

LEZIONE 3

• **COMPOSTI DEL CARBONIO: MACROMOLECOLE:**

• **ZUCCHERI** (oggetto della lezione precedente)

• **ACIDI GRASSI** (oggetto della lezione precedente)

• **PROTEINE** (oggetto della lezione precedente)

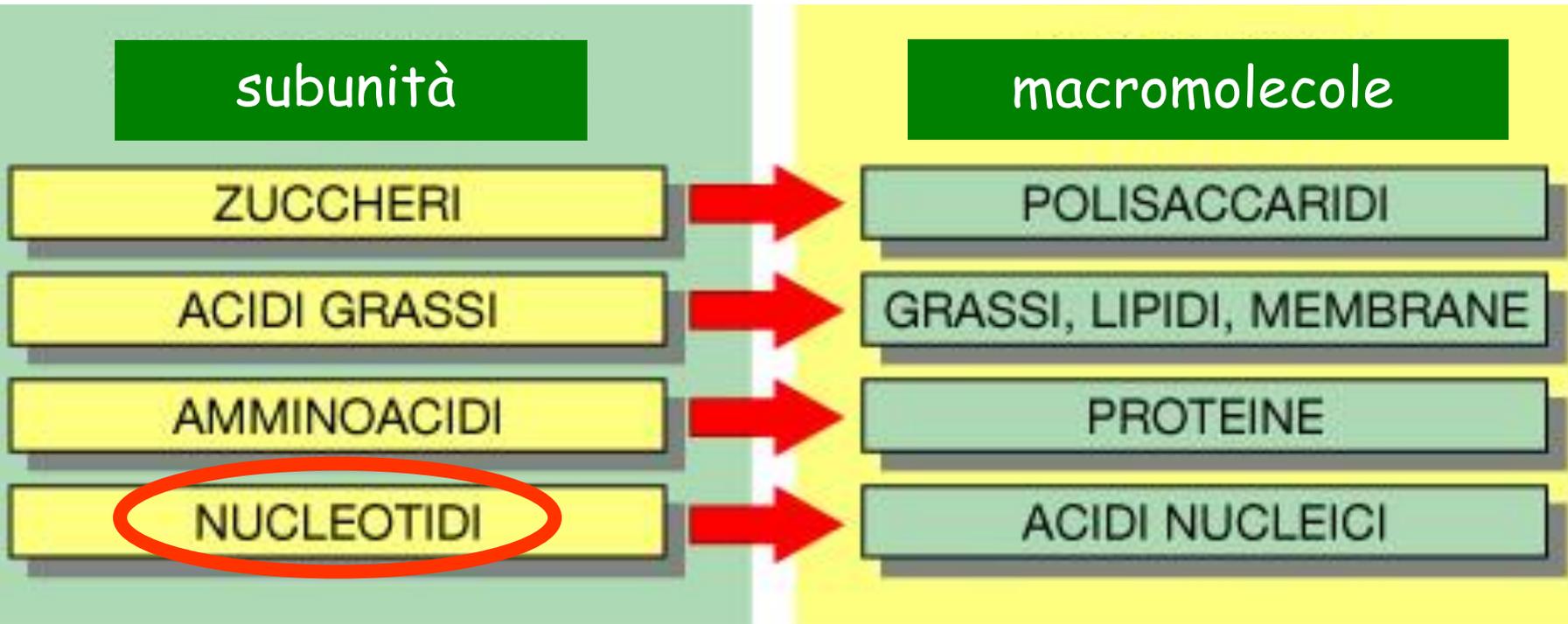
• **NUCLEOTIDI**

• **COMPATTAMENTO DEL DNA**

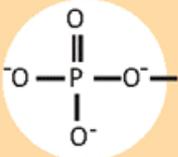
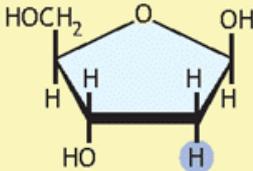
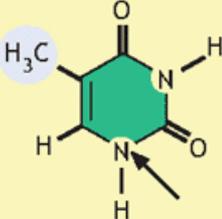
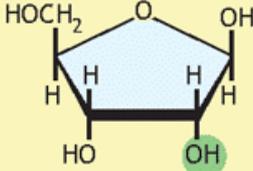
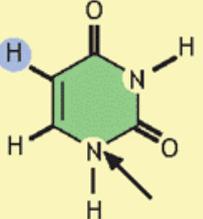
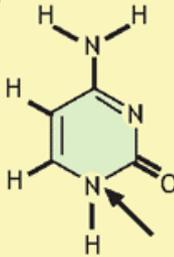
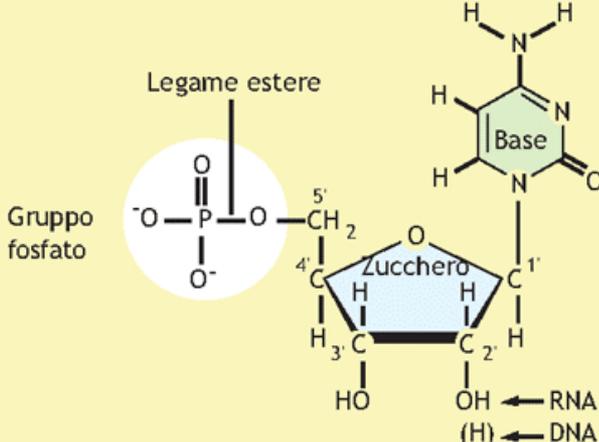
• **ORGANIZZAZIONE DEI GENOMI**

I componenti chimici di una cellula

Le cellule contengono 4 famiglie principali di piccole molecole organiche:

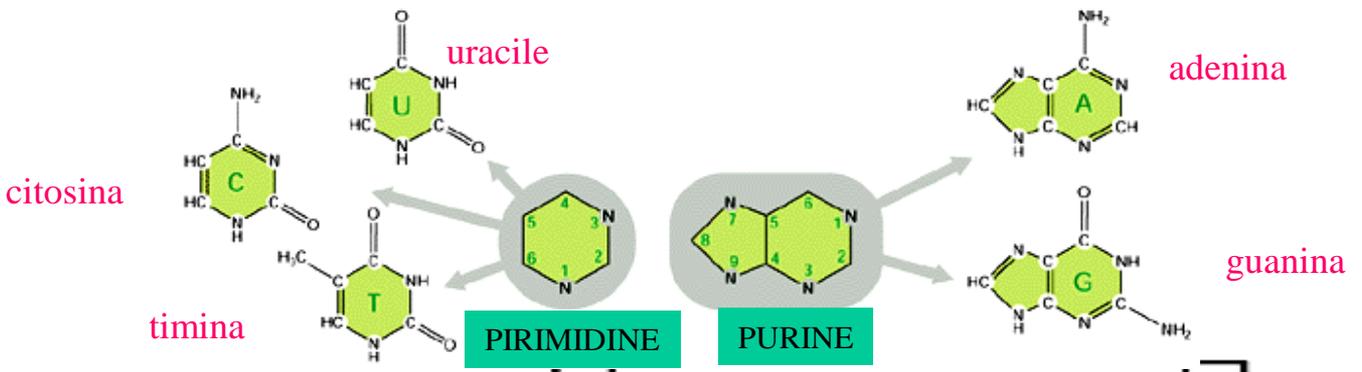


Il nucleotide

Gruppo fosfato	Zuccheri	Basi		
		Purine	Pyrimidine	
	 <p>β-D-desossiribosio (nel DNA)</p>	 <p>Adenina (A)</p>	 <p>Timina (T) (nel DNA)</p>	
	 <p>β-D-ribosio (nell'RNA)</p>	 <p>Guanina (G)</p>	 <p>Uracile (U) (nell'RNA)</p>	 <p>Citosina (C)</p>
	Nucleotide			
				

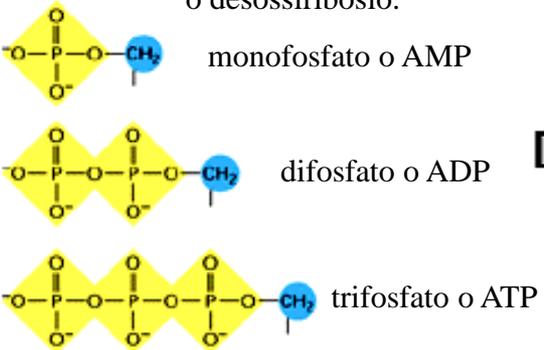
BASI

Le basi sono composti ad anello che contengono azoto, o purine o pirimidine



FOSFATI

Sono normalmente uniti al gruppo OH in C5 de ribosio o desossiribosio.



Il fosfato rende un nucleotide carico -

NUCLEOTIDI

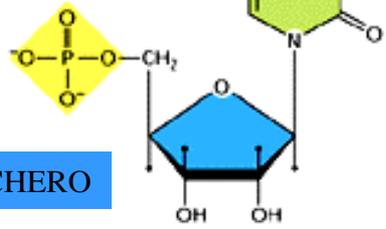
Le subunità degli acidi nucleici.

Un nucleotide consiste di una base contenente azoto, uno zucchero a 5 atomi di C e uno o più gruppi fosfato

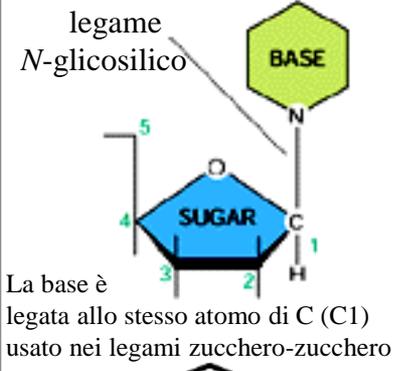
FOSFATO

ZUCCHERO

BASE



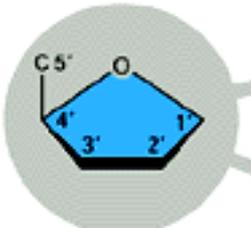
LEGAME FRA BASE E ZUCCHERO



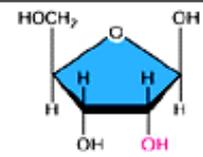
ZUCCHERI

PENTOSO

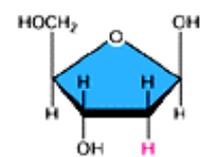
uno zucchero a 5 atomi di C



se ne usano due tipi



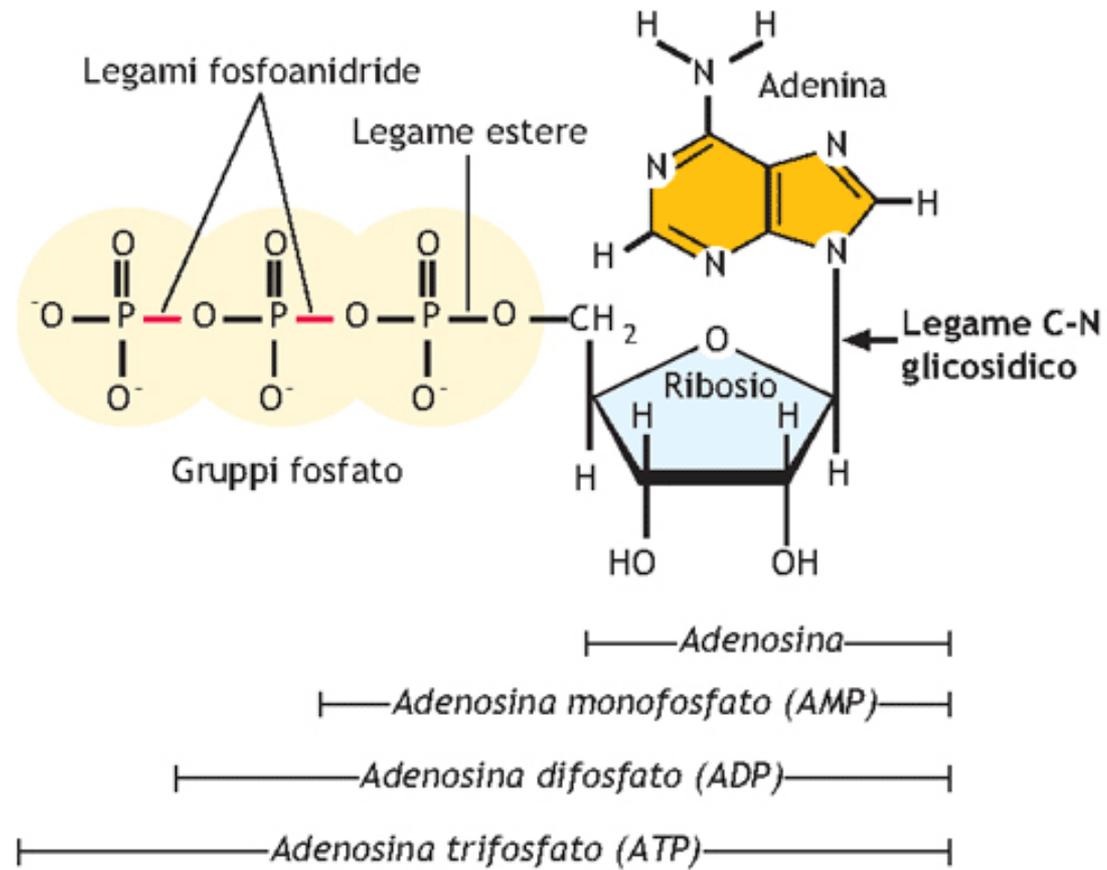
β-D-RIBOSIO
 usato nell'acido ribonucleico



β-D-2-DEOSSIRIBOSIO
 usato nell'acido deossiribonucleico

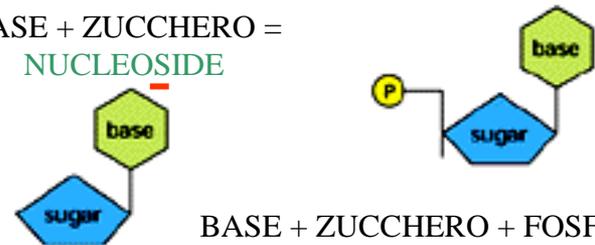
Ciascun C numerato dello zucchero di un nucleotide è seguito da un segno primo ('); si parla quindi di "C 5 primo" ecc.

NOMENCLATURA

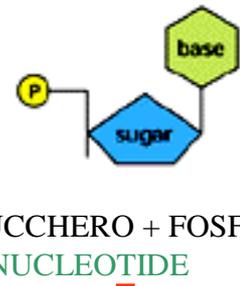


BASE	NUCLEOSIDE	ABBR.
adenina	adenosina	A
guanina	guanosina	G
citosina	citidina	C
uracile	uridina	U
timina	timidina	T

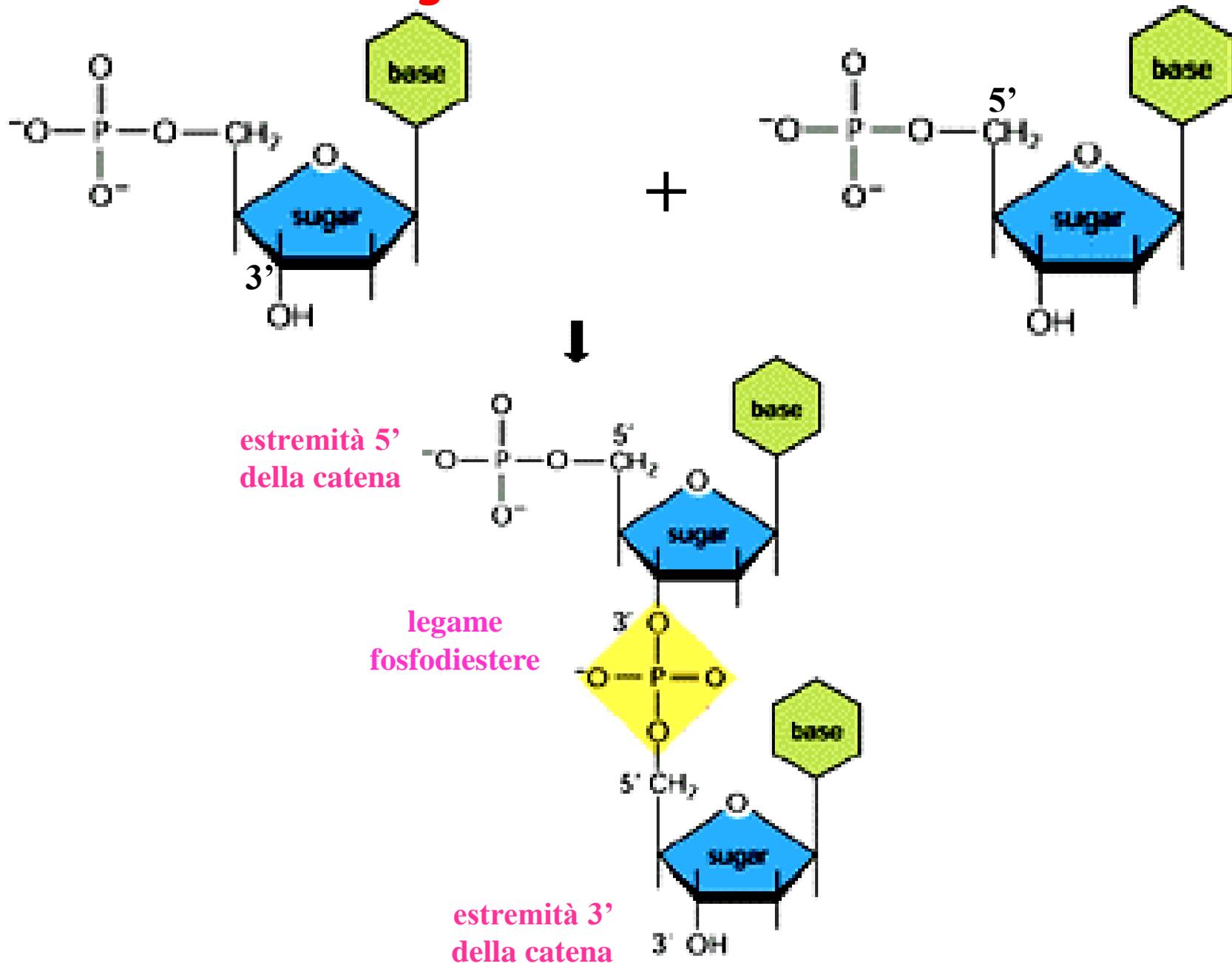
BASE + ZUCCHERO =
NUCLEOSIDE



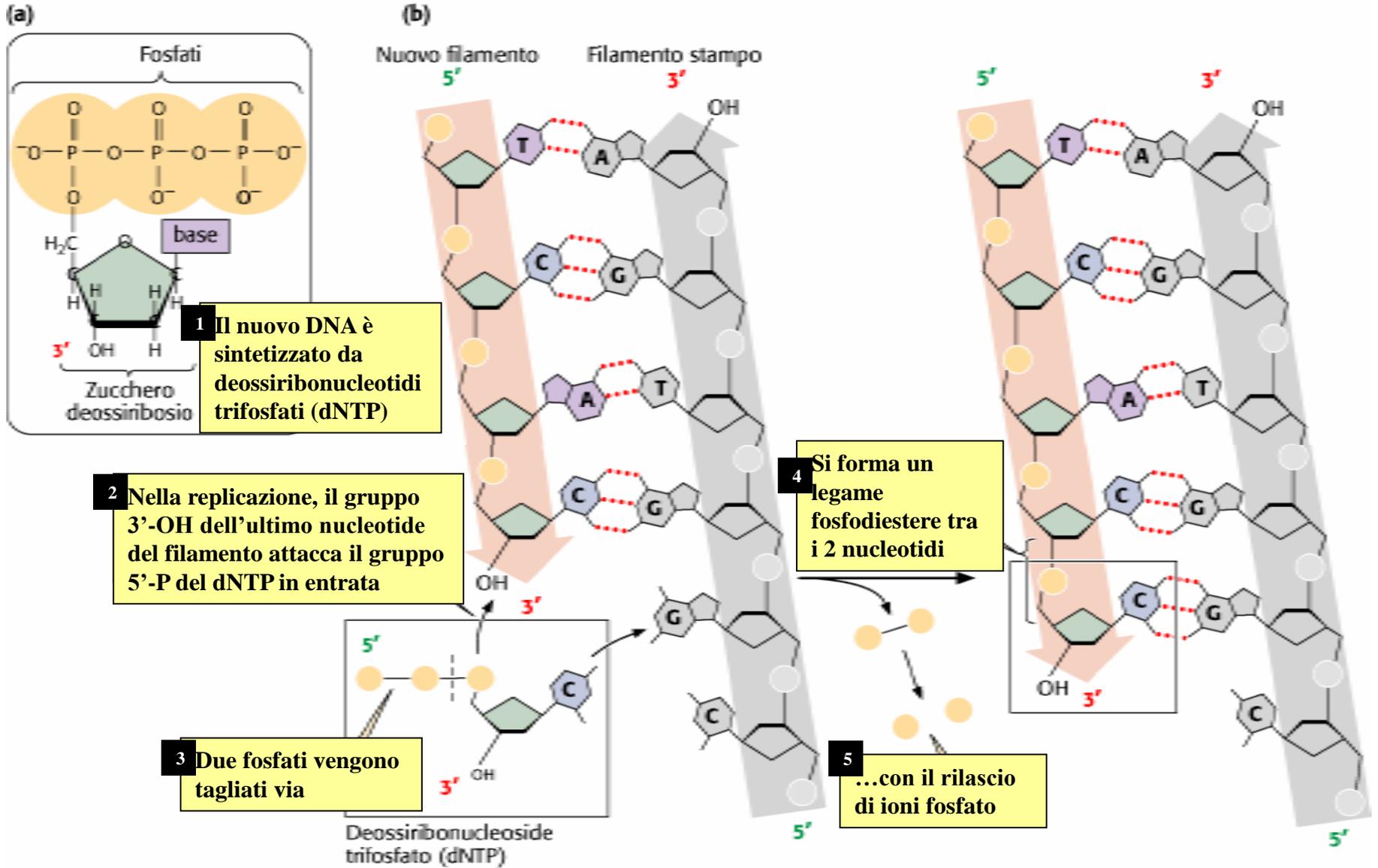
BASE + ZUCCHERO + FOSFATO =
NUCLEOTIDE



Il legame fosfodiester



Il legame fosfodiester



Il legame fosfodiesterico

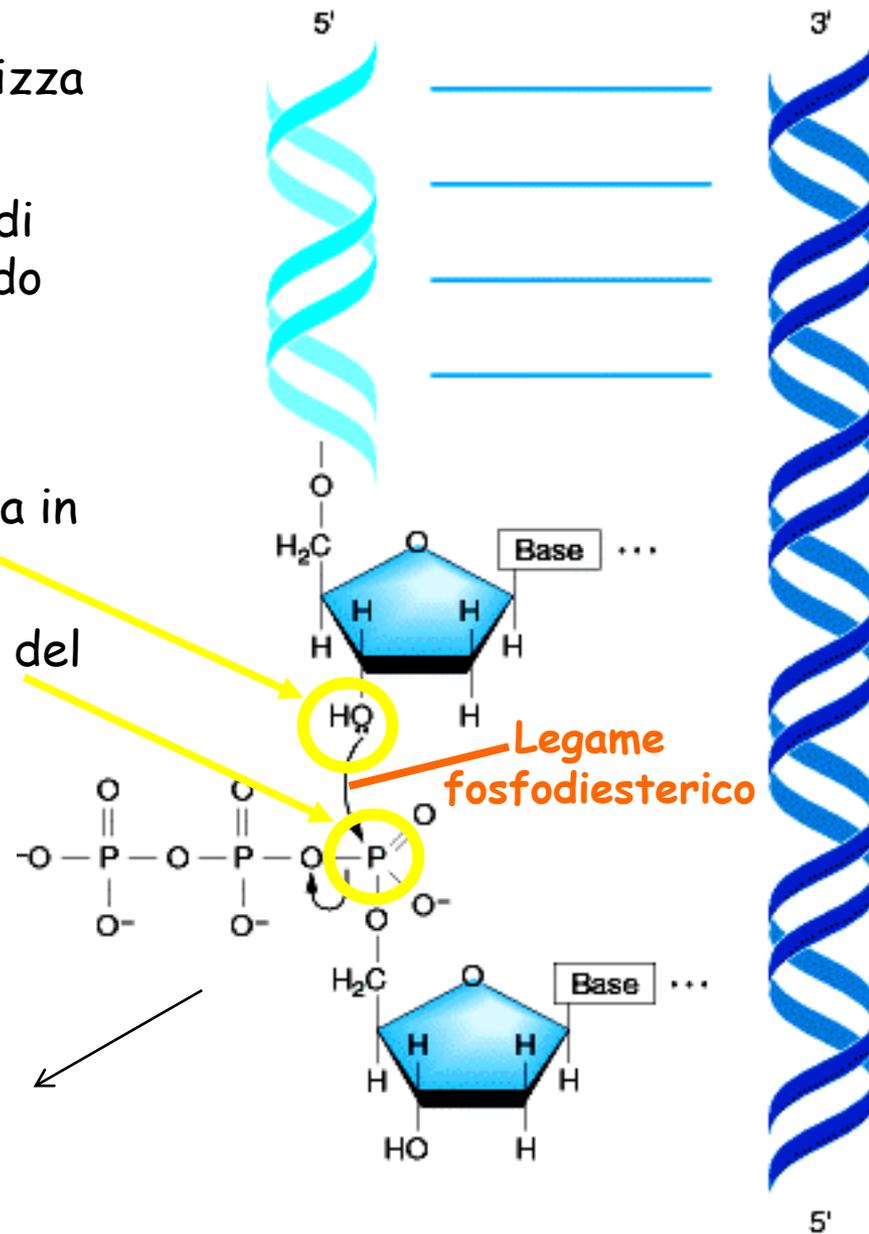
Il complesso enzimatico catalizza l'aggiunta di nucleotidi

