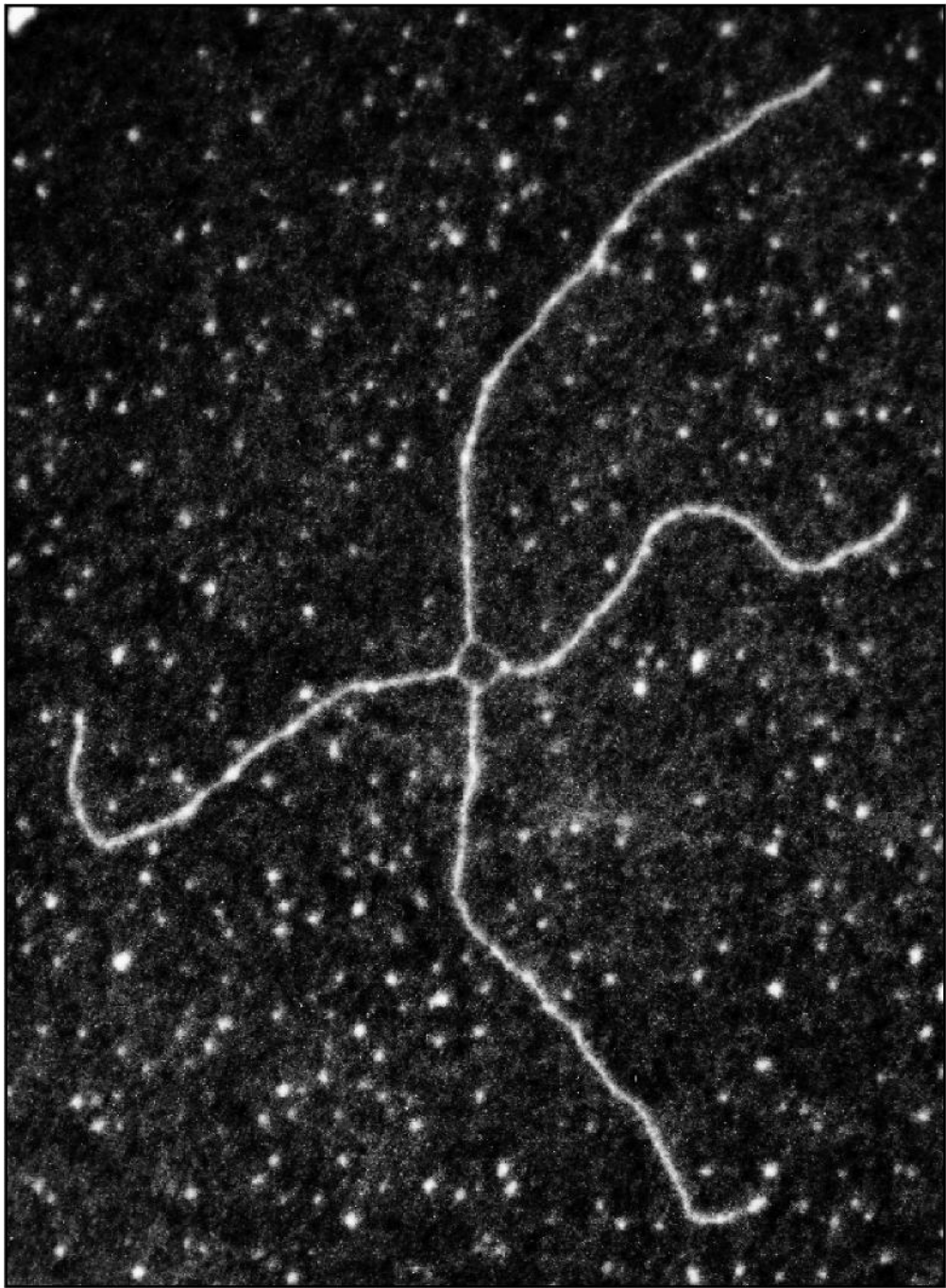
DNA ricombinanti



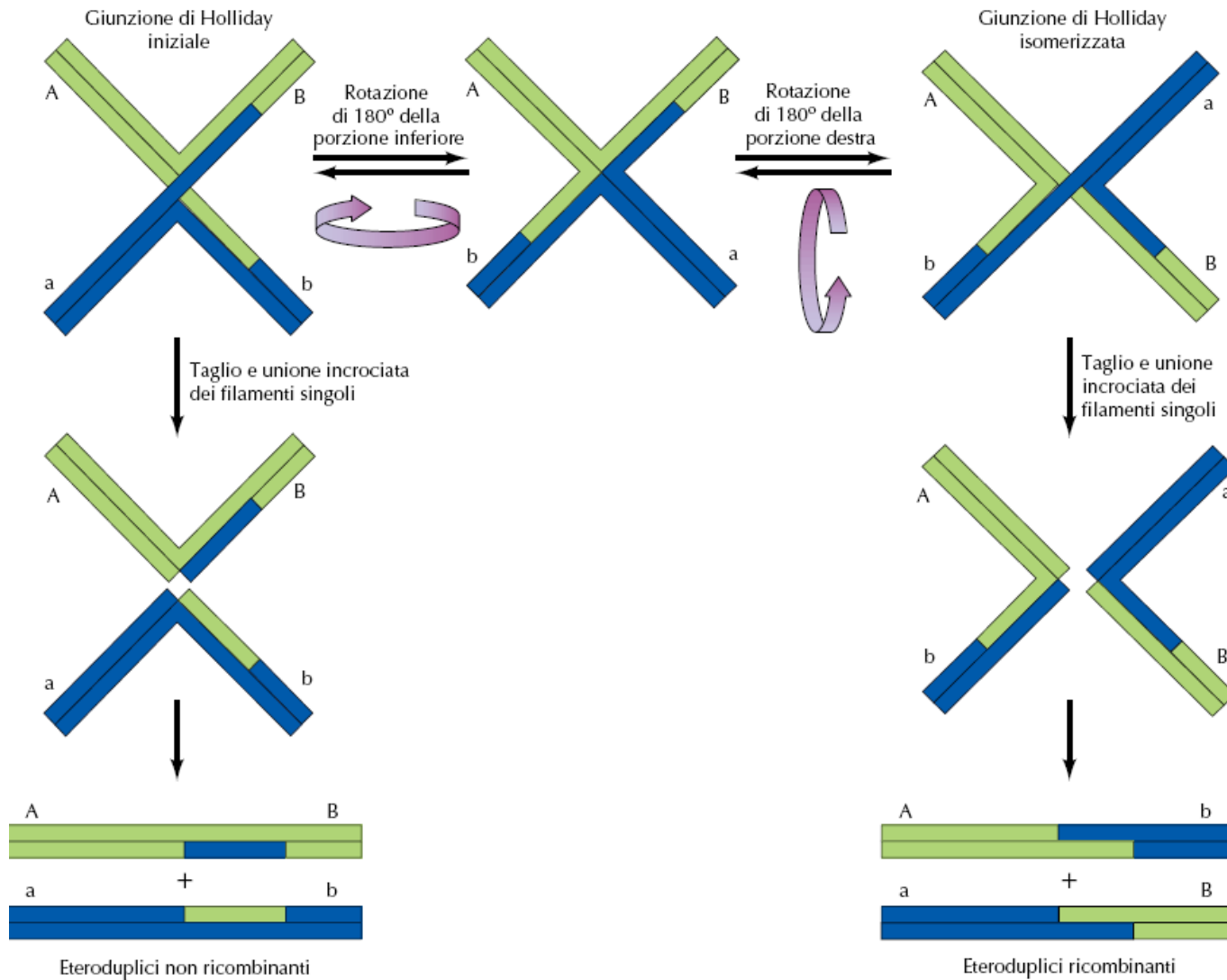
E' stato poi dimostrato che il modello corretto era quello della rottura e riunione