all'estremità 3' di una catena di DNA in allungamento, formando

legami fosfodiesterici tra

l'OH legato al C3' dell'ultimo nucleotide già unito alla catena in allungamento e

il gruppo fosfato legato al C5' del nucleotide aggiuntivo

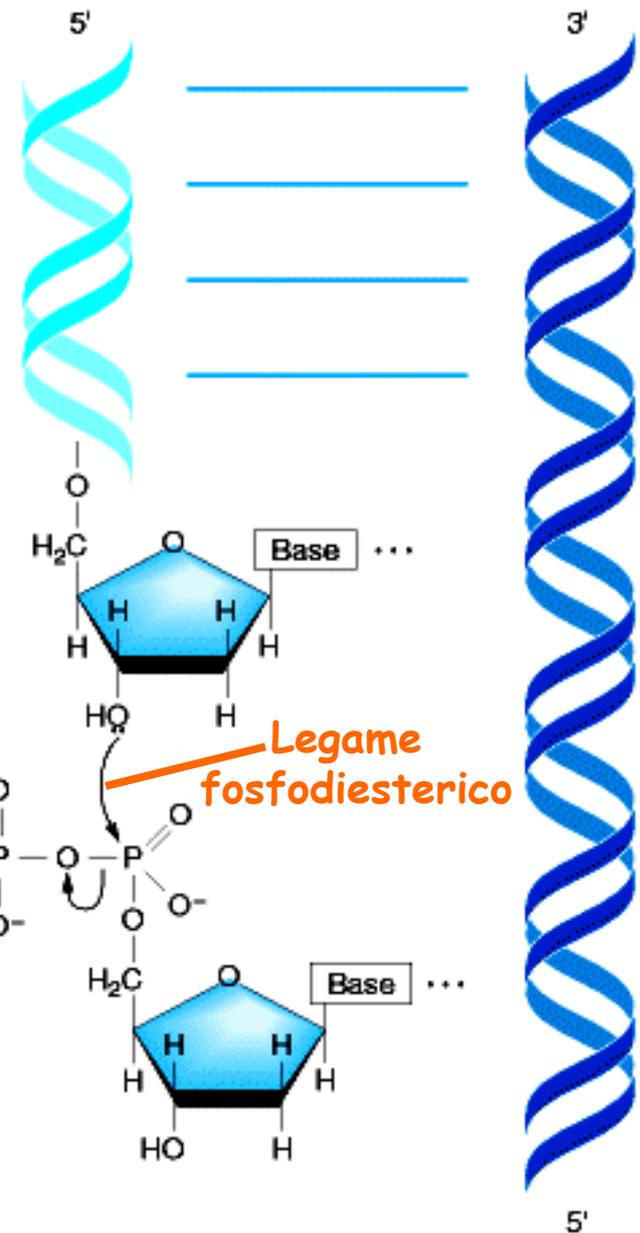
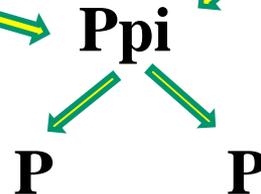


Il legame fosfodiesterico

L'aggiunta dei nucleotidi all'elica nascente richiede ovviamente **energia** che viene **fornita dai nucleotidi stessi**.

Nella reazione di polimerizzazione sono utilizzati **nucleosidi trifosfato** i quali liberano l'energia sufficiente per la formazione del ponte fosfodiesterico in seguito alla rottura del legame ad alta energia esistente tra il **primo P** e gli altri 2

La successiva idrolisi del gruppo Pi-Pi (pirofosfato) rende la reazione irreversibile.



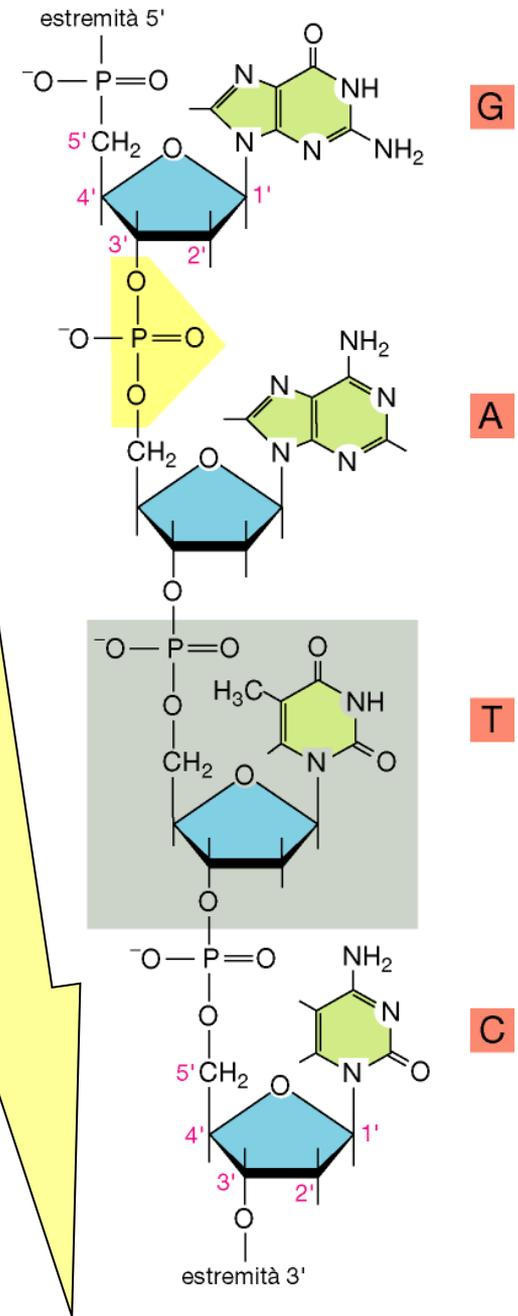
Il legame fosfodiesterico

Le catene di acido nucleico vengono sintetizzate a partire da nucleotidi trifosfato ricchi di **energia**, tramite una reazione di **condensazione** che libera pirofosfato inorganico, mentre si forma il legame fosfodiesterico

Molecole direzionali

Gli acidi nucleici hanno una precisa direzionalità, cioè una polarità strutturale:

- Gli acidi nucleici sono sintetizzati dal 5' al 3'
- la sequenza nucleotidica viene scritta nello stesso ordine



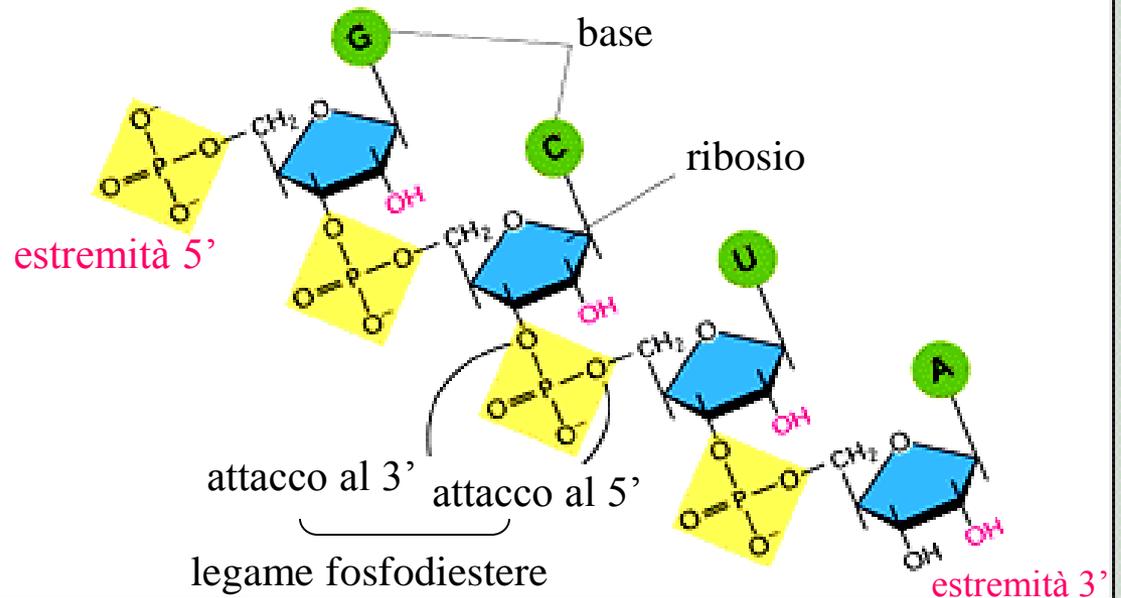
RNA

DNA e RNA

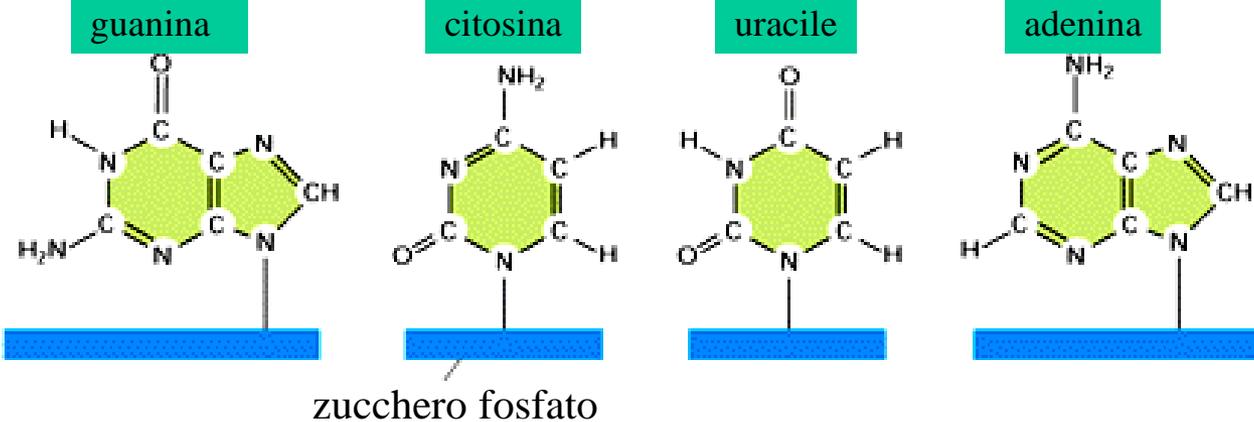
Entrambi sono polimeri lineari di nucleotidi. L'RNA differisce dal DNA in tre modi:

1. contiene ribosio invece di desossiribosio
2. contiene la base uracile (U) al posto della timidina (T)
3. esiste come filamento singolo e non doppio.

OSSATURA DI ZUCCHERI FOSFATI DELL'RNA



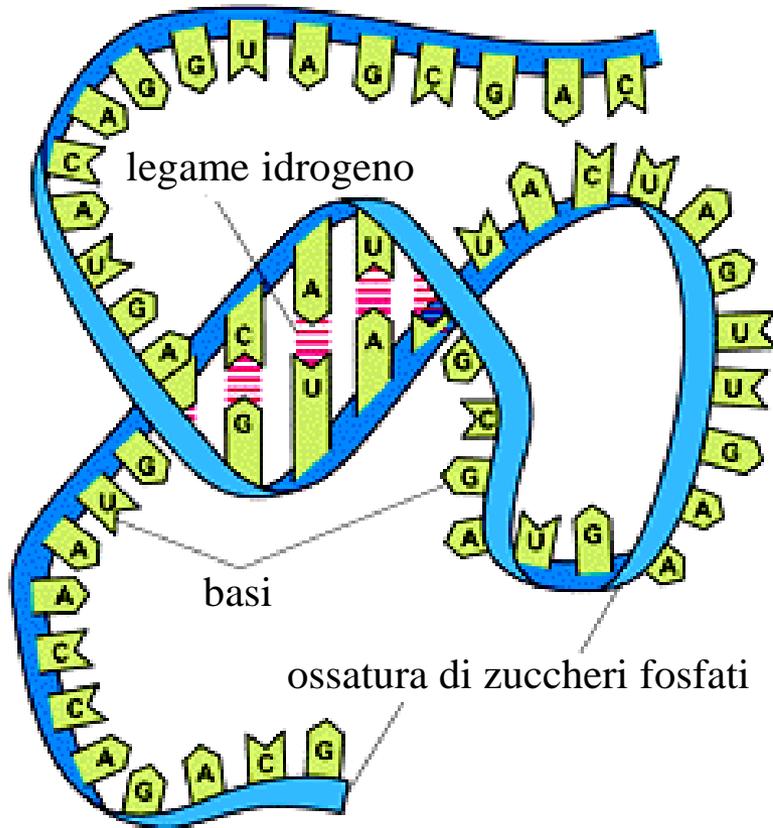
LE QUATTRO BASI DELL'RNA



RNA

SINGOLO FILAMENTO DI RNA

L'RNA è a singolo filamento, ma contiene piccole regioni locali in cui le basi si accoppiano in modo complementare per un processo di ripiegamento casuale. Le regioni in cui le basi sono accoppiate si possono vedere al microscopio elettronico come ramificazioni della catena.

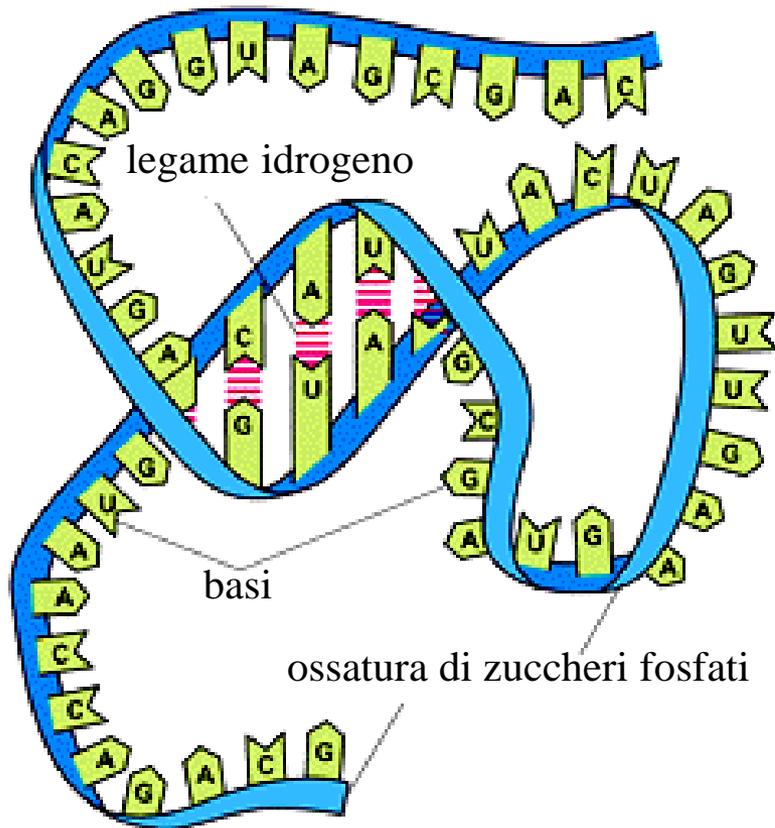


FOTOGRAFIA AL MICROSCOPIO ELETTRONICO DELL'RNA



RNA

Molecola di RNA: una **singola elica** che può assumere una struttura di ordine superiore formando dei tratti a doppio filamento grazie alla formazione di **legami idrogeno intraelica** fra le basi complementari



Distinguiamo diversi tipi di RNA:

1. **rRNA**: sintesi proteica
2. **mRNA**: porta l'informazione
3. **tRNA**: trasporto degli aa sul mRNA
4. **scRNA**: piccoli RNA citoplasmatici: componenti di ribonucleoproteine: es. SRP
5. **snRNA**: splicing
6. **snoRNA**: maturazione dell'rRNA
7. **microRNA (miRNA)**: regolazione dell'espressione genica

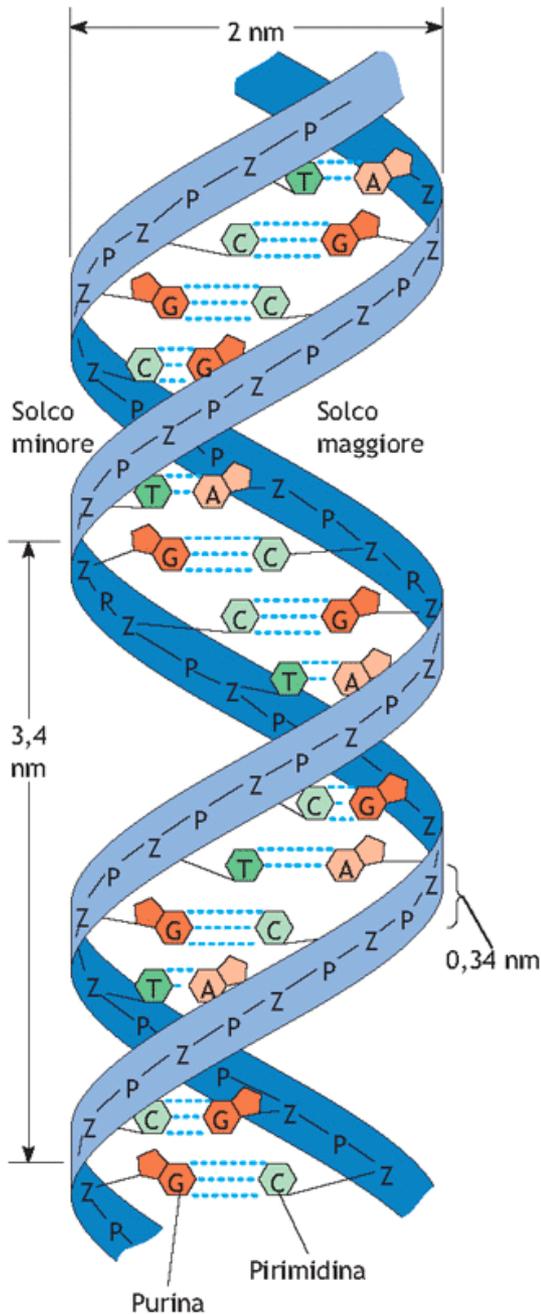
Struttura del DNA

Il DNA è costituito da **2 catene** (eliche) **polinucleotidiche** che sono fra loro **complementari ed antiparallele**.

Questa doppia elica presenta **2 montanti** **zuccheri-fosfato** con carica negativa



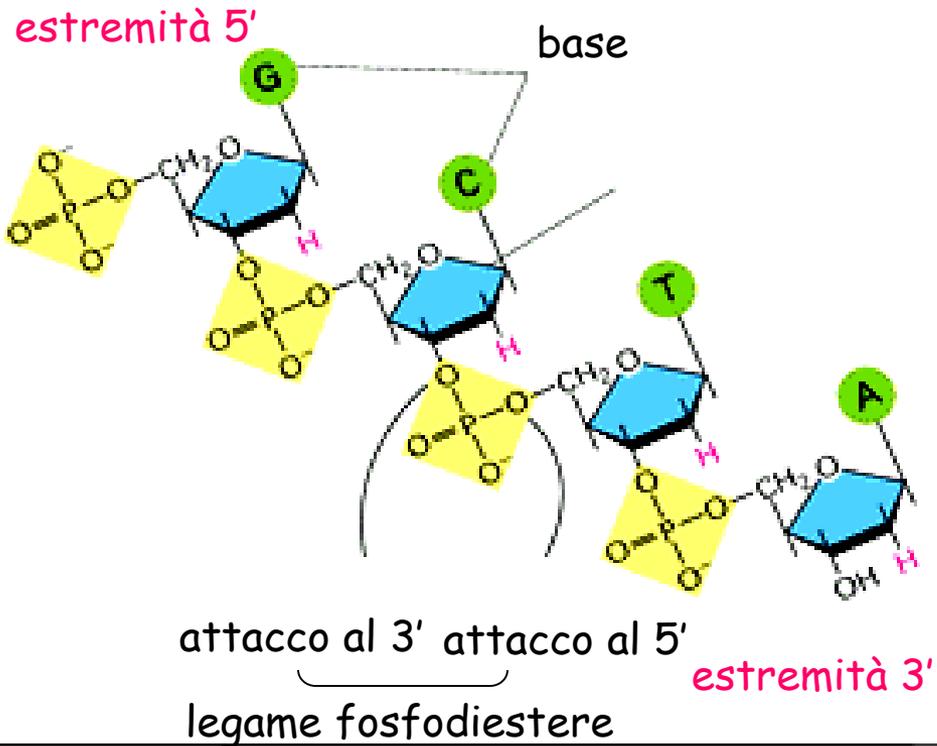
uniti dalle **basi azotate** che si legano con **legami idrogeno** secondo le rigide regole dell'**appaiamento della basi**



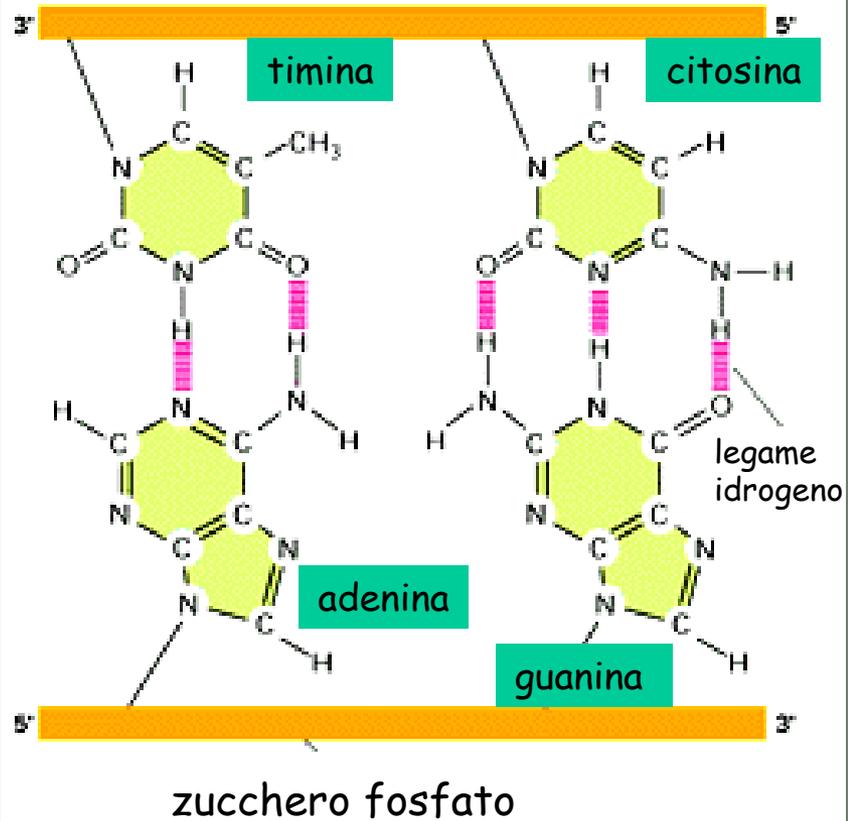
a) Doppia elica

GLI ACIDI NUCLEICI - STRUTTURA DEL DNA

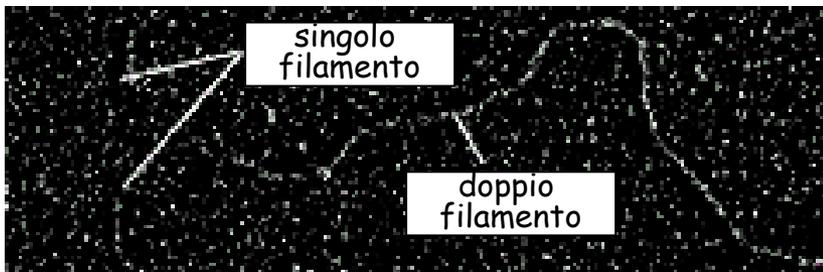
OSSATURA DI ZUCCHERI FOSFATI DEL DNA



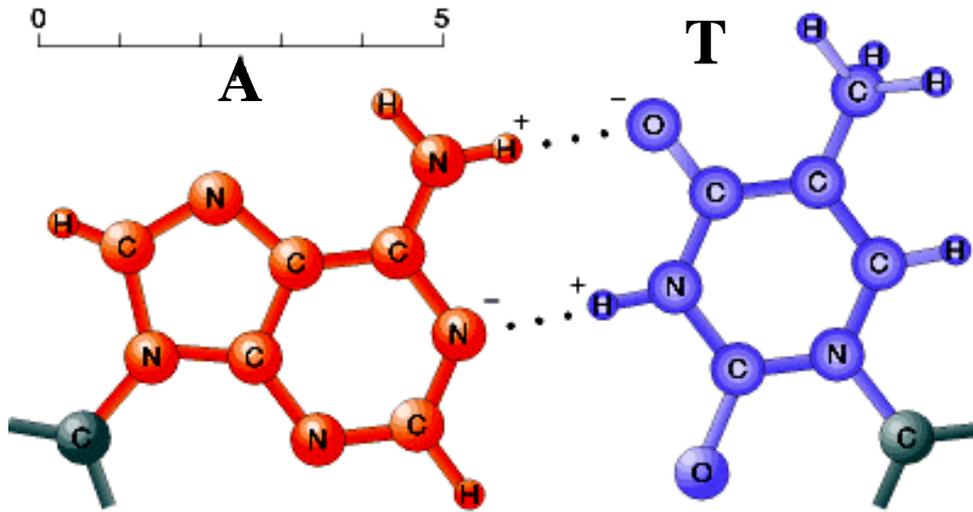
LE QUATTRO BASI DEL DNA ACCOPPIATE



IL DNA AL MICROSCOPIO ELETTRONICO

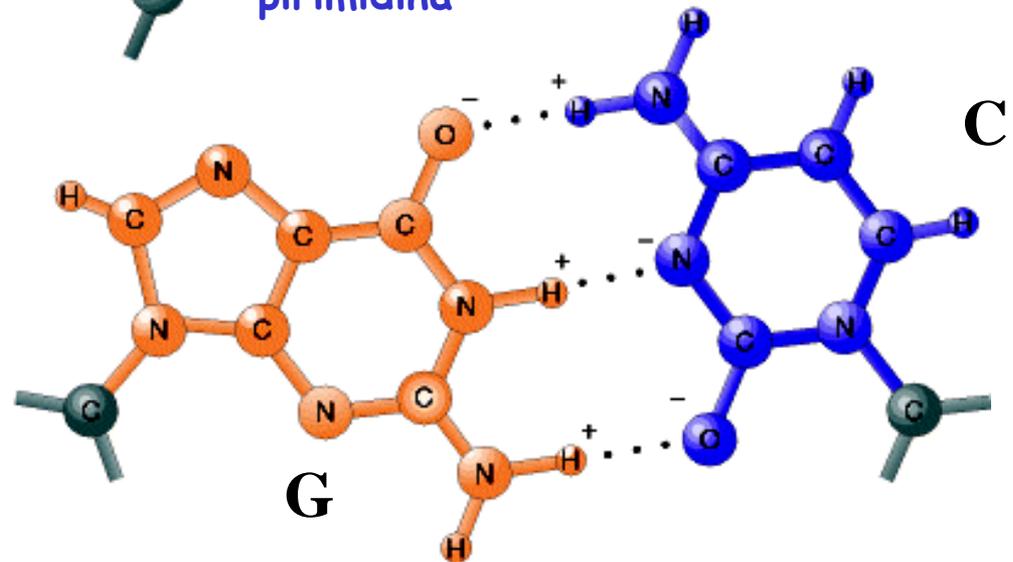


La struttura del DNA: appaiamento della basi



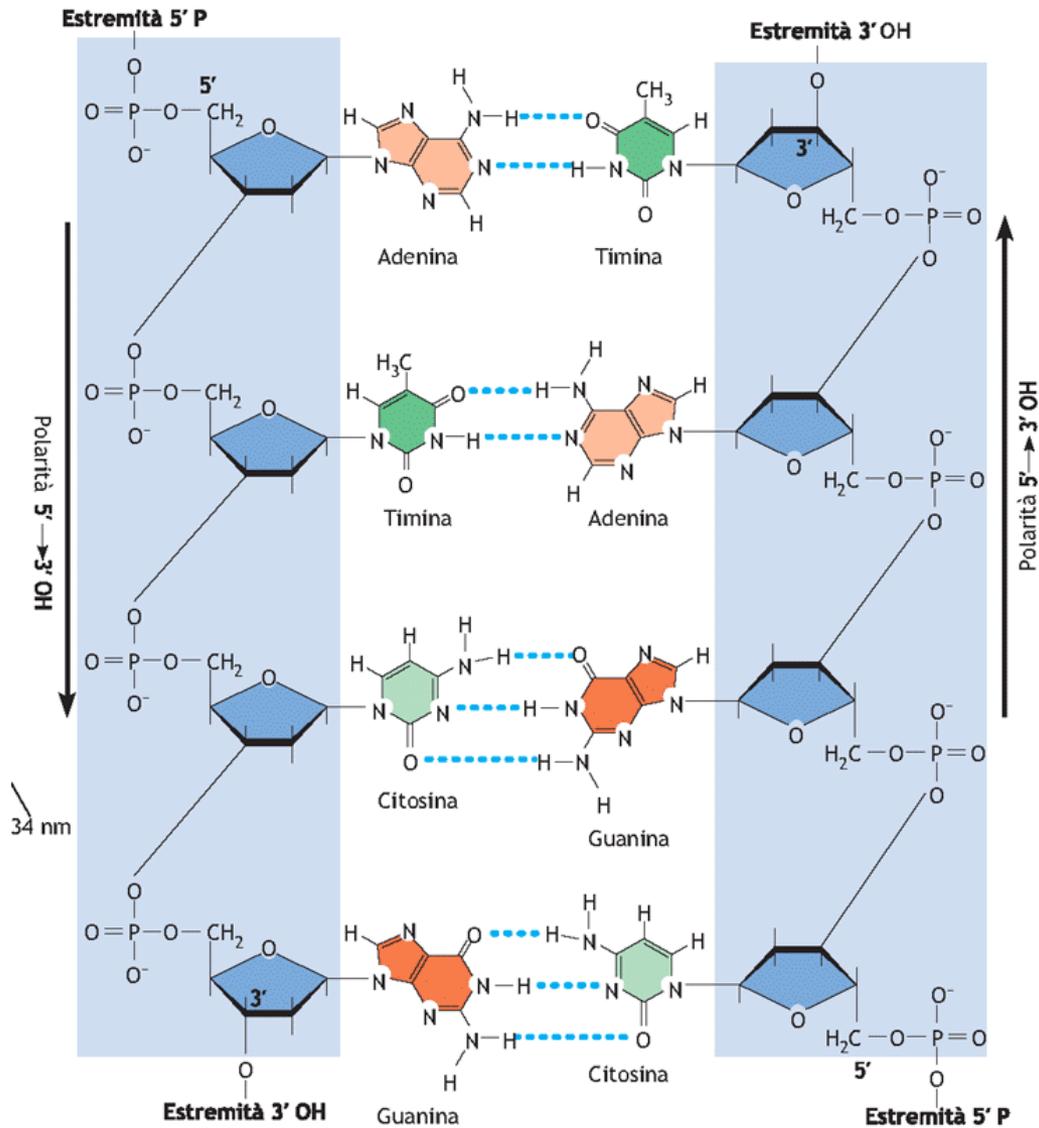
I due filamenti di DNA sono tenuti insieme nella doppia elica da **legami H tra le basi** dei 2 filamenti opposti: pertanto tutte le basi (elementi aromatici con scarsa affinità per l'acqua) sono rivolte verso l'interno dell'elica, mentre l'ossatura Z-P rimane all'esterno
A appaia con T e G con C. In entrambi i casi **una purina si appaia con una pirimidina**

In questa disposizione ogni coppia ha lo stesso ingombro e le due ossature Z-P riescono a mantenere tra loro una **distanza costante**



Come conseguenza di queste **rigide regole di appaiamento**, ogni catena di DNA contiene una **sequenza nucleotidica esattamente complementare** alla sequenza nucleotidica della catena cui si lega: questo fatto ha un'importanza fondamentale per la copiatura del DNA

DNA: eliche antiparallele



Le 2 singole eliche sono antiparallele, questo significa che le eliche corrono in direzioni opposte avendo entrambe la stessa polarità:



b) Orientamento antiparallelo dei filamenti e complementarità delle basi

Struttura del DNA

DNA:

2 catene polinucleotidiche complementari ed antiparallele

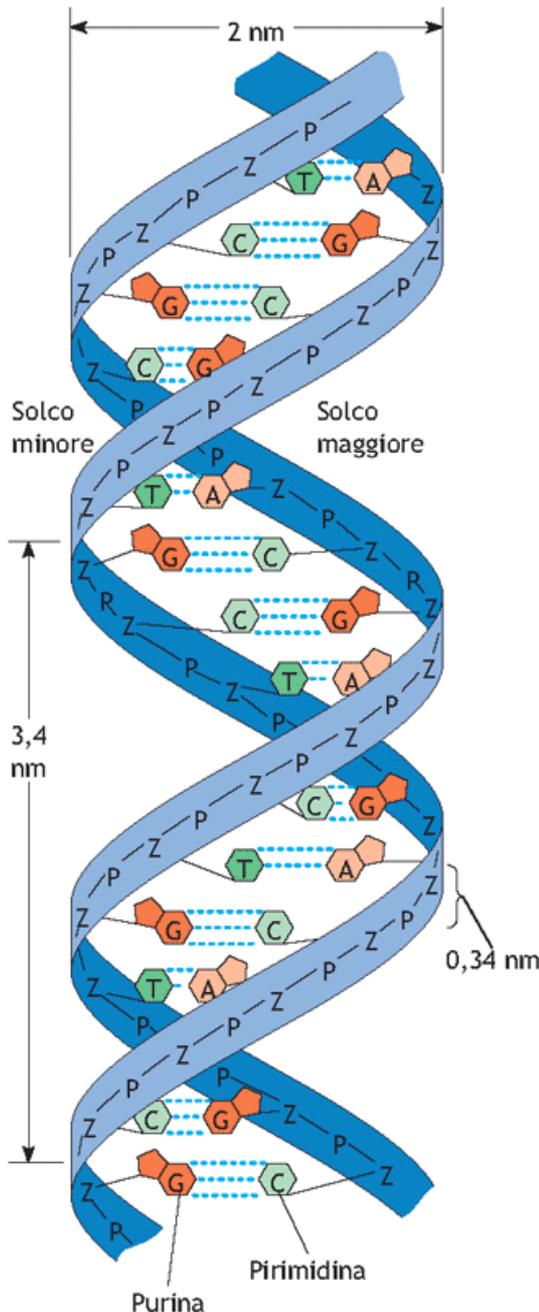
sono avvolte nello spazio, intorno ad un'asse virtuale in modo da formare un'elica avvolta in senso destrorso

Diametro dell'elica: 2 nm

Per rispettare la distanza del diametro tra le due eliche complementari se su un'elica è presente una purina su quella complementare ci deve essere una pirimidina.

Non possono affrontarsi 2 purine o due pirimidine quindi il numero delle purine è uguale al numero delle pirimidine.

Coppie canoniche: $\begin{array}{l} \longrightarrow \\ \searrow \end{array}$ T-A (2 legami-H)
G-C (3 legami-H)

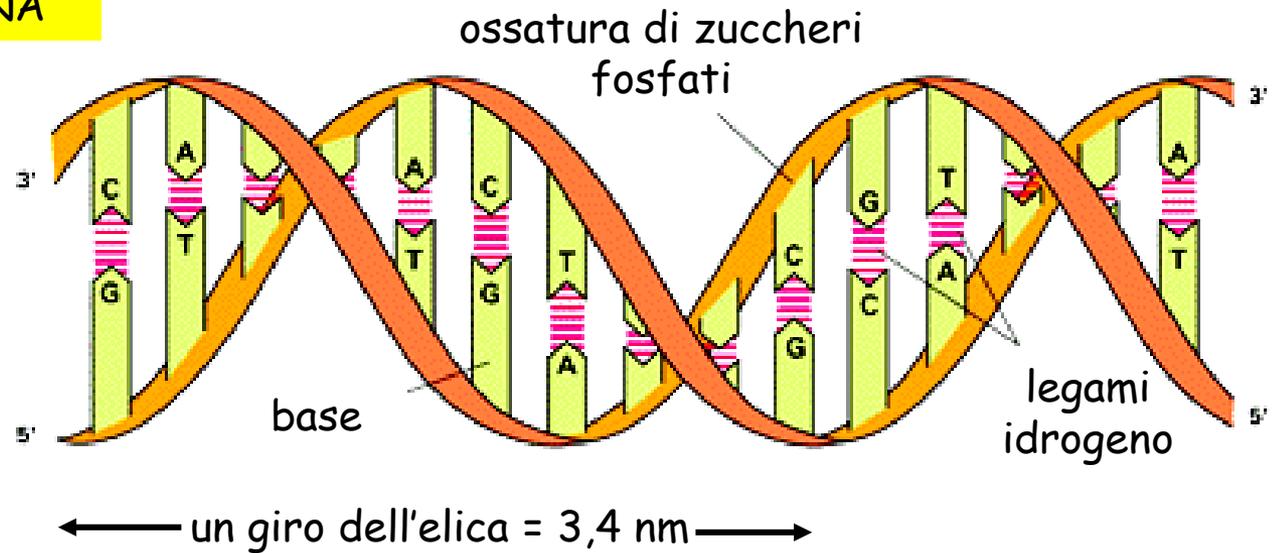


a) Doppia elica

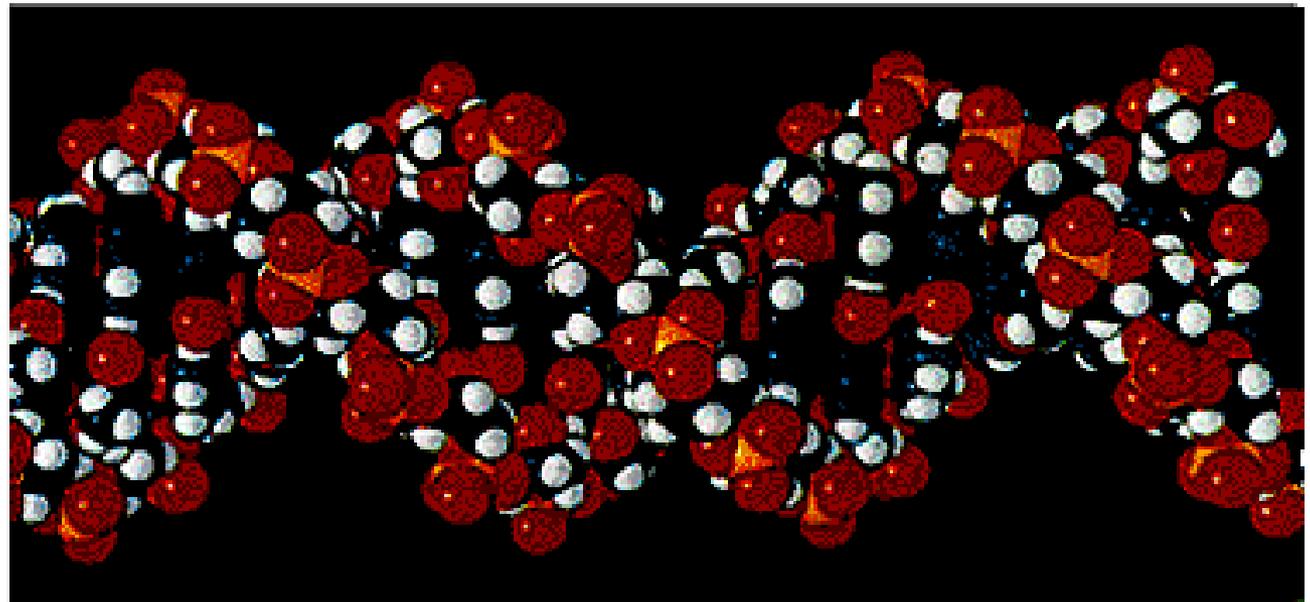
GLI ACIDI NUCLEICI - STRUTTURA DEL DNA

LA DOPPIA ELICA DEL DNA

In una molecola di DNA due filamenti antiparalleli con sequenza nucleotidica complementare sono accoppiati in una doppia elica destrorsa con circa 10 nucleotidi per giro.



Modello a spazio pieno del DNA.



fessura principale

fessura secondaria

Acidi nucleici: le basi azotate contengono l'informazione genetica

In una singola catena si identifica uno

scheletro di zuccheri e fosfati

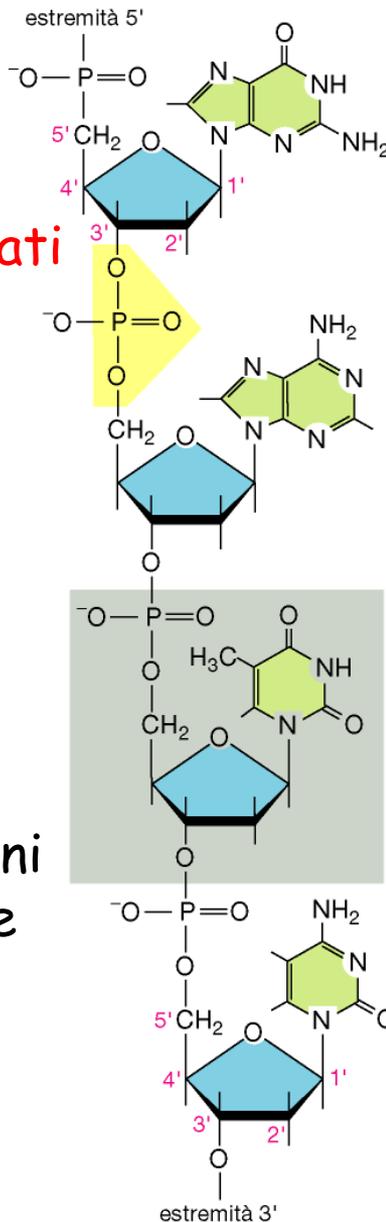
Da questo scheletro

sporgono le **basi azotate**

E' proprio nella sequenza delle basi azotate che è contenuta

l'informazione genetica

ovvero tutte le informazioni necessarie per costruire le proteine che saranno utilizzate per la vita della cellula e dell'intero organismo



G

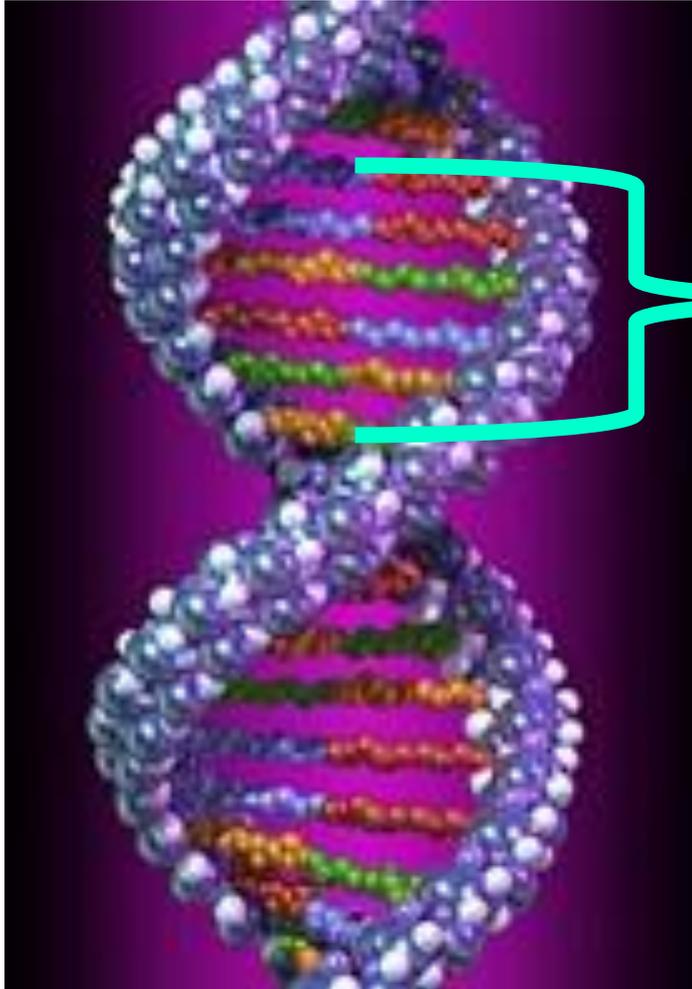
A

T

C

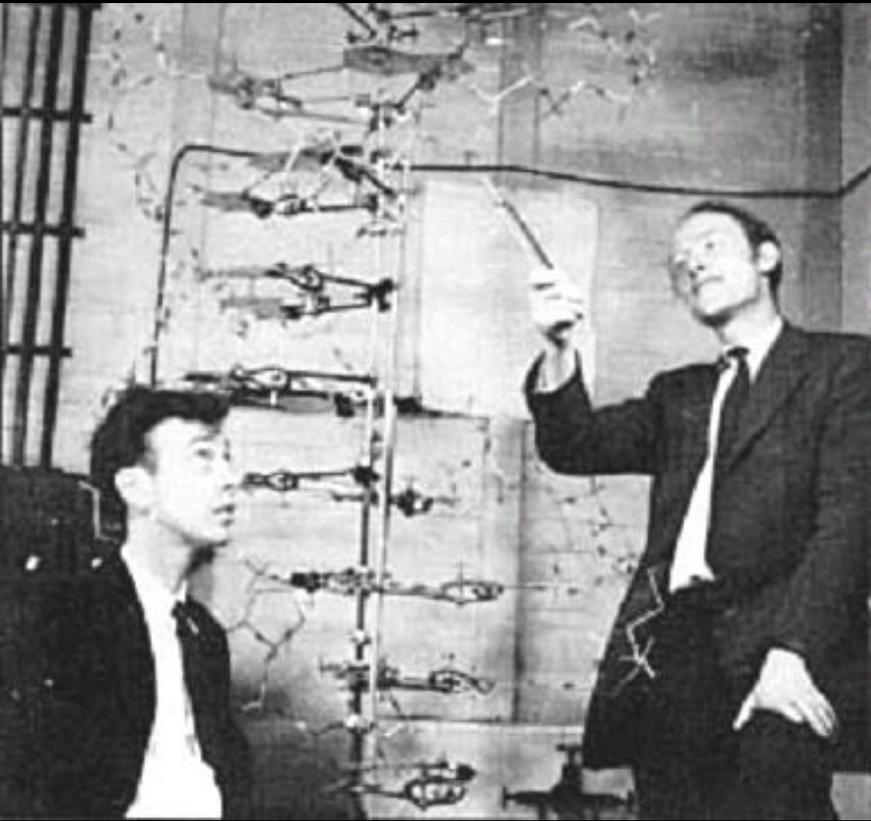
Ruolo più importante dei nucleotidi: immagazzinare e rendere disponibile **l'informazione genetica**

La sequenza di un gene e' data dalla sequenza delle 4 basi azotate all'interno della doppia elica



Timina
Timina
Guanina
Citosina
Adenina
Guanina

La struttura del DNA



La scoperta della struttura del DNA avvenne alla Cambridge University nel 1953, da parte dell'americano **James D. Watson**, ed un inglese, **Francis H. Crick**. Il loro modello per la struttura del DNA era principalmente basato su studi di diffrazione dei raggi X, ottenuti da da Maurice Wilkins e Rosalind Franklin.