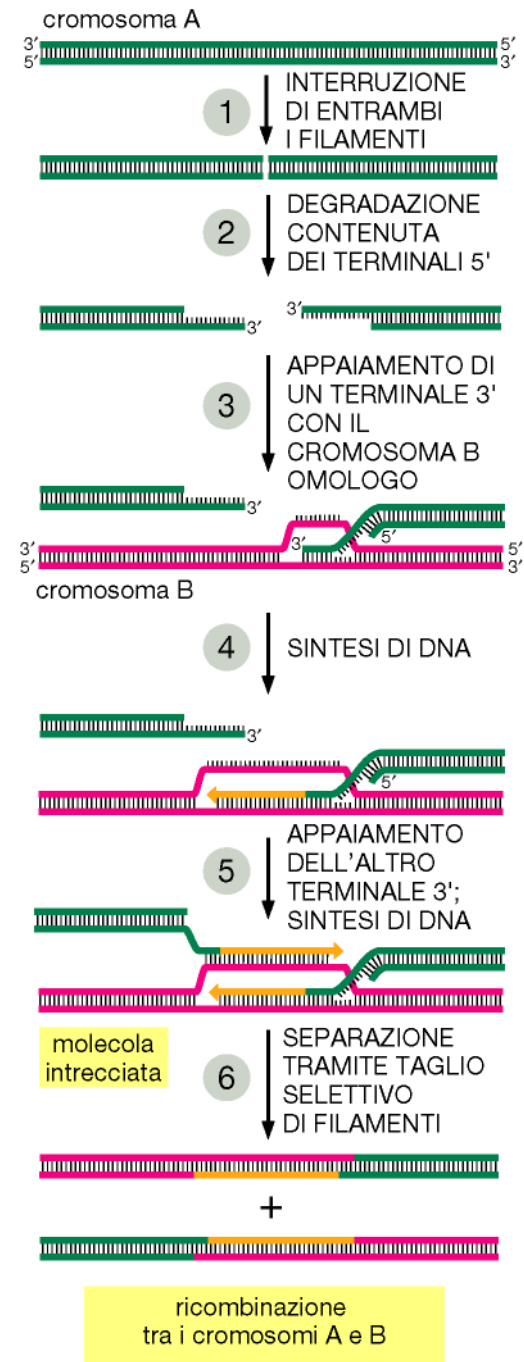
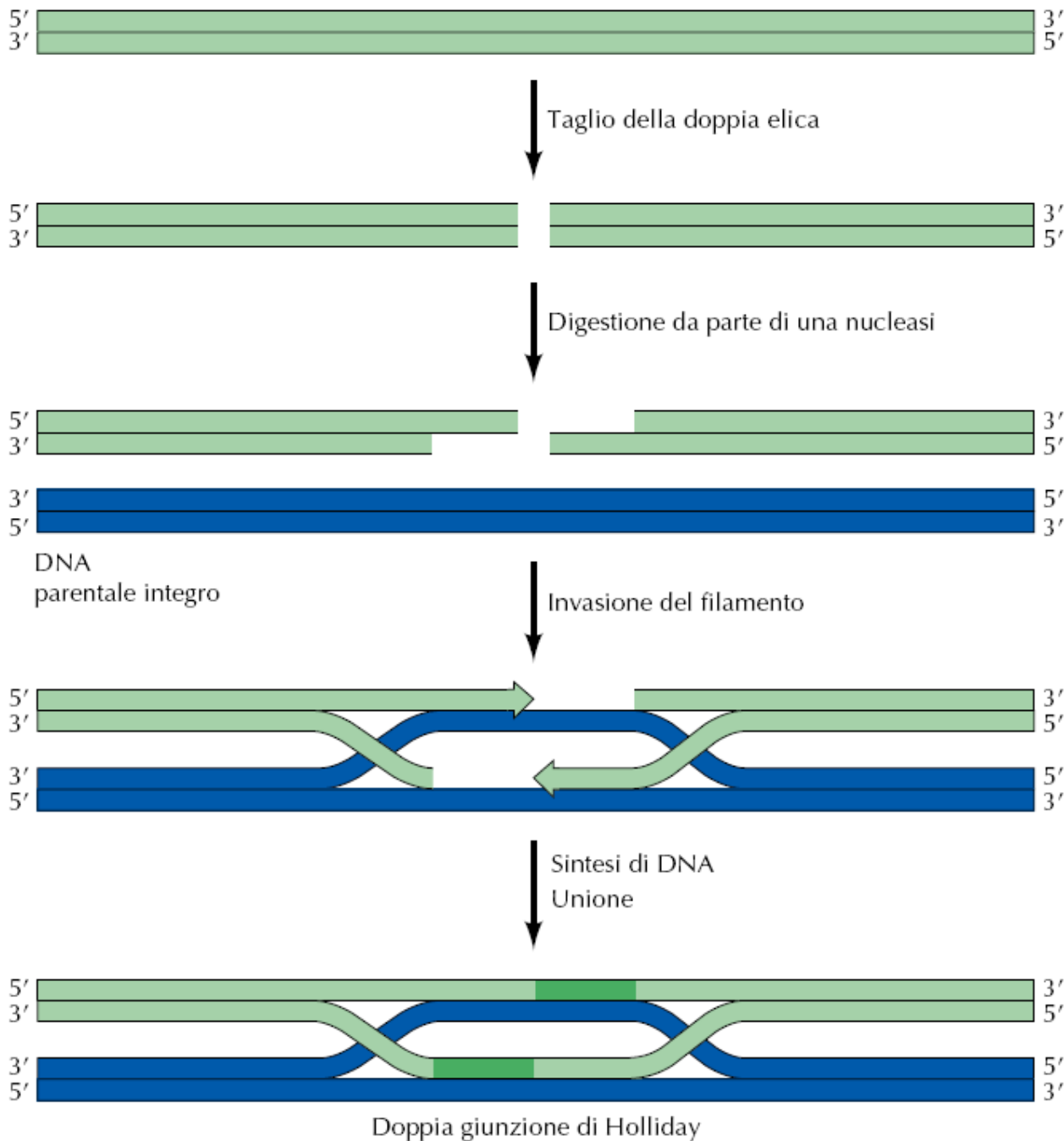
Il modello di Holliday per la ricombinazione omologa