La struttura del DNA

DNA: struttura a spirale. I 2 filamenti avvolgendosi uno sull'altro determinano 2 solchi nell'elica

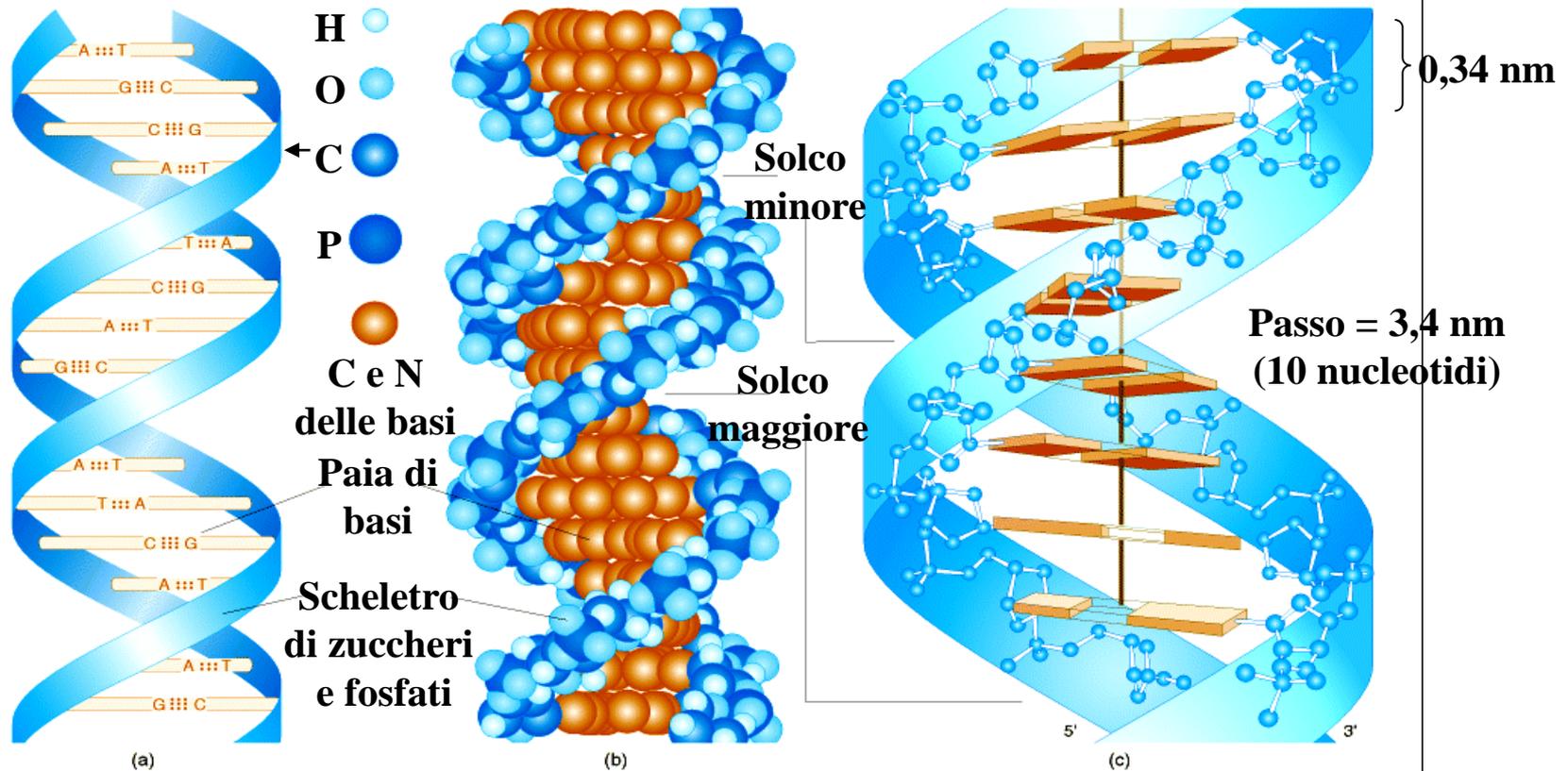
Basi all'interno: Z-P all'esterno

Il piano delle basi è perpendicolare all'asse dell'elica

Piano dei Z-P: un angolo quasi retto con quello delle basi

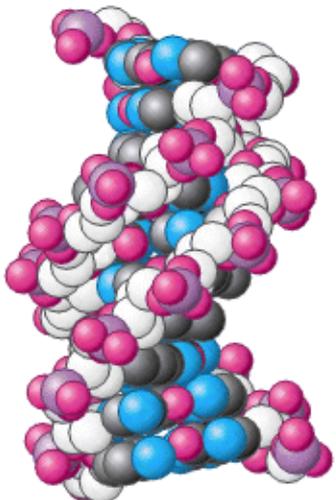
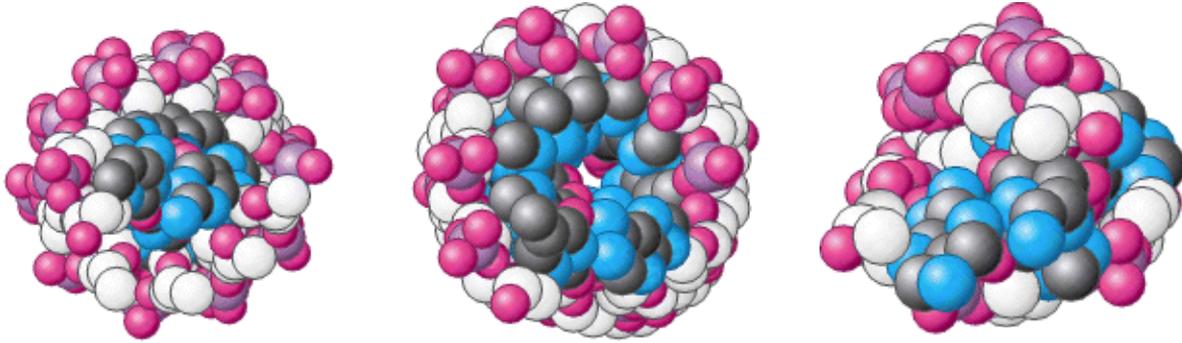
Diametro dell'elica: 2 nm

1 nm = 10 Å



Basi adiacenti sono separate da 0,34 nm lungo l'asse dell'elica e formano tra loro un angolo di 36°. La struttura dell'elica si ripete quindi dopo 10 residui di ciascuna catena.

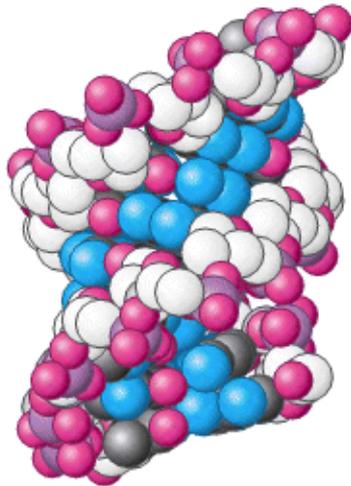
Le diverse forme del DNA



FORMA B



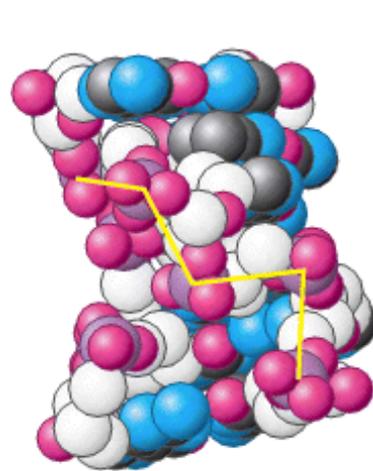
Normale doppia elica in condizioni tipiche delle cellule viventi



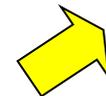
FORMA A



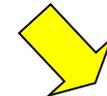
L'elica ha le basi inclinate ed una profonda scanalatura principale e si forma in condizioni disidratanti



FORMA Z



DNA-Z: si origina in regioni di DNA che presentano citosine metilate. La sua presenza è associata alla regolazione della trascrizione.



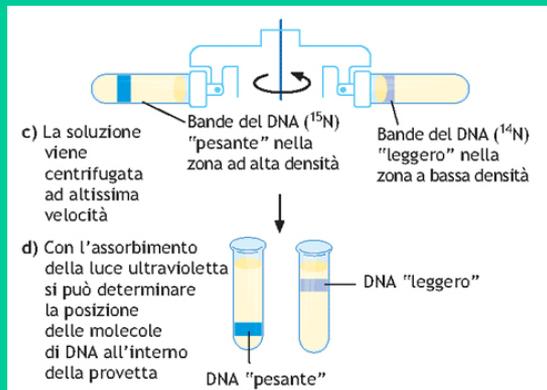
L'elica è avvolta nella direzione opposta (sinistrorsa). Si forma a concentrazioni elevate di sale e richiede molte coppie alternate C-G e G-C

Le proprietà fisiche del DNA

1. Densità
2. Viscosità
3. Denaturazione e rinaturazione
4. Assorbanza

1. Densità:

La diversa composizione in basi del DNA si riflette nella diversa capacità di disporsi in un gradiente di densità. Le molecole di DNA si troveranno nella zona di gradiente con equivalente densità. La densità è influenzata dalla conc. in CG

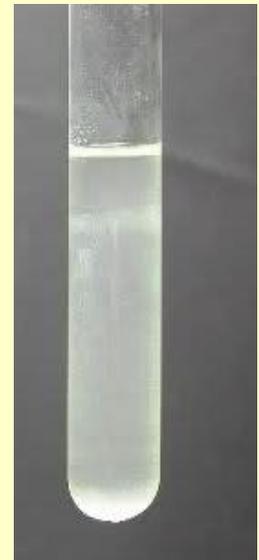


2. Viscosità:

La viscosità di una soluzione è data dal rapporto massa/volume

Una soluzione contenente DNA ha una viscosità elevata,

che diminuisce con la denaturazione



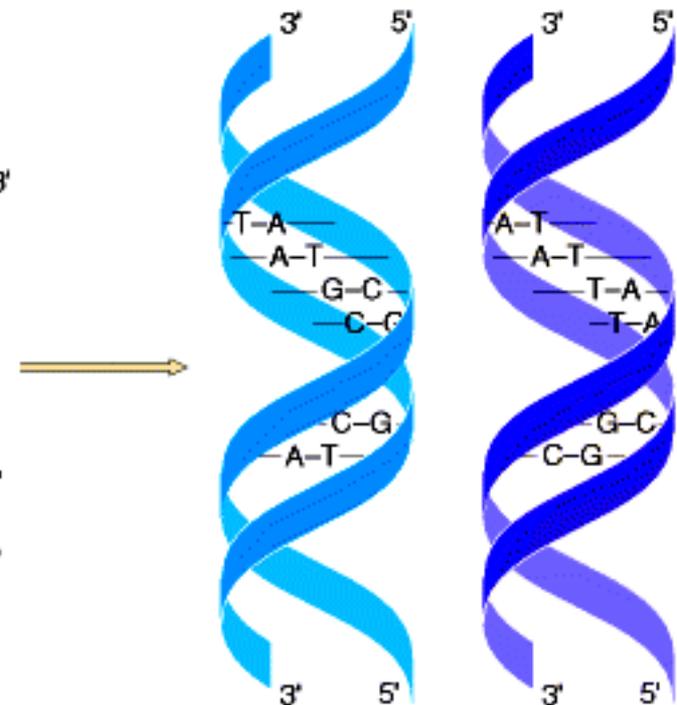
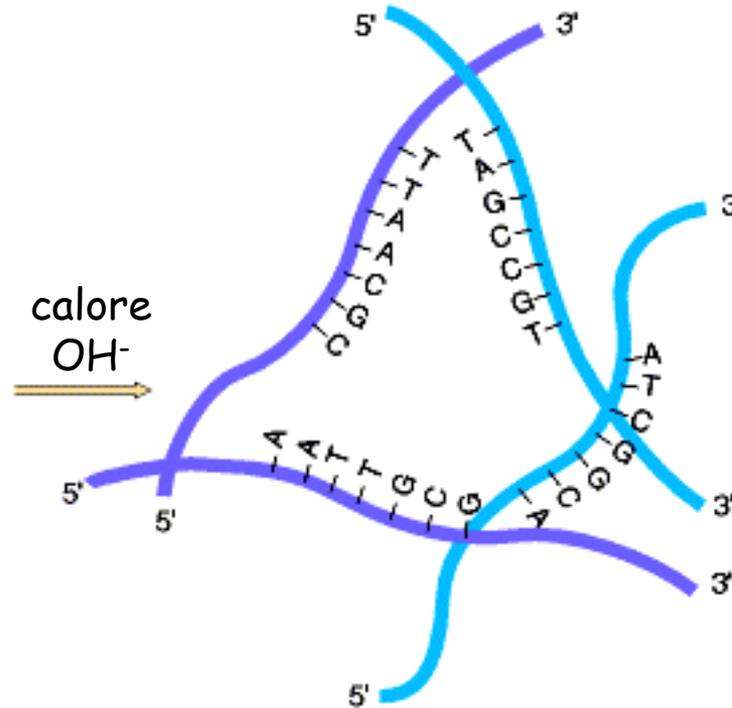
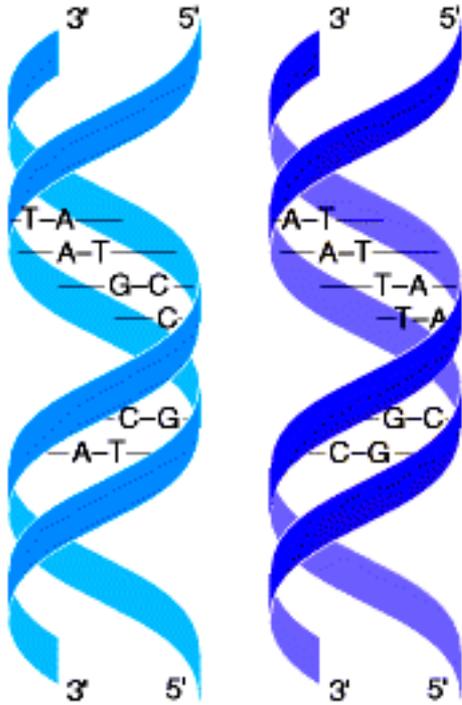
Le proprietà fisiche del DNA

3. Denaturazione e rinaturazione

A 100°C tutti i legami idrogeno si rompono e il DNA diventa singolo a filamento.

DENATURAZIONE

RINATURAZIONE



STATO NATIVO

STATO DENATURATO

STATO RINATURATO

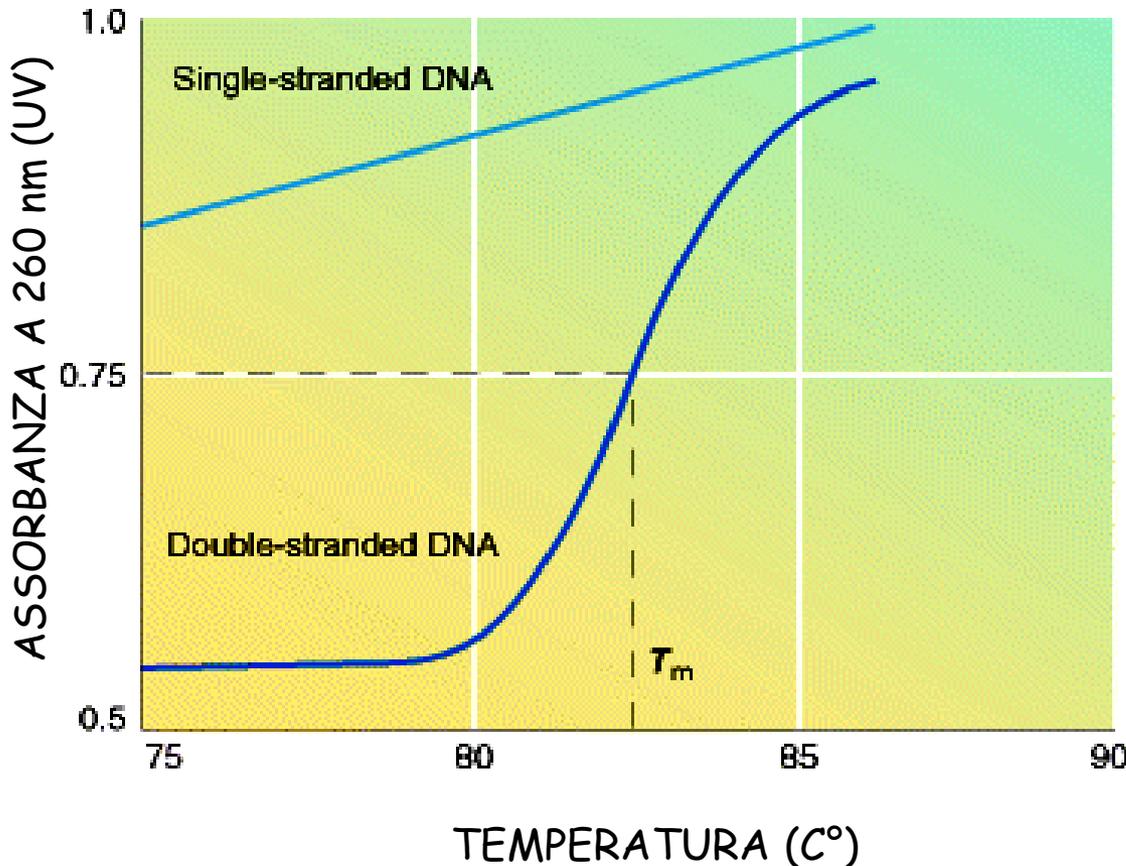
Se il DNA è lasciato a raffreddare lentamente le due emieliche si riappaiano di nuovo correttamente.

Le proprietà fisiche del DNA

4. Assorbanza

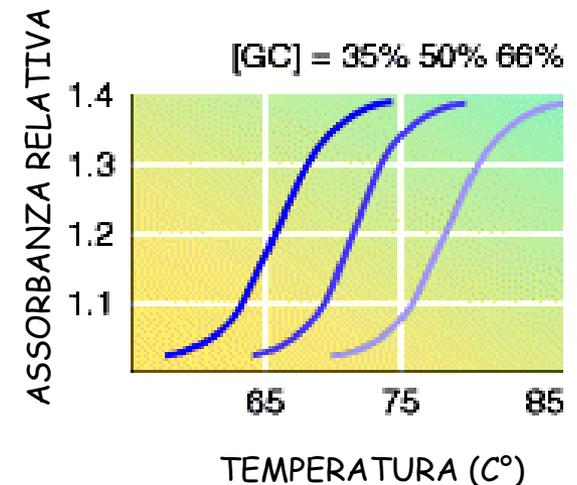
L'assorbanza del DNA aumenta con l'aumentare della denaturazione.

Infatti, i singoli filamenti di DNA hanno una assorbanza maggiore rispetto al doppio filamento di DNA.



Curva di denaturazione del DNA

La T_m dipende dal contenuto di C-G (3 legami idrogeno)



La T_m (temperatura di melting, fusione) rappresenta la temperatura in cui il 50% del DNA risulta denaturato.

Identificazione del DNA come materiale genetico

Nonostante il **DNA** fosse noto sin dal 1868, la sua identificazione come **materiale genetico** è avvenuta solo nel 1944 ed è intimamente legata agli studi sulla virulenza del microrganismo, il *Diplococcus pneumoniae*, o più semplicemente pneumococco, che causa la polmonite nei mammiferi. I pneumococchi possono esistere in 2 varietà:

- 1) **S: virulenta**, provvista di una capsula polisaccaridica di rivestimento che ne impedisce la fagocitosi;
- 2) **R: non virulenta**, sprovvista di capsula.

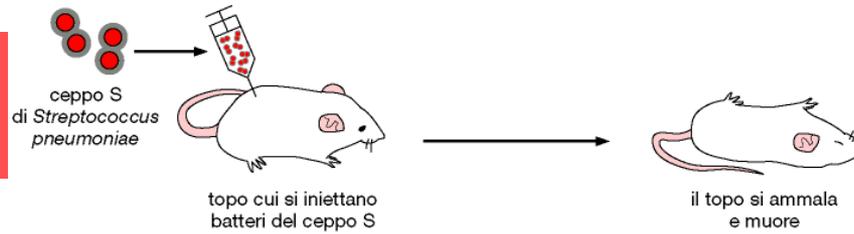
1. **Esperimento di Griffith, 1928** (1 DIA)

2. **Esperimento di O. Avery, C. MacLeod, M. McCarty, 1944** (2 DIA)

3. **Esperimento di Hershey e Chase, 1953** (3 DIA)

Identificazione del DNA come materiale genetico: Esperimento di Griffith, 1928

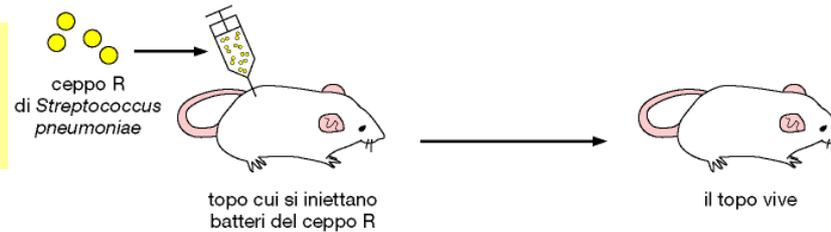
Iniezione del ceppo virulento S



Topo muore



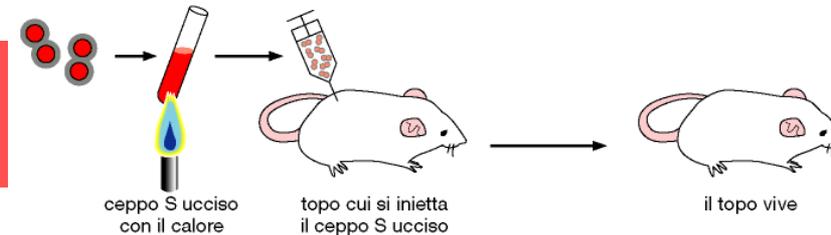
Iniezione del ceppo non virulento R



Topo vive



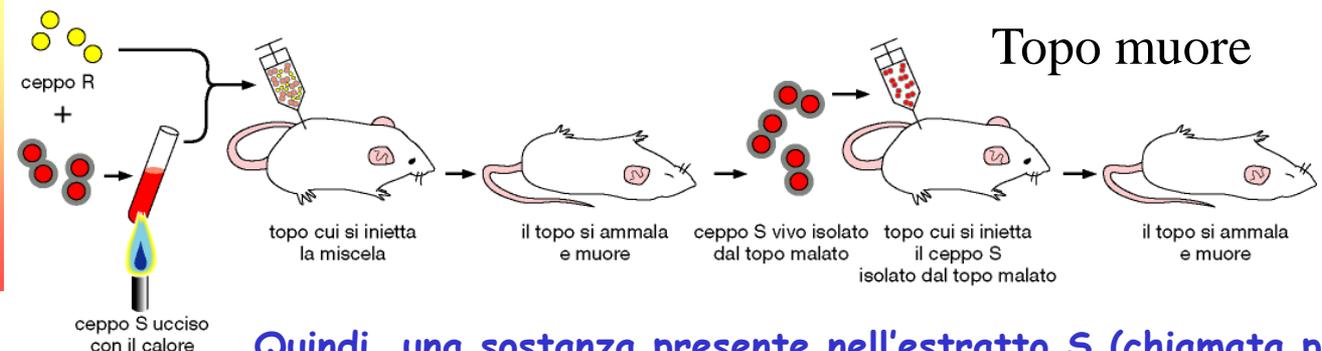
Iniezione del ceppo virulento S ucciso



Topo vive



Iniezione del ceppo non virulento R + ceppo virulento S ucciso



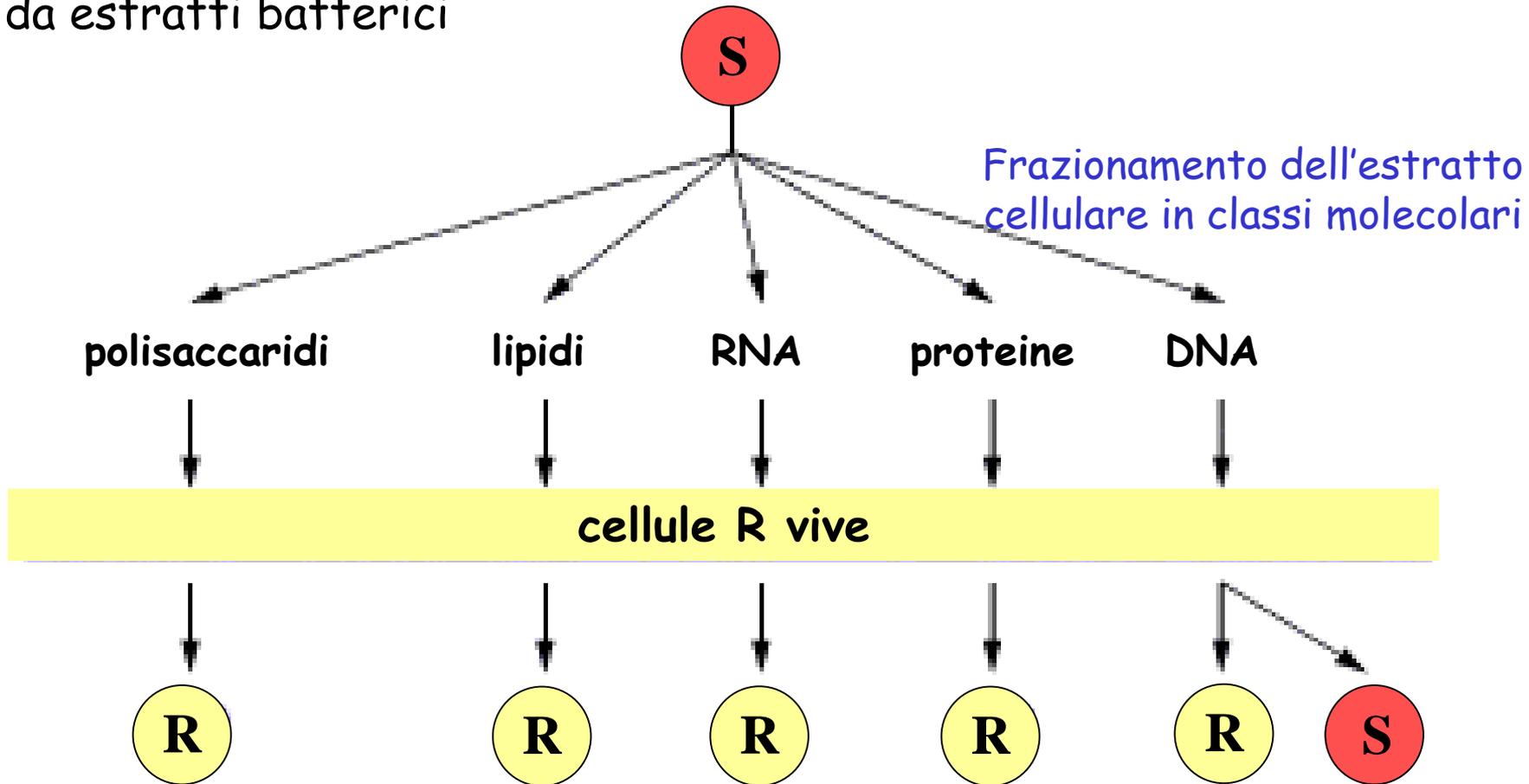
Topo muore



Quindi, una sostanza presente nell'estratto S (chiamata principio trasformante) era responsabile per l'induzione della trasformazione genetica dei batteri R in S.

Identificazione del DNA come materiale genetico Esperimento di O. Avery, C. MacLeod, M. McCarty, 1944

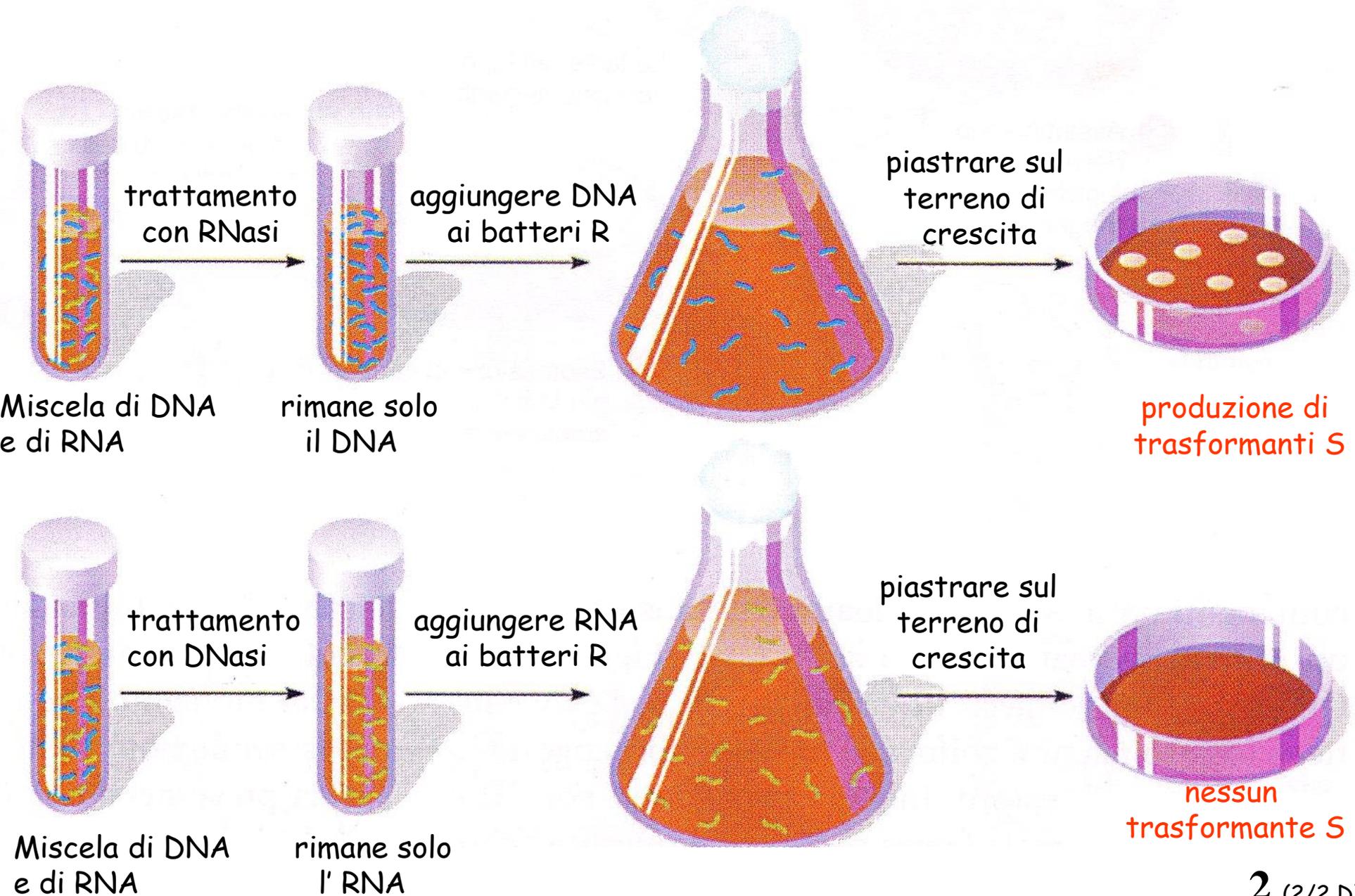
Stabilirono che il principio trasformante era il DNA, purificandolo da estratti batterici



Il DNA della specie patogena veniva assunto dalla specie innocua e trasmesso fedelmente alle generazioni batteriche successive

Identificazione del DNA come materiale genetico

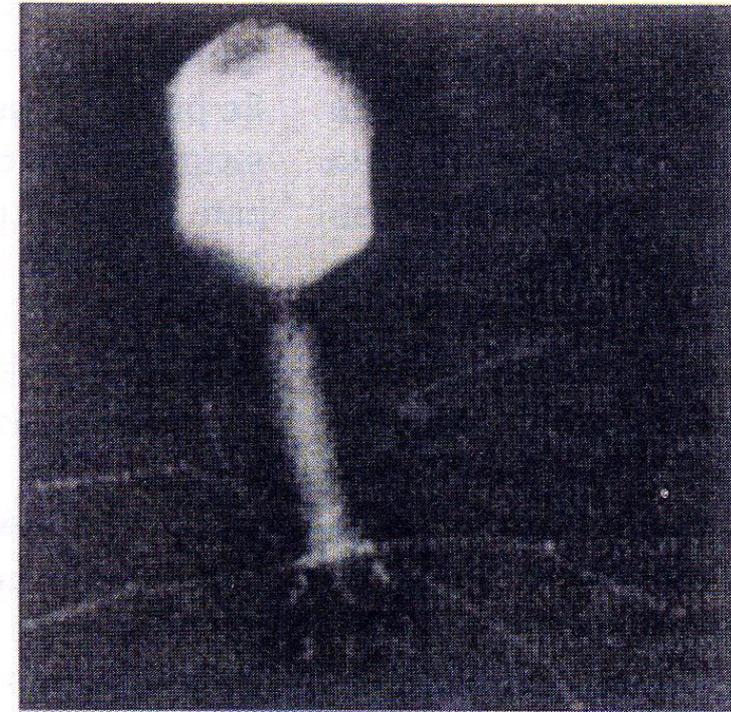
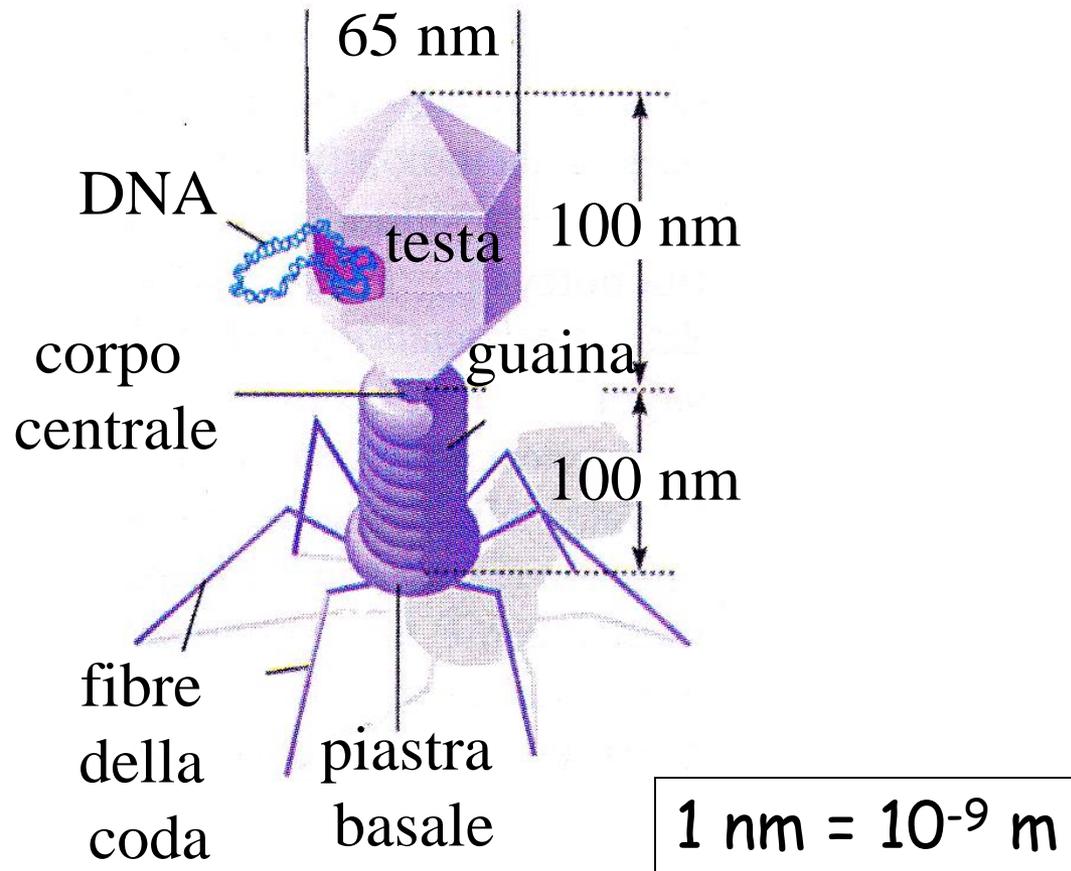
Esperimento di O. Avery, C. MacLeod, M. McCarty, 1944



Identificazione del DNA come materiale genetico

Esperimento di Hershey e Chase

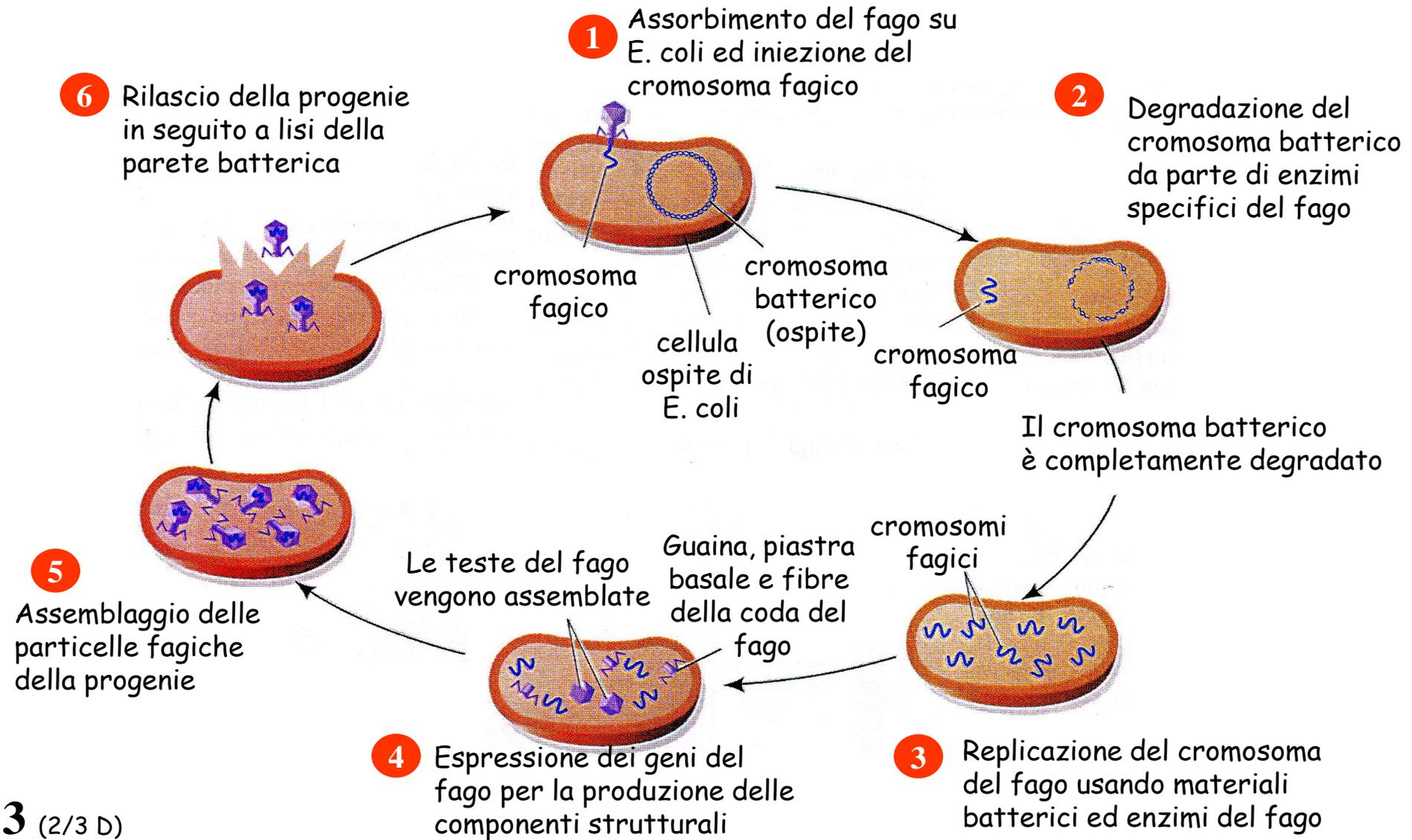
Alfred Harshey e Martha Chase stavano studiando nel 1953 un batteriofago chiamato T2.



Fotografia al M.E. del batteriofago T2

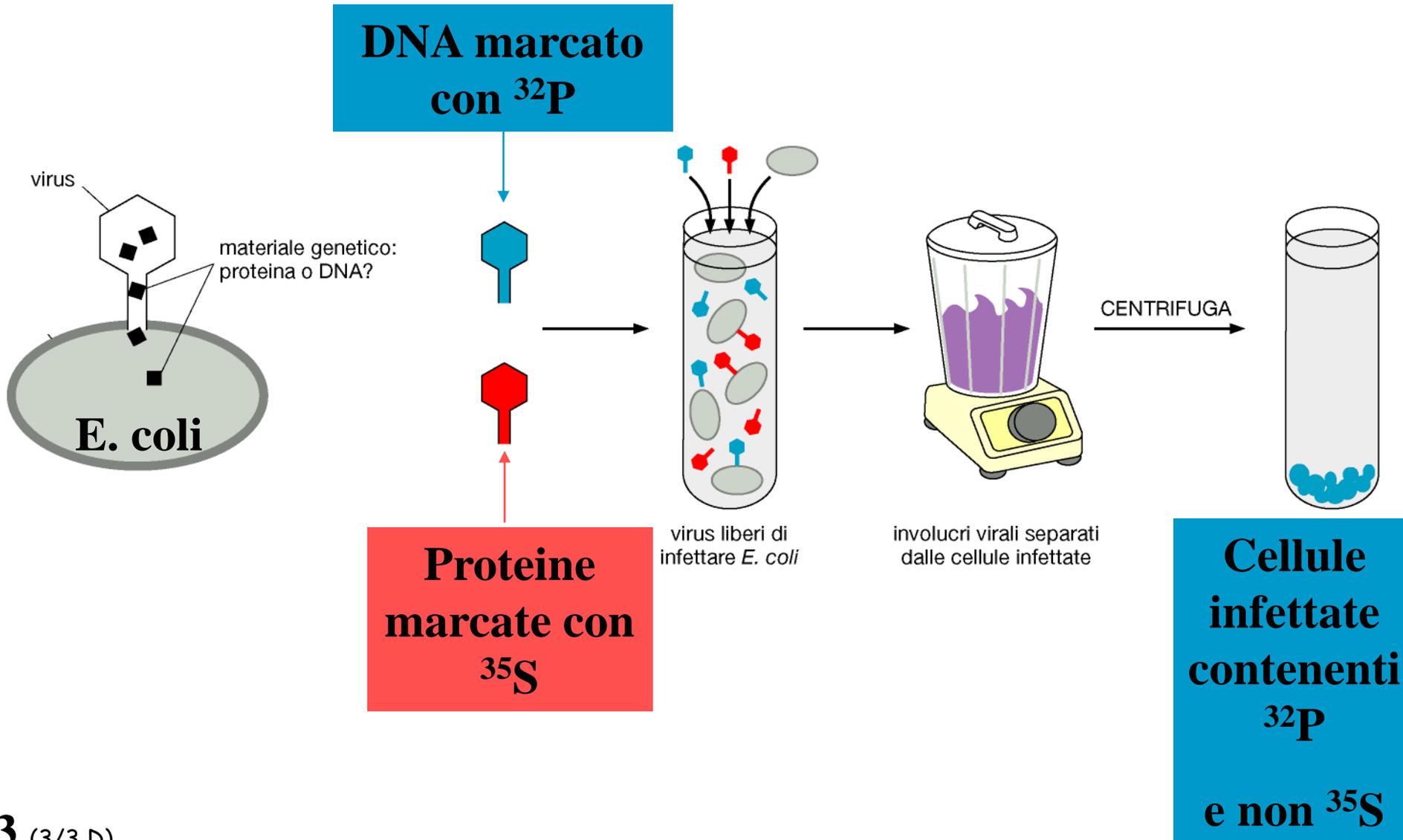
Identificazione del DNA come materiale genetico: Esperimento di Hershey e Chase

Hershey e Chase sapevano che il virus T2 era costituito soltanto da DNA e proteine e che il virus era in qualche modo capace di usare il proprio materiale genetico per riprogrammare la cellula ospite per farle produrre nuovi fagi. Tuttavia, non erano a conoscenza di quale dei due componenti, DNA o proteine, fosse la causa.



Identificazione del DNA come materiale genetico

Esperimento di Hershey e Chase



Le macromolecole - acidi nucleici

Tra le 4 famiglie principali di piccole molecole organiche contenute nelle cellule, ora trattiamo i **nucleotidi**.

I **nucleotidi** si possono associare in lunghe catene formando gli **acidi nucleici**.

Unendo semplicemente i **nucleotidi** con legami **legami fosfodiesterici** in lunghe catene si formano le macromolecole cellulari: gli **acidi nucleici**

Le reazioni chimiche con cui vengono aggiunti i **nucleotidi** agli **acidi nucleici** presentano importanti caratteristiche comuni alla polimerizzazione delle altre macromolecole (polisaccaridi, proteine).