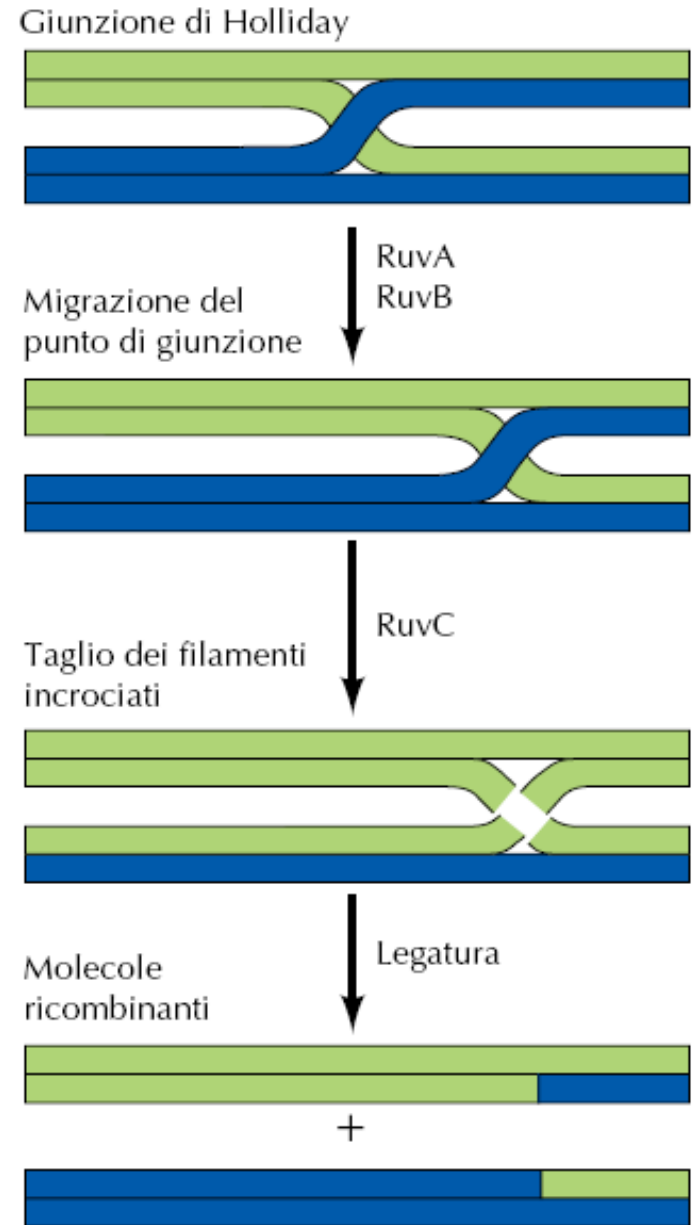
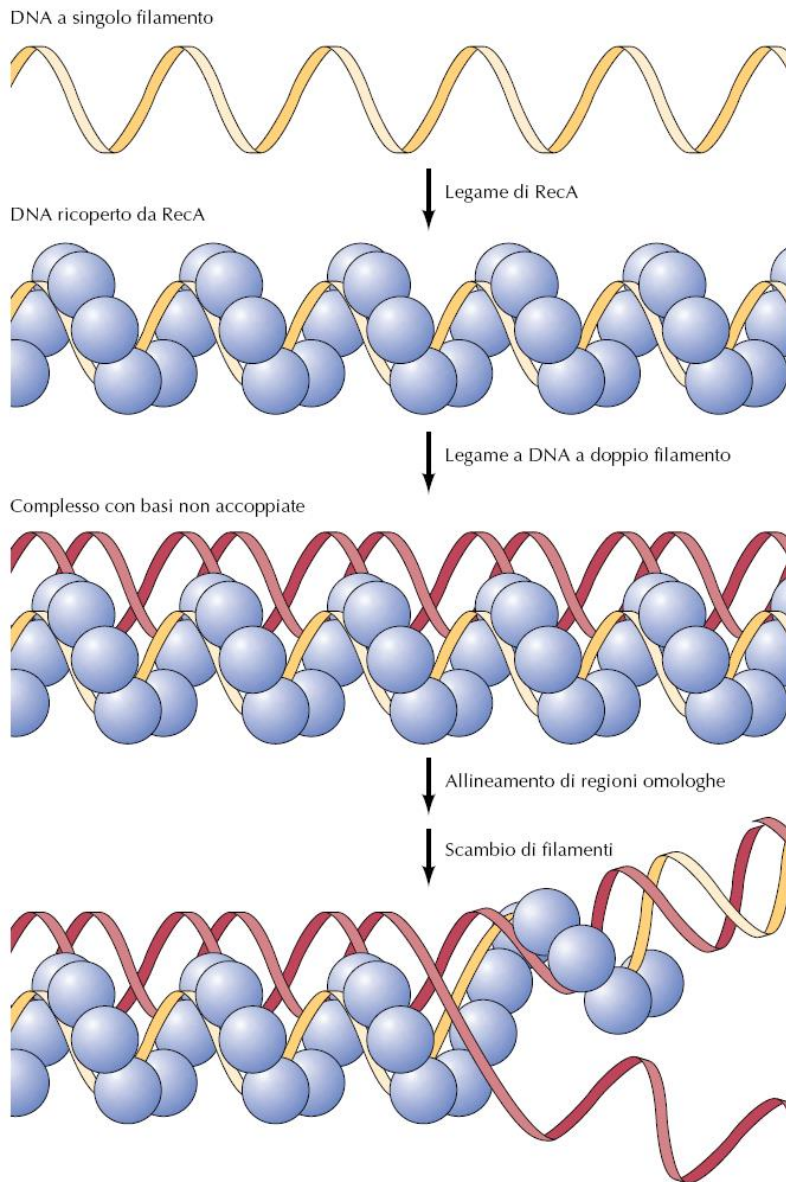
Giunzione di Holliday





Gli enzimi coinvolti nella ricombinazione omologa

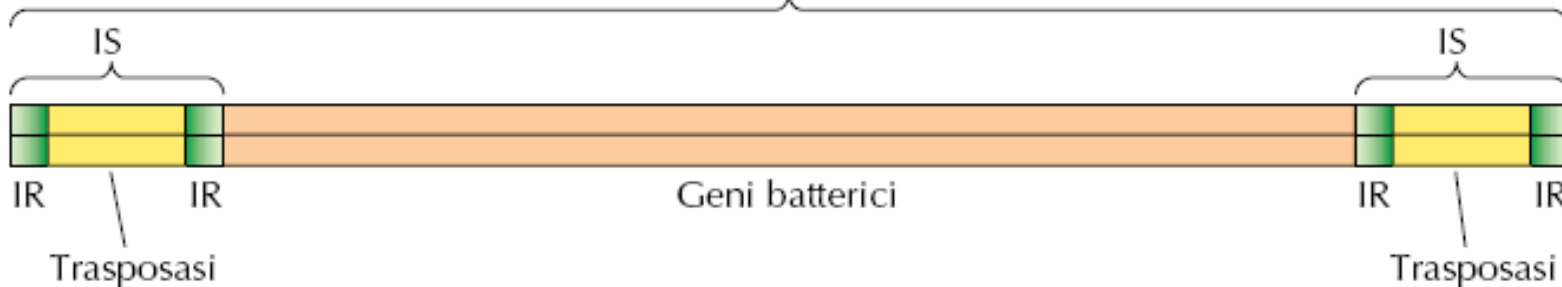
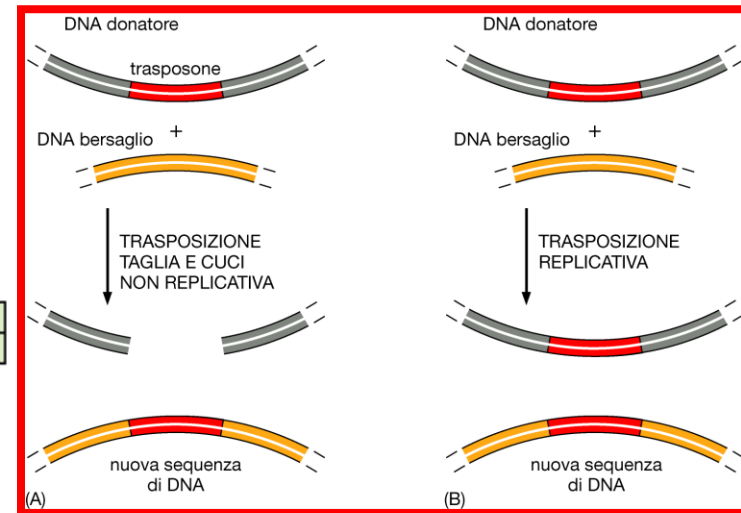
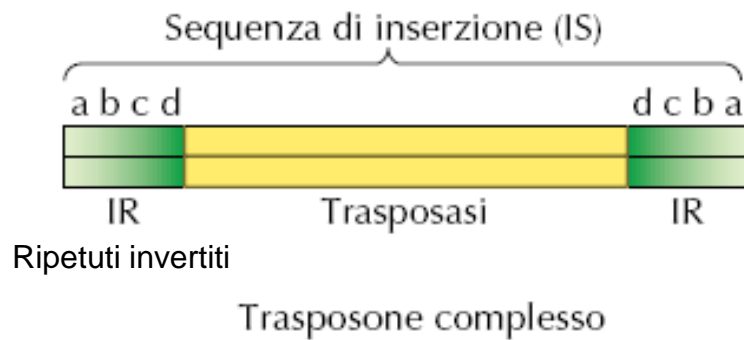
E. Coli



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)

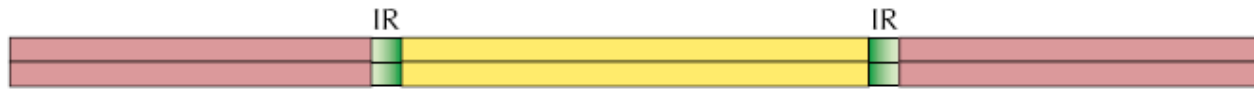
Gli elementi genetici mobili codificano le molecole di cui hanno bisogno per spostarsi