L'acido nucleico si allunga applicando un nuovo **nucleotide** all'estremità di una catena polimerica in crescita mediante una reazione di condensazione

In tutti i casi la reazione è catalizzata da **enzimi** che garantiscono l'incorporazione esclusiva del **nucleotide** del tipo giusto

Le macromolecole - acidi nucleici

La polimerizzazione, un **nucleotide** alla volta, in una catena lunga è un procedimento semplice per fabbricare una molecola grande e complessa, dato che ogni elemento viene ad aggiungersi grazie alla stessa reazione eseguita ripetutamente dalla stessa batteria enzimatica

Gli **acidi nucleici** vengono sintetizzati impiegando **4 nucleotidi leggermente diversi tra loro**; inoltre nella catena polimerica le subunità non vengono montate a caso, ma in un ordine particolare: **la sequenza nucleotidica**

La funzione biologica degli **acidi nucleici** dipende rigidamente dalla specifica **sequenza** delle subunità nella catena lineare. Per questo l'apparato che polimerizza deve sottostare a un controllo molto fine e determinare con esattezza la subunità da collocare volta per volta nel polimero in crescita

Compattamento del DNA:

Cromosomi

Cromatina

Telomeri e centromero

Organizzazione dei genomi:

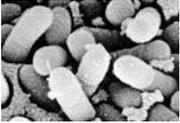
Introni ed esoni

Sequenze spaziatrici

DNA ripetuto: satelliti, LINES e SINES

ORGANIZZAZIONE SUPERELICOIDALE DEL DNA: I CROMOSOMI

Discrepanza tra la lunghezza del DNA di una cellula e lo spazio estremamente limitato in cui tale DNA deve essere accolto:

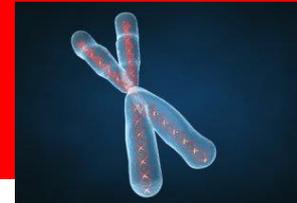
Cellula	Dimensioni del materiale genetico (mm)	Dimensioni della cellula (mm)	Riduzione
Batteriofago T4 	0,06	0,00008	ridotto di 750 volte
Escherichia coli 	1	0,004	250 volte più lungo della cellula che lo contiene
Nucleo di una cellula aploide umana 	3×10^9 nucleotidi (in forma completamente distesa: 1,7 metri = 1700 mm)	0,005	350.000 volte superiore al diametro del suo contenitore

ORGANIZZAZIONE SUPERELICOIDALE DEL DNA: I CROMOSOMI

La **superspiralizzazione** della doppia elica intorno al proprio asse è la soluzione universalmente adottata per concentrare il materiale genetico in un volume relativamente limitato

Le strutture tridimensionali, di diversa grandezza e complessità, generate dalla organizzazione superelicoidale della doppia elica e/o dalla associazione del DNA con proteine che fungono da "rocchetti" di avvolgimento della doppia elica, sono definite

CROMOSOMI

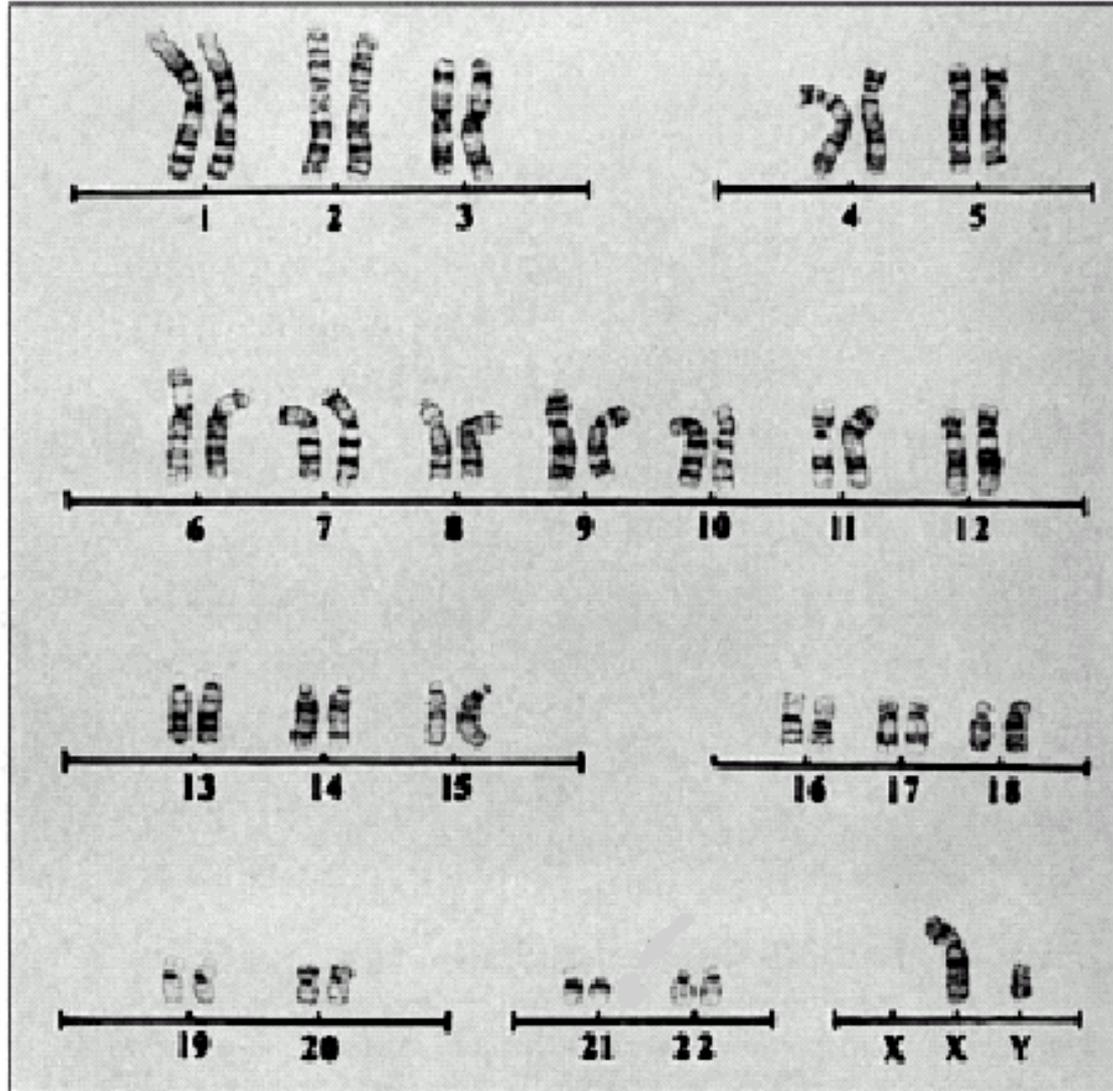
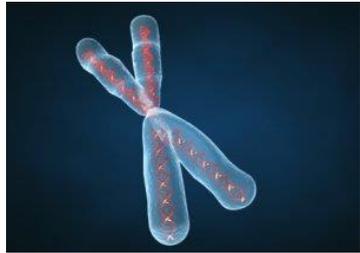


1. Cellule **procariotiche** e **organelli** citoplasmatici delle cellule eucariotiche (mitocondri, cloroplasti) hanno **un singolo cromosoma**
2. Le cellule procariote possono contenere, oltre al cromosoma principale, una o più copie di piccoli cromosomi accessori definiti **plasmidi** che sono implicati nei fenomeni di resistenza agli antibiotici e di sessualità
3. Il patrimonio genetico delle cellule **eucariotiche**, diversamente da quello dei procarioti, è ripartito in un numero definito e costante di cromosomi uguali a due a due, detto

numero cromosomico diploide

L'organizzazione superelicoidale del DNA: i cromosomi

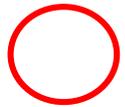
I cromosomi umani. Il carigramma

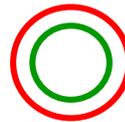


L'organizzazione superelicoidale del DNA: i cromosomi

Il DNA dei cromosomi dei virus e dei plasmidi

I **cromosomi virali** hanno una notevole eterogeneità per quanto riguarda forma e dimensioni del DNA. In rapporto alla forma del DNA i cromosomi possono essere distinti in alcune classi principali:

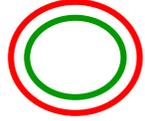
1. Cromosomi **circolari a filamento unico**  dove gli estremi 5' e 3' sono saldati covalentemente.

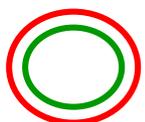
2. Cromosomi **circolari a doppia elica**  in cui le estremità 5' e 3' di ciascuno dei due filamenti sono saldate ad anello chiuso.

3. Cromosomi **lineari a filamento unico** 

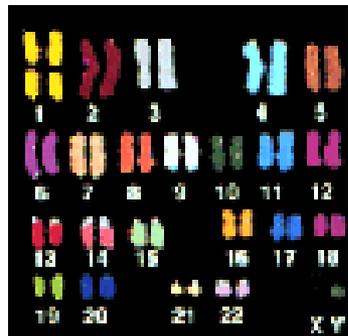
4. Cromosomi **lineari a doppia elica ad estremità tronche** 

5. Cromosomi **lineari a doppia elica ad estremità coesive**  che possono circularizzare

Il DNA dei **cromosomi batterici**  circolari a doppia elica

Il DNA dei **cromosomi mitocondriali e cloroplastici**  circolari a doppia elica

Il DNA dei **cromosomi degli eucarioti** numero definito e costante di cromosomi uguali a due a due, detto **numero cromosomico diploide**



Compattamento del DNA:

Cromosomi

Cromatina

Telomeri e centomero

Organizzazione dei genomi:

Introni ed esoni

Sequenze spaziatrici

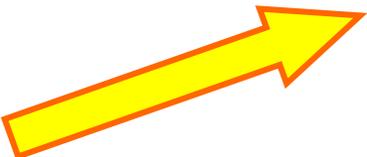
DNA ripetuto: satelliti, LINES e SINES

Cromatina

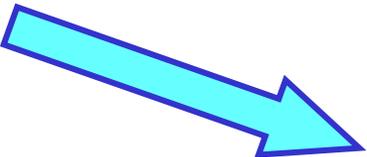
Il complesso tra DNA eucariotico e proteine si chiama **cromatina**.

Le proteine principali della cromatina sono gli **istoni**.

1. H1
2. H2A
3. H2B
4. H3
5. H4

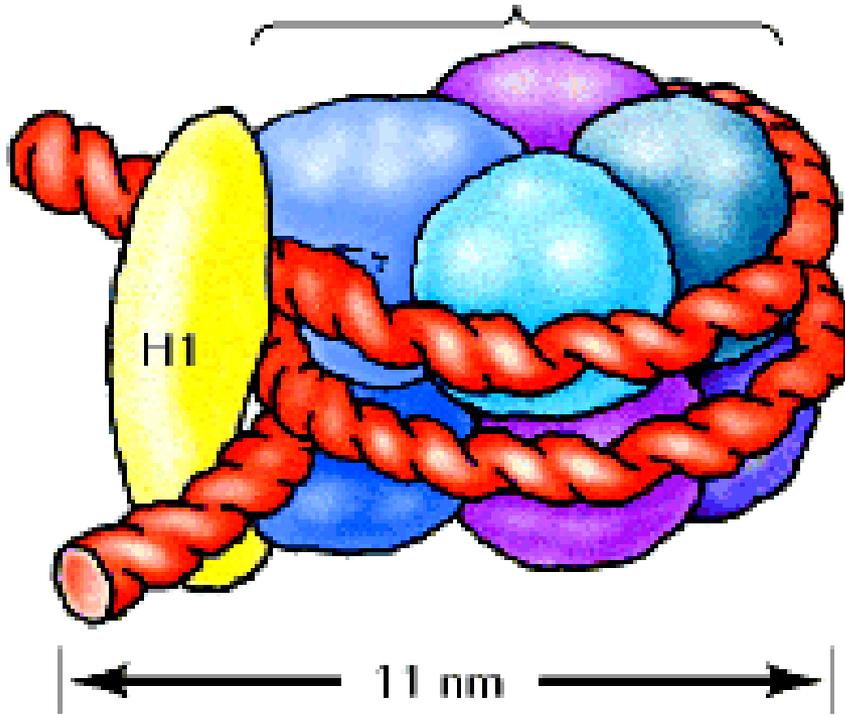


Alta % di aminoacidi basici, **Lys e Arg**: facilitano il legame alla molecola di DNA carica negativamente



Legami tra DNA e istoni: idrogeno, ionico, forze di Van der Waals.

Cromatina



Nucleosoma: L'unità strutturale base della cromatina:

2 X H2A

2 X H2B

2 X H3

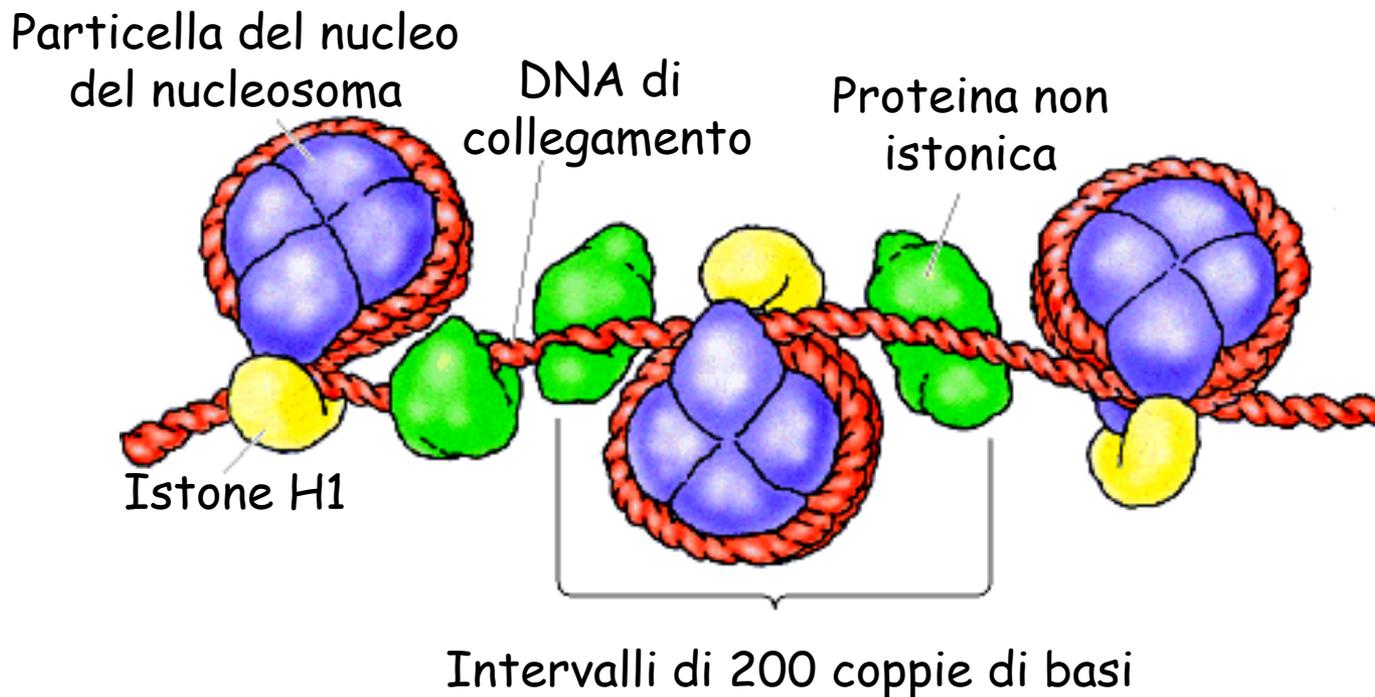
2 X H4

Su questo ottamero di proteine istoniche si avvolgono 146 pb di DNA (1,75 volte)

Cromatosoma: Nucleosoma + una molecola di istone H1 che tiene bloccati in posizione due giri completi di DNA (166 pb) sul nucleosoma

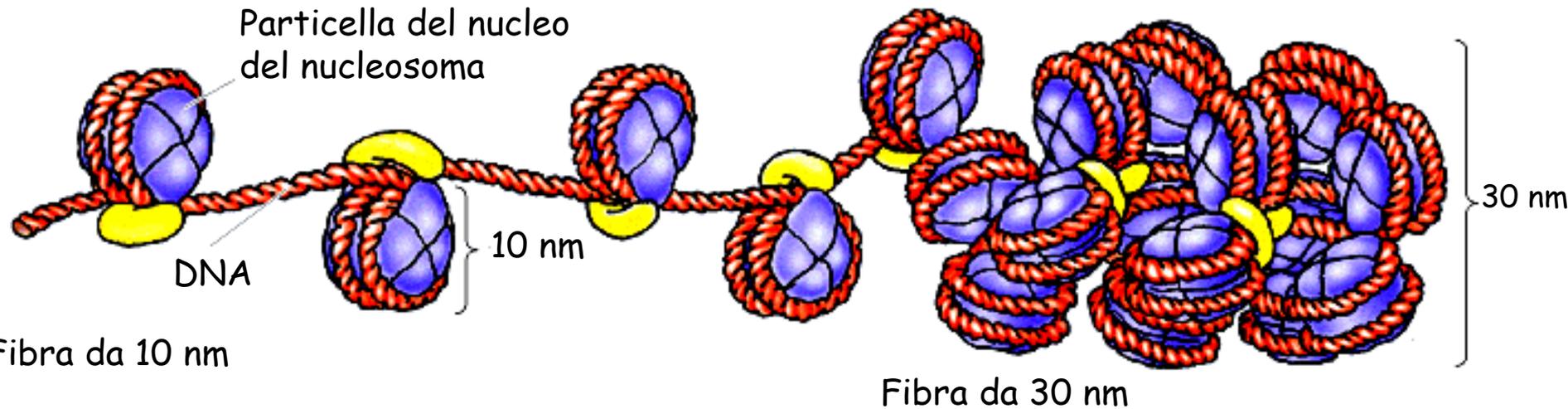
Cromatina

Il DNA è avvolto intorno agli istoni a formare i nucleosomi e sigillato dall'istone H1. **Proteine non istoniche** si legano al DNA di collegamento fra le particelle del nucleo dei nucleosomi. Infatti la cromatina contiene una massa approssimativamente uguale di una varietà di proteine cromosomiche non istoniche. Esistono più di mille tipi diversi di queste proteine, che sono coinvolte in un gamma di attività, comprese **replicazione del DNA** ed **espressione del gene**



Cromatina

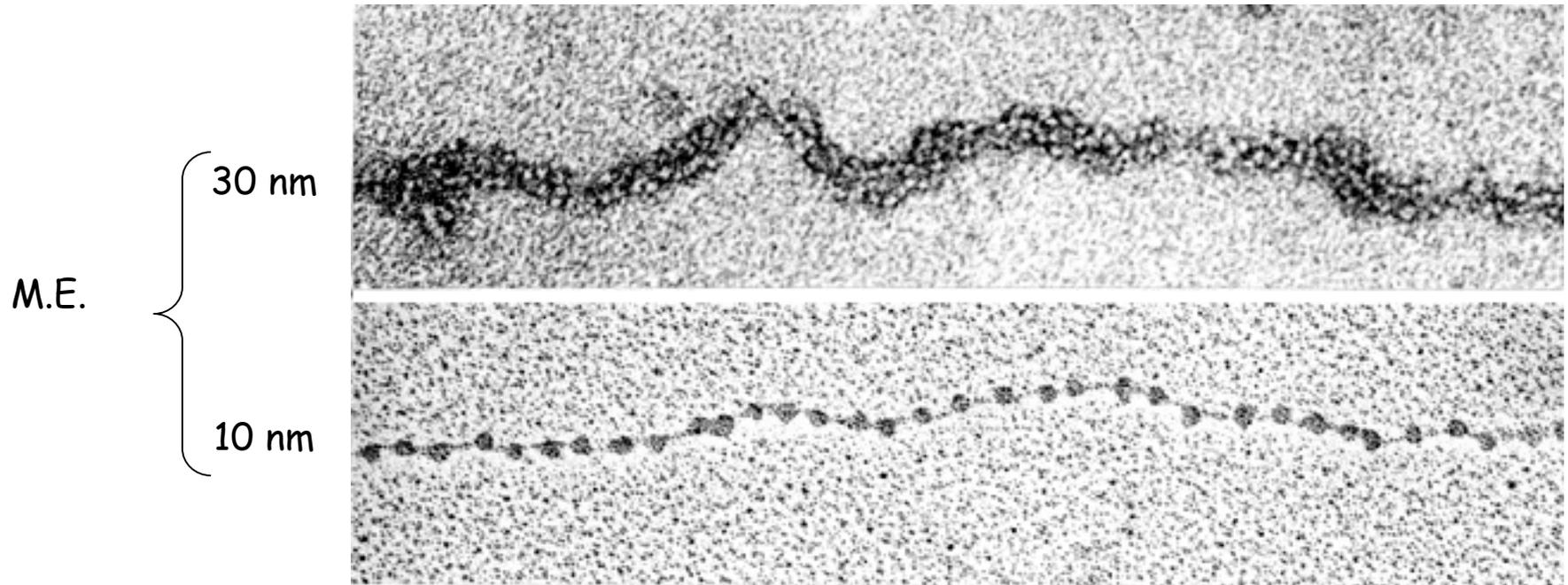
La cromatina può poi essere ulteriormente condensata da un avvolgimento in fibre di 30 nm la cui struttura rimane ancora da determinare.



Le fibre di cromatina da 30 nm contengono circa 6 nucleosomi per giro.

Cromatina

Fotografie al microscopio elettronico delle fibre di cromatina da 30 nm e da 10 nm.



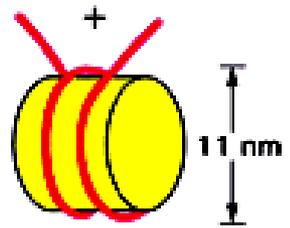
L'organizzazione superelicoideale del DNA: i cromosomi

Cromatina

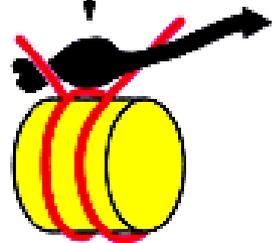
Istone H1



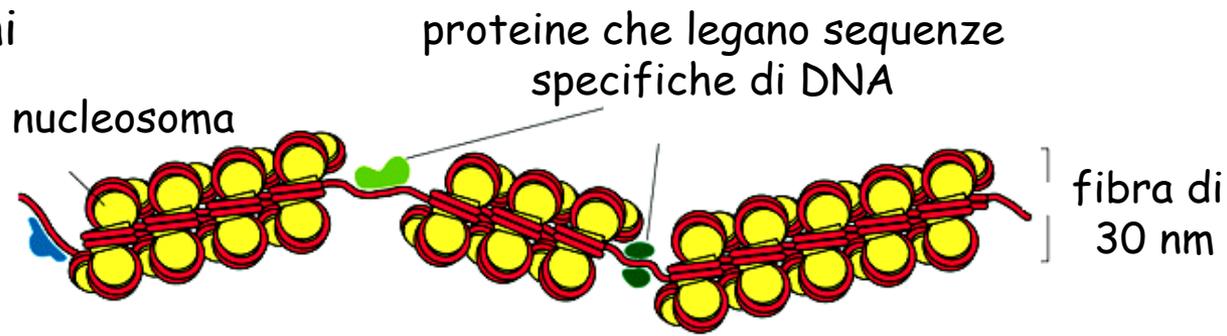
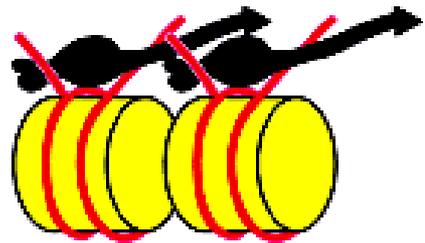
Le interazioni fra le molecole dell'istone H1 sembrano importanti per il compattamento della cromatina a fibra di 30 nm.



H1 si lega a regioni specifiche del nucleosoma



I nucleosomi sono compattati



Cromatina e cromosomi

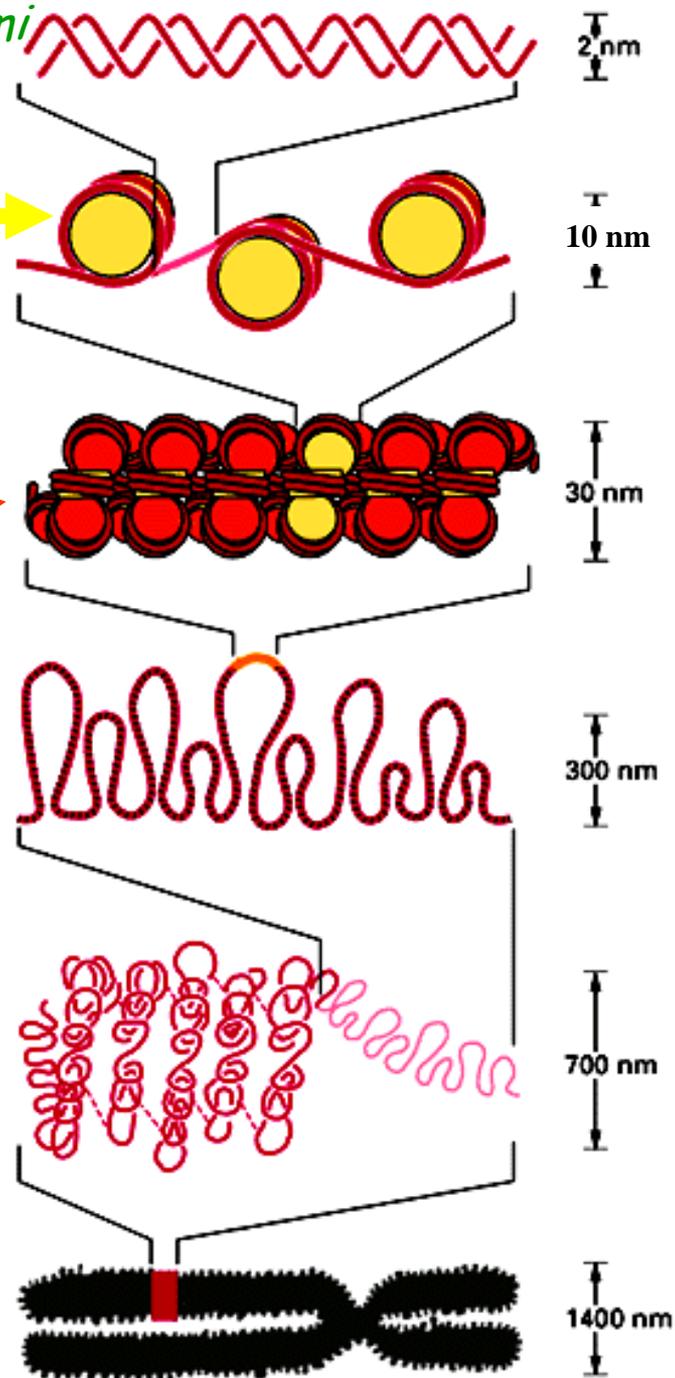
Il grado di condensazione della cromatina varia durante il ciclo vitale della cellula. In cellule in interfase:

Eucromatina

- la maggior parte della cromatina (ca. 90%)
- relativamente decondensata e distribuita in tutto il nucleo
- sotto forma di fibre da 30 nm organizzate in grandi anse (80%)
 - Circa il 10% della eucromatina, contenente i geni che sono trascritti attivamente, è in uno stato più decondensato che permette la trascrizione: struttura di 10 nm

Eterocromatina

- Circa il 10% della cromatina interfaseica
- stato molto condensato che assomiglia alla cromatina delle cellule che attraversano la mitosi
- è inattiva dal punto di vista della trascrizione
- contiene sequenze di DNA altamente ripetuto, come quelle presenti in centromeri e telomeri.