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



Trasposoni a solo DNA

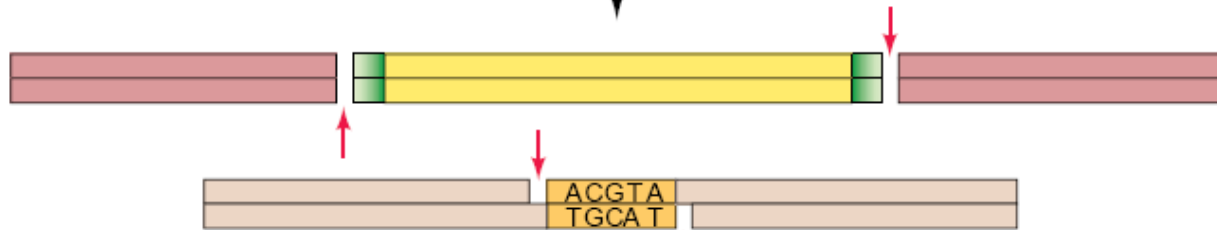
Trasposone integrato nel sito donatore



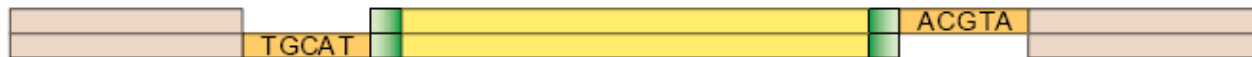
Sito bersaglio



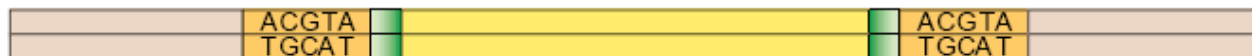
La trasposasi taglia alle estremità delle ripetizioni invertite del trasposone e introduce tagli sfalsati nel DNA bersaglio



Estremità sporgenti del DNA bersaglio unite al trasposone



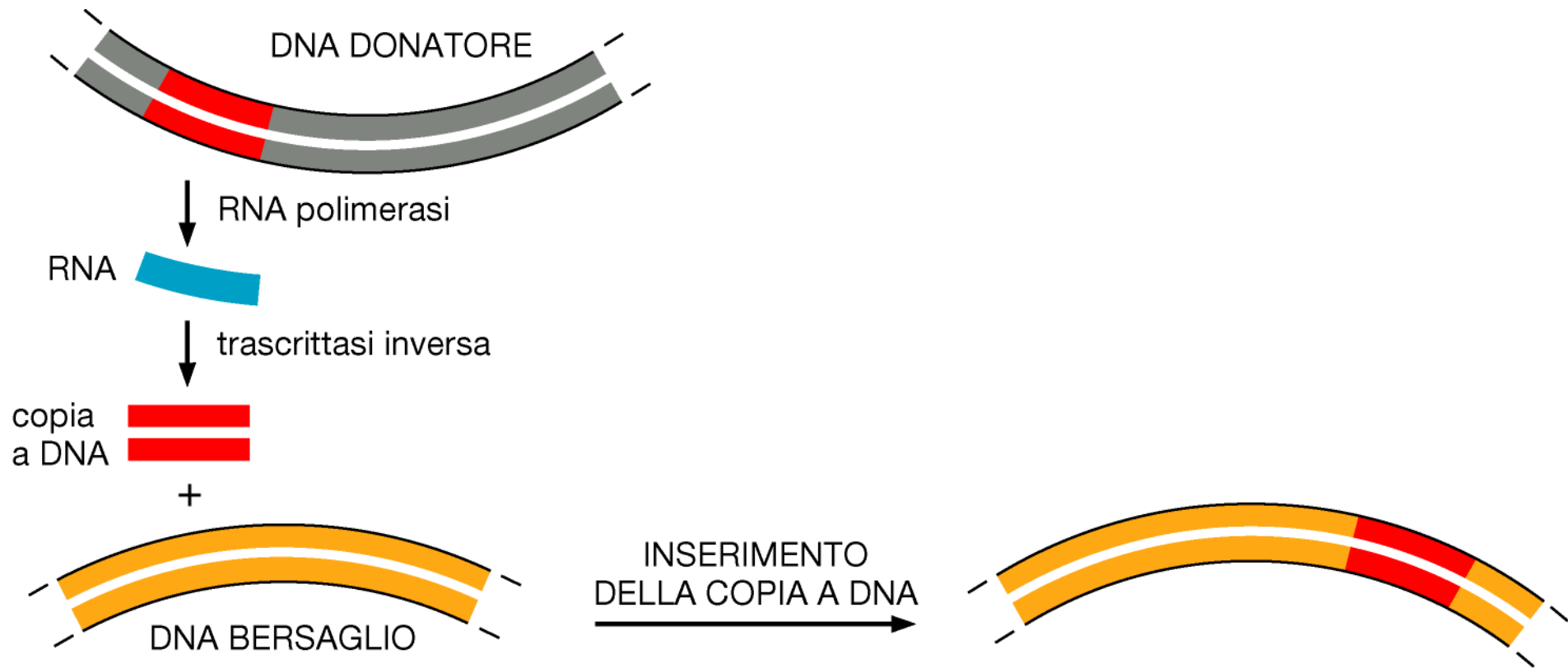
Interruzioni riparate mediante sintesi di DNA



Ripetizioni dirette del DNA del sito bersaglio

Trasposizione mediante intermedi di RNA

RETROTRASPOSONI



Altri esempi importanti di ricombinazione sito specifica

Riarrangiamenti programmati di geni nei genomi:

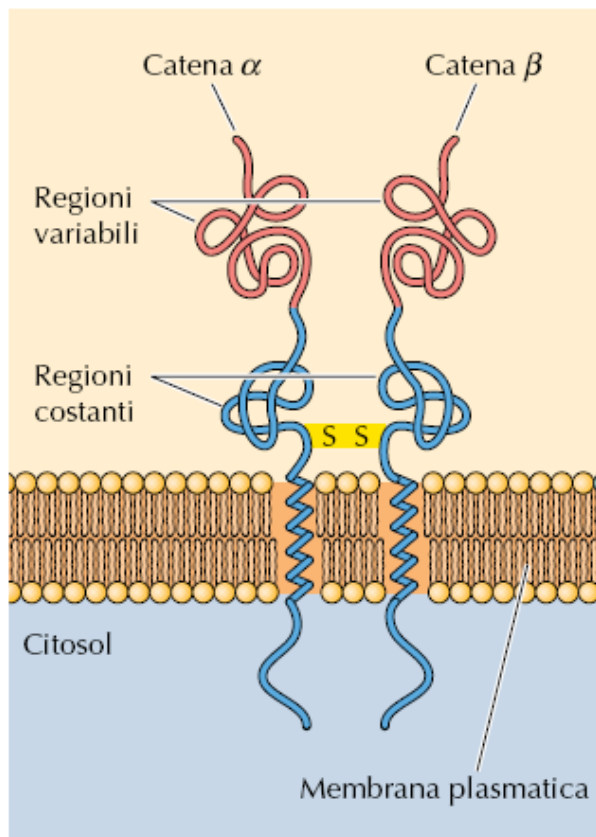
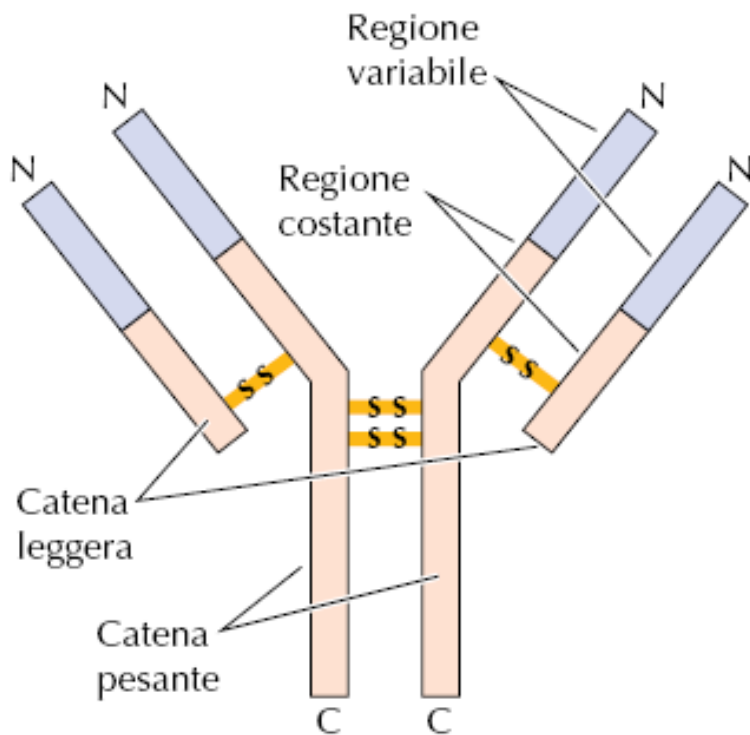
l'esempio del **SISTEMA IMMUNITARIO**



Cellule B
Immunoglobuline



Cellule T
Recettori di cellule T



Riarrangiamento dei geni delle catene leggere delle immunoglobuline