Compattamento del DNA:

Cromosomi

Cromatina

Telomeri e centromero

Organizzazione dei genomi:

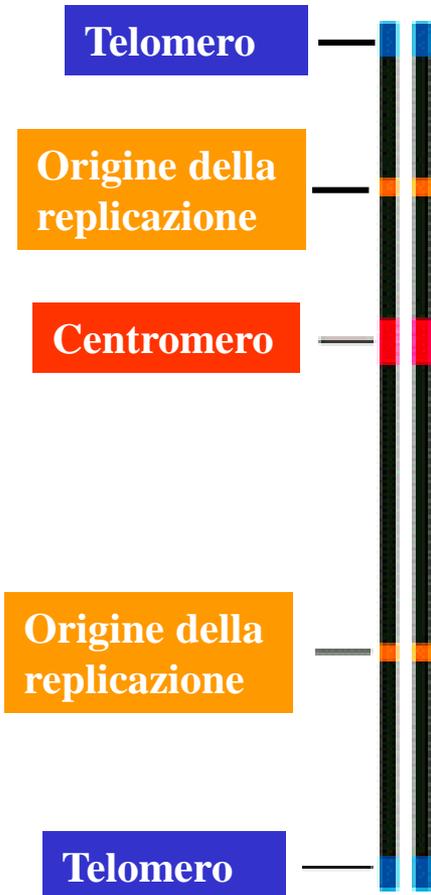
Introni ed esoni

Sequenze spaziatrici

DNA ripetuto: satelliti, LINES e SINES

I cromosomi umani: I telomeri

3 sono gli elementi che devono esserci nella sequenza del DNA perché il cromosoma eucariotico possa replicarsi e poi segregare alla mitosi:

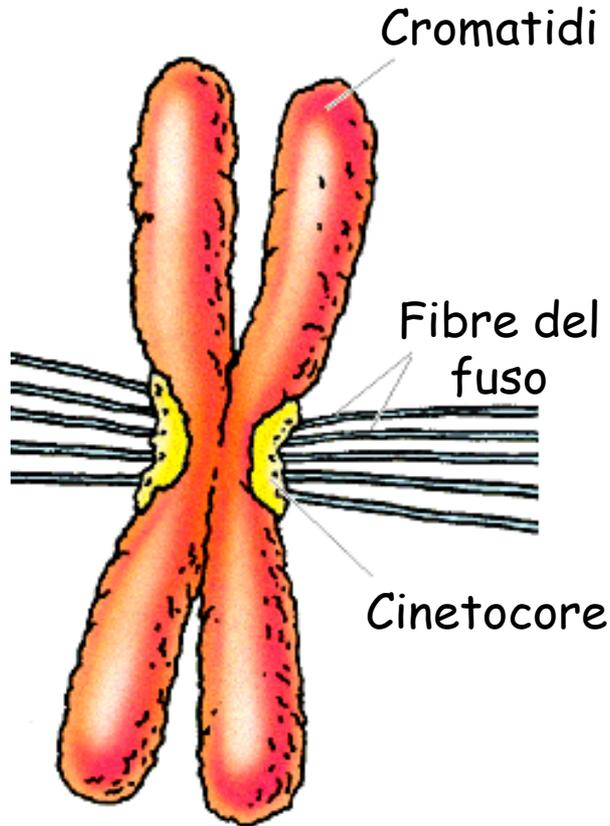


1. **Origini di replicazione multiple:** dalle quali, durante l'interfase, inizia la replicazione del DNA in entrambe le direzioni
2. **1 Centromero:** sito di attacco per i microtubuli del fuso
3. **2 Telomeri:** cappucci che chiudono il cromosoma alle sue estremità. Contengono sequenze ripetitive che servono a replicare le estremità cromosomiche e anche a proteggerle, evitando che siano scambiate per monconi di cromosomi rotti, che la cellula deve riparare.

- Necessari per la replicazione delle estremità delle molecole lineari di DNA
- Seq telomeriche di molti eucarioti sono simili fra loro
- Consistono di ripetizioni di DNA a semplice sequenza
- Nell'uomo la sequenza ripetuta è AGGGTT

I cromosomi umani. I centromeri

Il centromero è una regione specializzata del cromosoma che ha un ruolo cruciale nell'assicurare la distribuzione corretta dei cromosomi duplicati alle cellule figlie durante la mitosi



I centromeri:

- 1) sito di **associazione** dei **cromatidi fratelli**
- 2) sito di **attacco** per i **microtubuli** del fuso mitotico
- 3) proteine specifiche si attaccano al DNA centromerico, formando il **cinetocore**, che è il sito di attacco delle fibre del fuso

I centromeri sono costituiti da estese regioni di **eterocromatina** che consistono di sequenze di **DNA satellite altamente ripetitive**

I cromosomi umani. Il cariotogramma

I cromosomi metafasici sono così condensati che la loro morfologia può essere studiata usando il microscopio ottico.

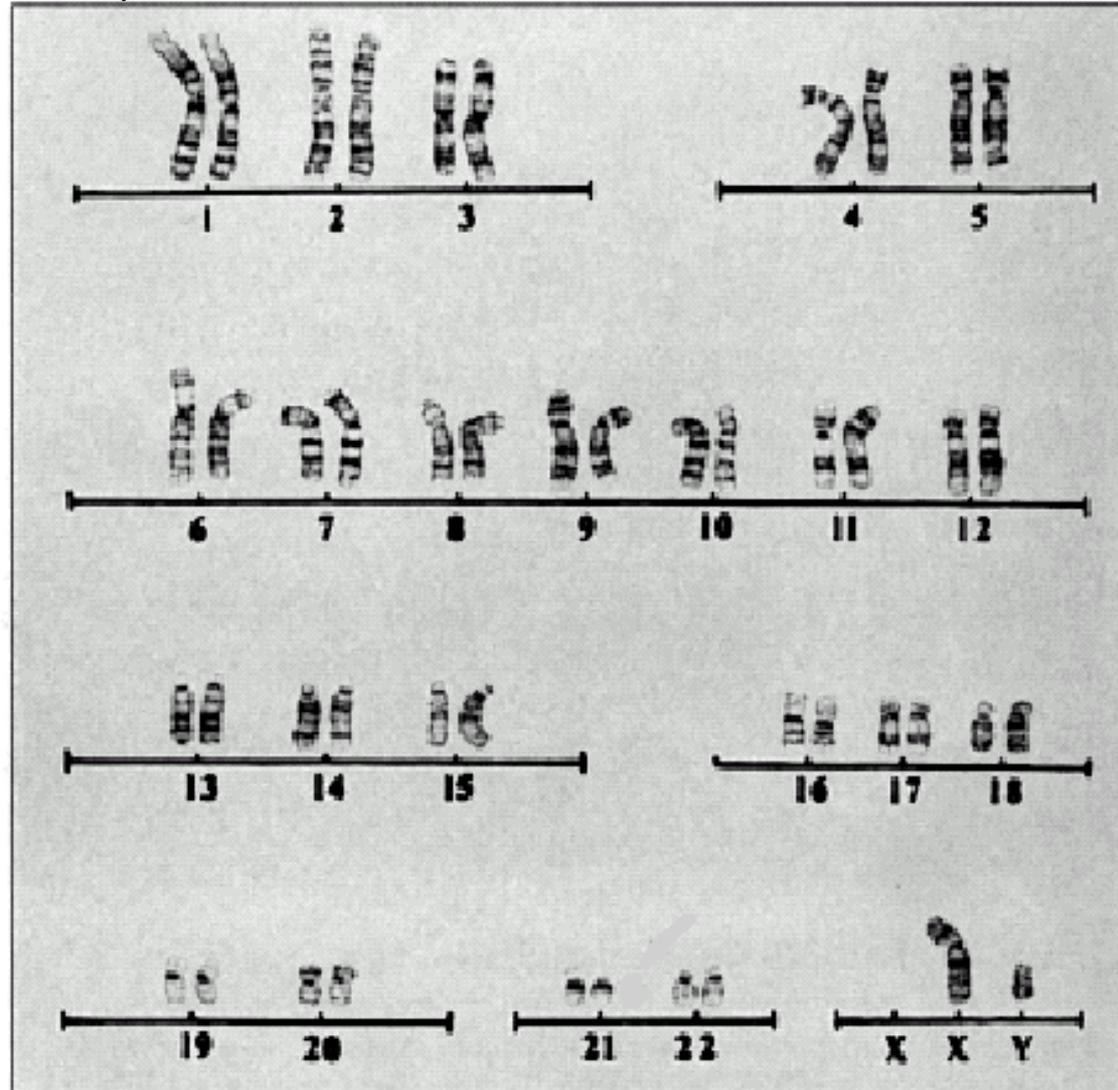
Tecniche di colorazione:

coloranti che distinguono tra il DNA ricco di coppie AT da quello ricco in copie CG

producono una figura di bandeggio evidente e affidabile su ciascun cromosoma

La disposizione delle bande caratterizza ogni cromosoma in modo univoco permettendo di identificarlo e numerarlo

Cariotipo: L'immagine del corredo completo dei 46 cromosomi umani



Compattamento del DNA:

Cromosomi

Cromatina

Telomeri e centomero

Organizzazione dei genomi:

Introni ed esoni

Sequenze spaziatrici

DNA ripetuto: satelliti, LINES e SINES

L'organizzazione dei genomi cellulari

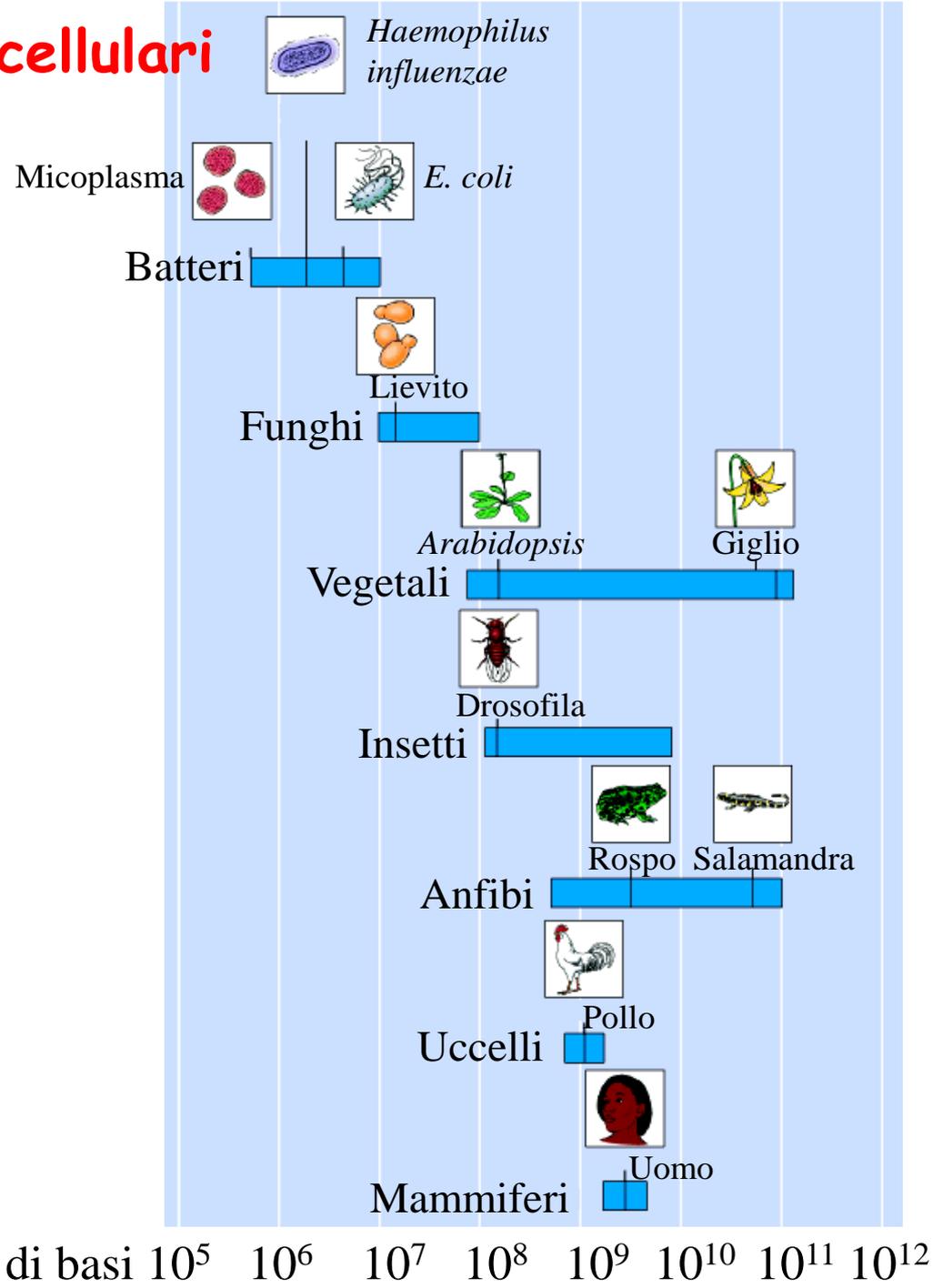
Eucarioti: genomi più grandi e più complessi

Dimensioni dei genomi eucariotici: non correlate alla complessità genetica (es. giglio e salamandra)

Grande quantità di DNA che non codifica per proteine:

1. Sequenze spaziatrici
2. Introni
3. Sequenze di DNA ripetitivo

Famiglie geniche



Geni = sequenze uniche

Gene: segmento di DNA che è espresso per produrre un prodotto funzionante (RNA o polipeptide)

Introni ed esoni



esone 1 esone 2 esone 3

Trascrizione



Splicing



DNA codificante

Trascritto primario di RNA

Sequenze spaziatrici:
lunghe sequenze di DNA
che si trovano fra i geni

Introni:
sequenze non codificanti
che si trovano all'interno
della maggior parte dei
geni eucariotici

DNA non codificante

La scoperta degli introni, 1977

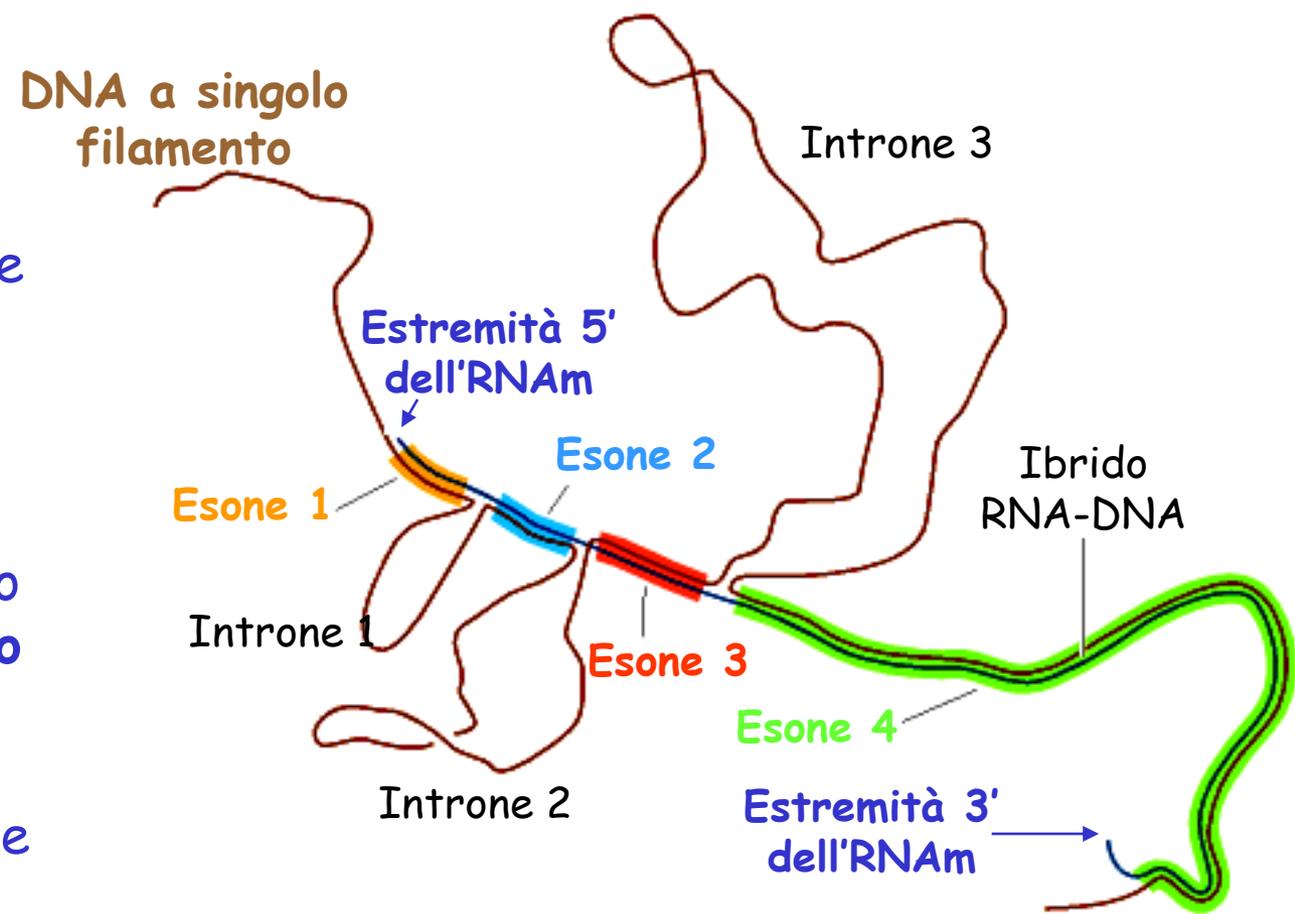
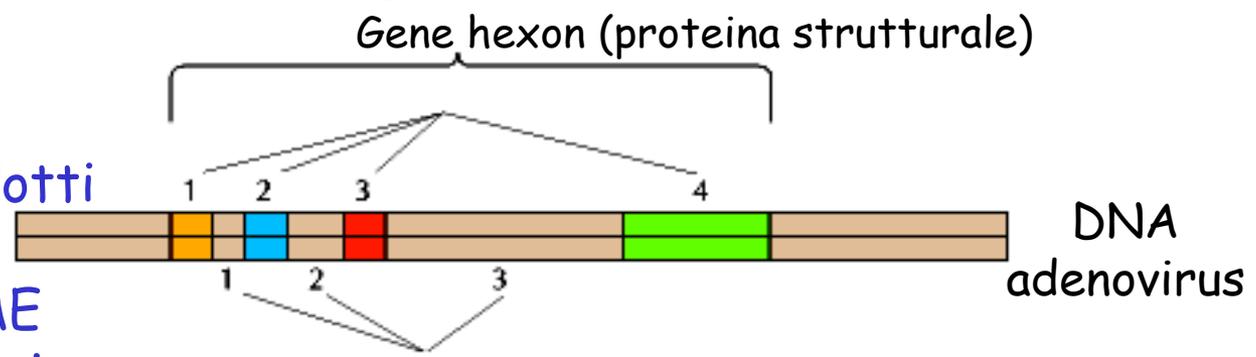
P. Sharp e R Roberts

Adenovirus: genoma piccolo ed RNAm prodotti in alta quantità

Ibridi RNA-DNA al ME

Det le posizioni dei geni virali esaminando ibridi DNA-RNA al ME.

Una singola molecola di RNA ibrida con numerose regioni separate del genoma virale. Quindi, l'mRNA non corrisponde ad un trascritto ininterrotto dello stampo di DNA, ma è **assemblato da parecchi blocchi distinti di sequenza** che originano da parti diverse del DNA virale

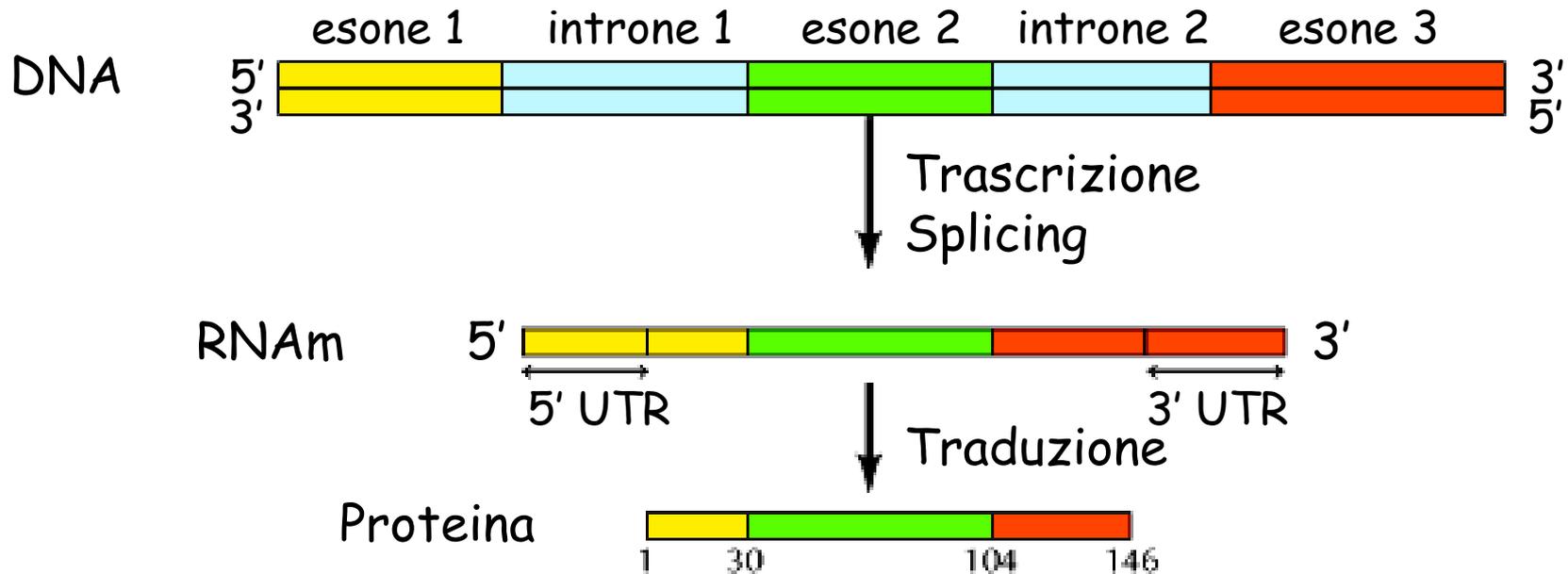


Il significato degli introni

- **Struttura esone-introne di molti geni eucariotici è molto complicata**
- **La quantità di DNA nelle seq introniche è spesso maggiore di quella degli esoni**
- **Gli introni occupano circa 10 volte più DNA degli esoni negli eucarioti**

Il significato degli introni

- Nella maggior parte degli **eucarioti complessi** (non in eucarioti semplici, es lieviti)
- **Non** sono necessari per la funzione dei geni nelle cellule eucariotiche



- Si pensa che siano ciò che rimane di sequenze che avevano avuto importanza nell'**evoluzione**
- Ipotesi: **Rimescolamento degli esoni**: potrebbero avere aiutato ad accelerare l'evoluzione facilitando la ricombinazione fra esoni di geni diversi
- E' infatti stato dimostrato che alcuni geni sono delle **chimere di esoni** derivati da parecchi altri geni

Compattamento del DNA:

Cromosomi

Cromatina

Telomeri e centromero

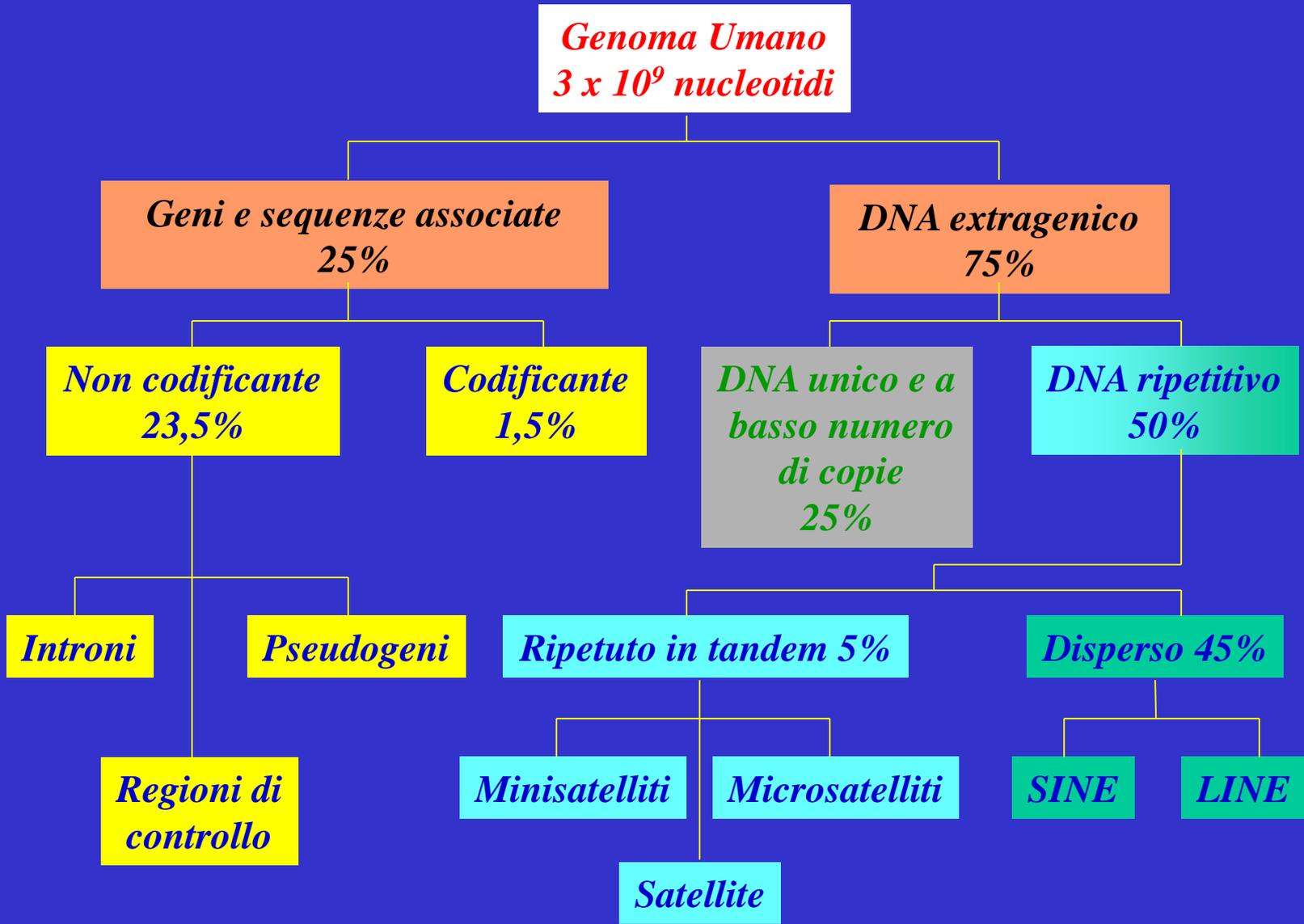
Organizzazione dei genomi:

Introni ed esoni

Sequenze spaziatrici

DNA ripetuto: satelliti, LINES e SINES

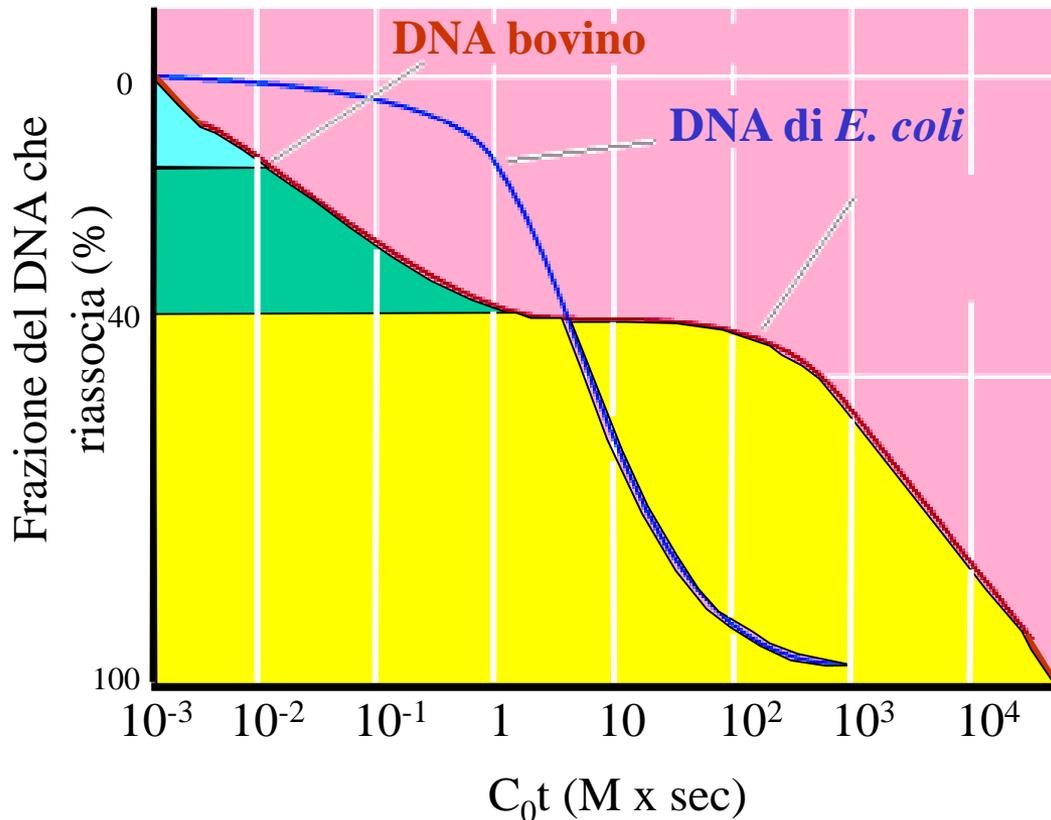
Struttura dei genomi



Sequenze di DNA ripetitivo

Una porzione sostanziale dei genomi eucariotici consiste di sequenze altamente ripetute non codificanti (fino a centinaia di migliaia di copie per genoma)

Dimostrate mediante studi della velocità di riassociazione di frammenti denaturati di DNA cellulari.



Il DNA totale di vitello può essere suddiviso in 3 frazioni in base alla velocità di riassociazione:

1. Sequenze semplici
2. SINES e LINES
3. DNA a singola copia

Sequenze di DNA ripetitivo:

1. Sequenze semplici o DNA satellite

Serie in tandem di migliaia di copie di brevi sequenze

Satellite

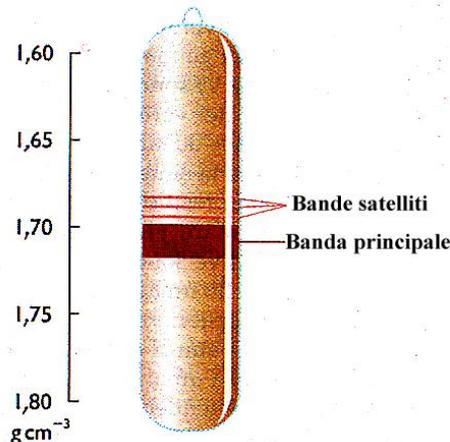
Unità da 5 a 200 bp
Segmenti lunghi fino a qualche centinaio di kb

Minisatelliti

Unità da 6 a 50 bp
Segmenti lunghi fino a 25 kb

Microsatelliti

Unità da 1 a 5 bp
Segmenti lunghi fino 150 pb



5'-CACACACACACA-3'

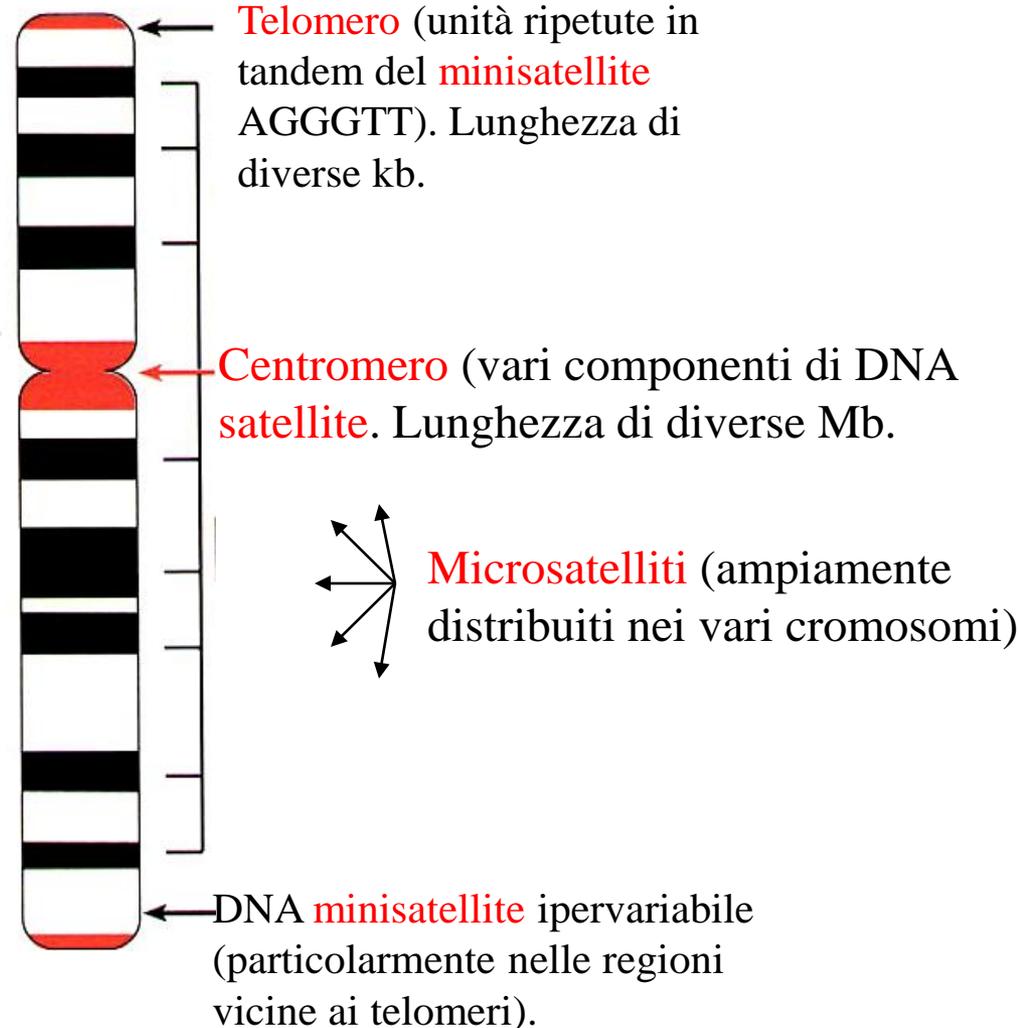
Sequenze di DNA ripetitivo:

1. Sequenze semplici o DNA satellite

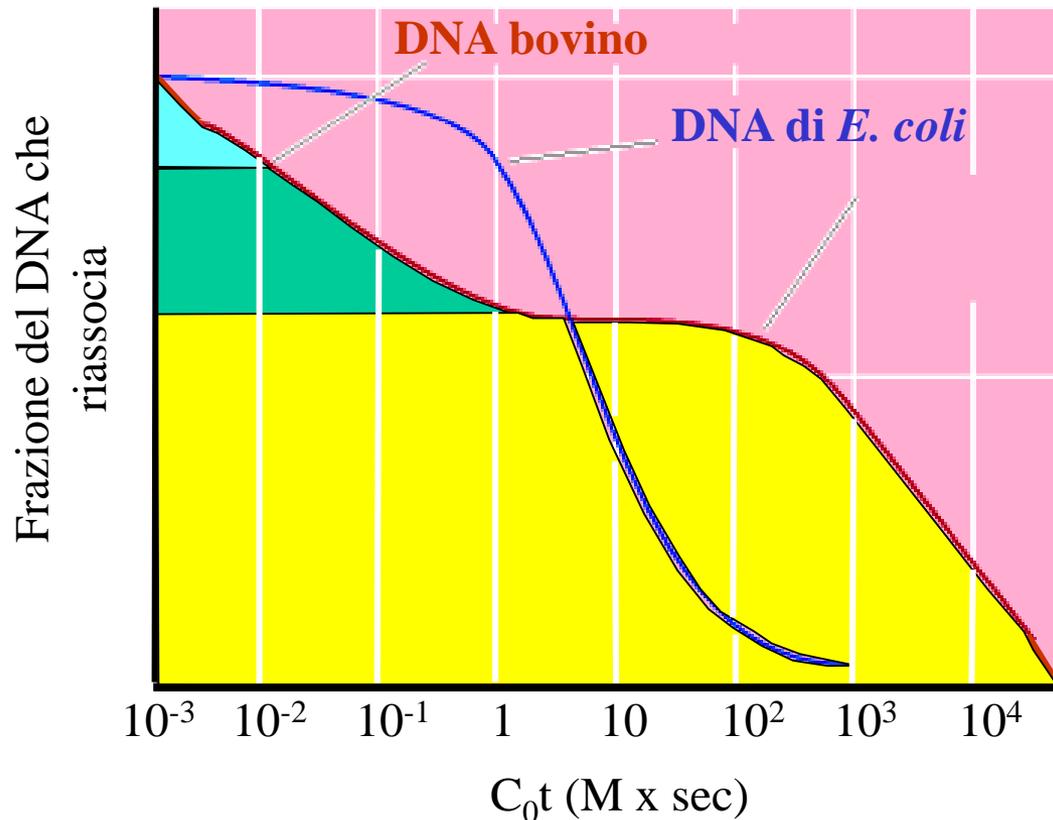
- a) **DNA satellite:** sequenze lunghe
- b) **DNA minisatellite:** sequenze medie
- c) **DNA microsatellite:** sequenze corte

Nessun DNA satellite viene trascritto

Queste sequenze in totale occupano il 10% del DNA ripetitivo.



Sequenze di DNA ripetitivo



Il DNA totale di vitello può essere suddiviso in 3 frazioni in base alla velocità di riassociazione:

1. Sequenze semplici
2. SINES e LINES
3. DNA a singola copia

Sequenze di DNA ripetitivo:

2. SINES e LINES

Altre sequenze di DNA ripetitivo sono sparse per tutto il genoma invece di essere raggruppate come ripetizioni in tandem.

<i>Abbreviazione</i>	SINE Sequenze Alu	LINE
<i>Sequenze</i>	short interspersed elements	long interspersed elements
<i>Lunghezza</i>	circa 300 pb	circa 6000 pb
<i>Ripetizione nel genoma</i>	1 milione di volte (10% DNA totale)	circa 50.000 volte
<i>Trascrizione e traduzione</i>	Trascritte ma non codificano proteine	Trascritte e alcune codificano per proteine
<i>Significato</i>	Significato sconosciuto	Funzione e significato sconosciuti

Il numero dei geni negli eucarioti

DNA di una cellula umana aploide	3×10^9 coppie di basi
Sequenze altamente ripetute	1/3 del genoma: 1×10^9 coppie di basi
Geni funzionanti + pseudogeni + sequenze spaziatrici non ripetitive	2×10^9 coppie di basi
Dimensioni di un gene medio, compresi gli introni	10.000-20.000 coppie di basi
Stima del numero di geni nel genoma umano	$(2 \times 10^9) / 20.000 = 100.000$ geni
Sequenze che codificano proteine	3% circa del DNA umano
Stima del numero di geni nel genoma umano corretta in seguito al sequenziamento del genoma umano	circa 30.000 geni

fine

COME SI STUDIANO LE CELLULE

Dimensioni delle cellule

Microscopio ottico

Microscopio a fluorescenza

Microscopio elettronico

MICROSCOPIA

Colture cellulari

FACS

Centrifuga

Frazionamento subcellulare

Centrifugazione in gradiente di densità

CELLULE

Southern

Northern

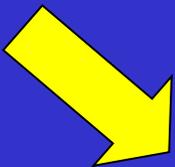
ACIDI NUCLEICI

Western

SDS page

Immunoistochimica

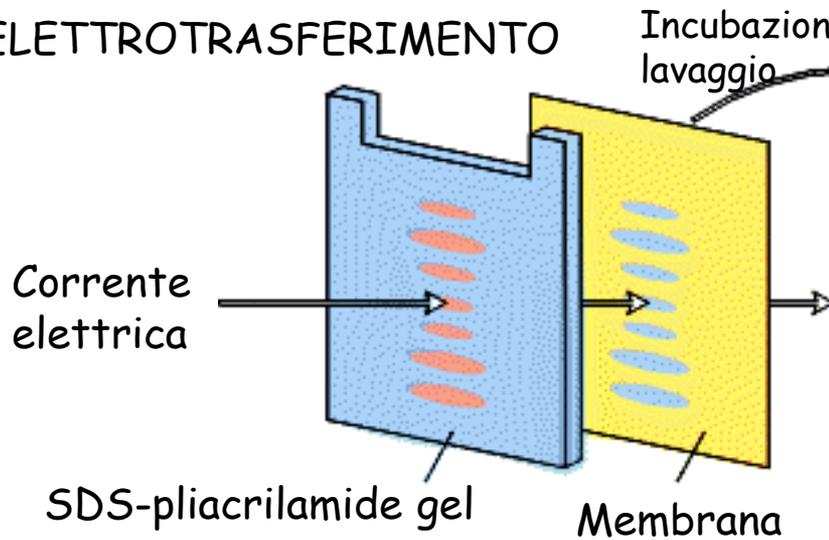
PROTEINE



Come si studiano le macromolecole: le proteine

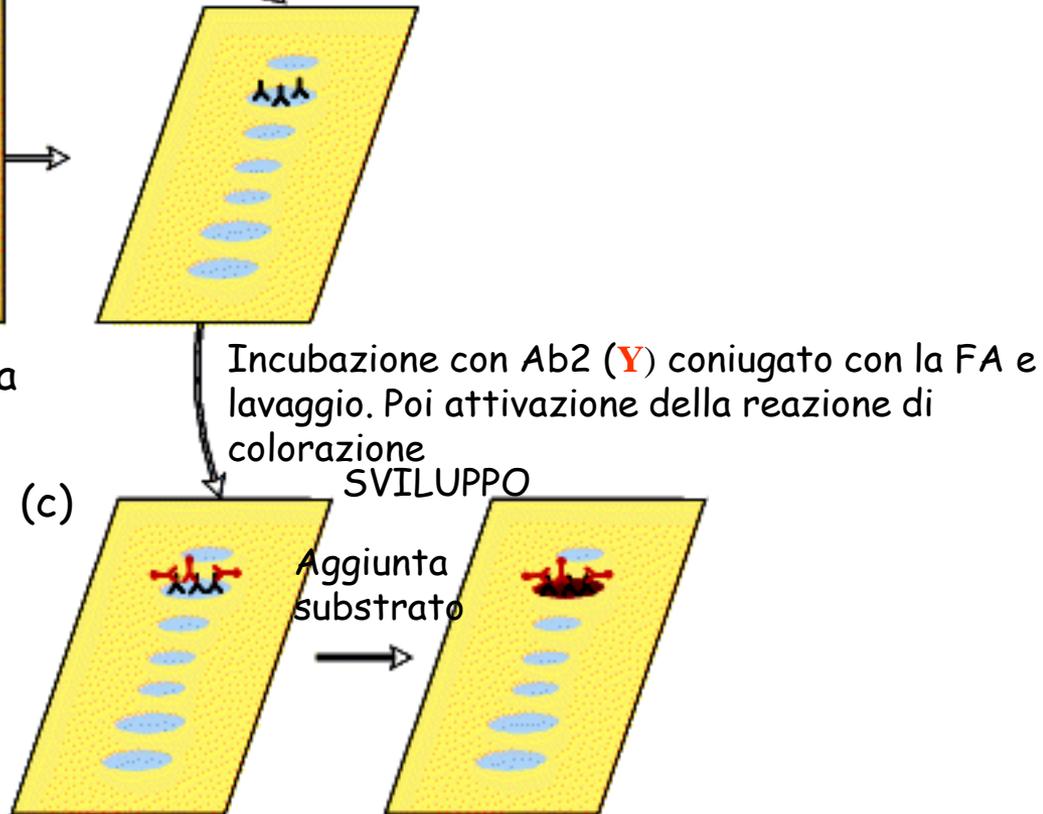
Per identificare una particolare proteina in una miscela totale di proteine si ricorre all'utilizzo della corsa elettroforetica su gel, di un anticorpo specifico primario e di uno secondario coniugato con un enzima che rivela un segnale colorimetrico. Questa tecnica prende il nome di **Western blotting o immunoblotting**.

(a) ELETTROTRASFERIMENTO



Incubazione con Ab1 (Y) e lavaggio

(b) LEGAME ANTICORPO ANTIGENE



- Le proteine totali vengono fatte migrare su un gel di poliacrilamide-SDS e trasferite su una membrana.
- La membrana viene incubata con un anticorpo specifico (Ab1) che riconosce un epitopo specifico della proteina di interesse. Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario la membrana viene lavata per togliere l'anticorpo in eccesso.
- La membrana viene incubata con un anticorpo secondario (Ab2) che si lega al primario. L'Ab2 è covalentemente legato all'enzima fosfatasi alcalina (FA) che catalizza una reazione cromogenica in presenza di un adeguato substrato. In questo modo si forma un precipitato scuro che permette di visualizzare la proteina desiderata.

Marcatura di DNA, RNA, proteine

Gene P

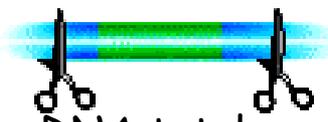
DNA



Il DNA viene tagliato con enzimi di restrizione

RNAm del gene P

Proteina del gene P



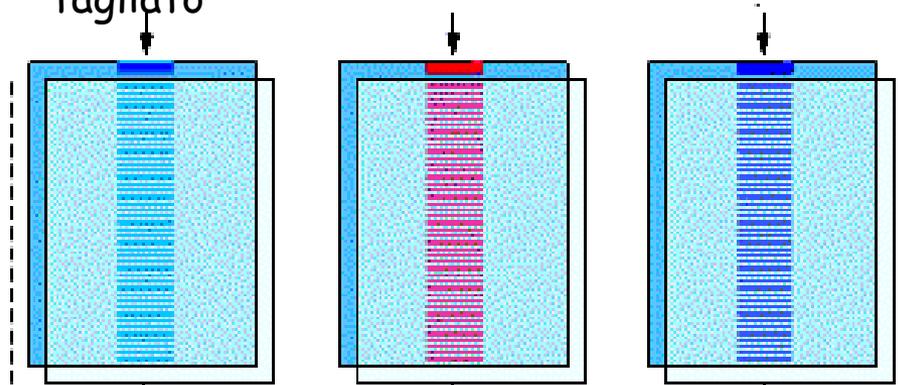
DNA totale tagliato

RNA totale

Proteine totali

elettroforesi

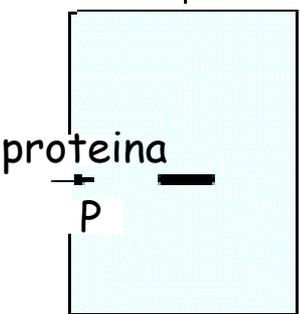
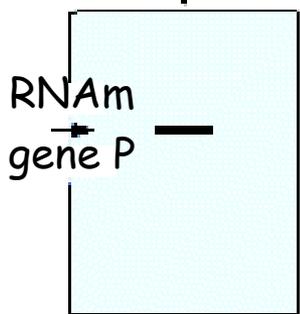
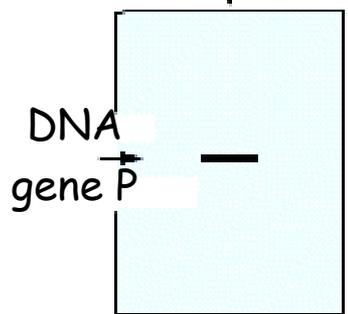
frazionamento



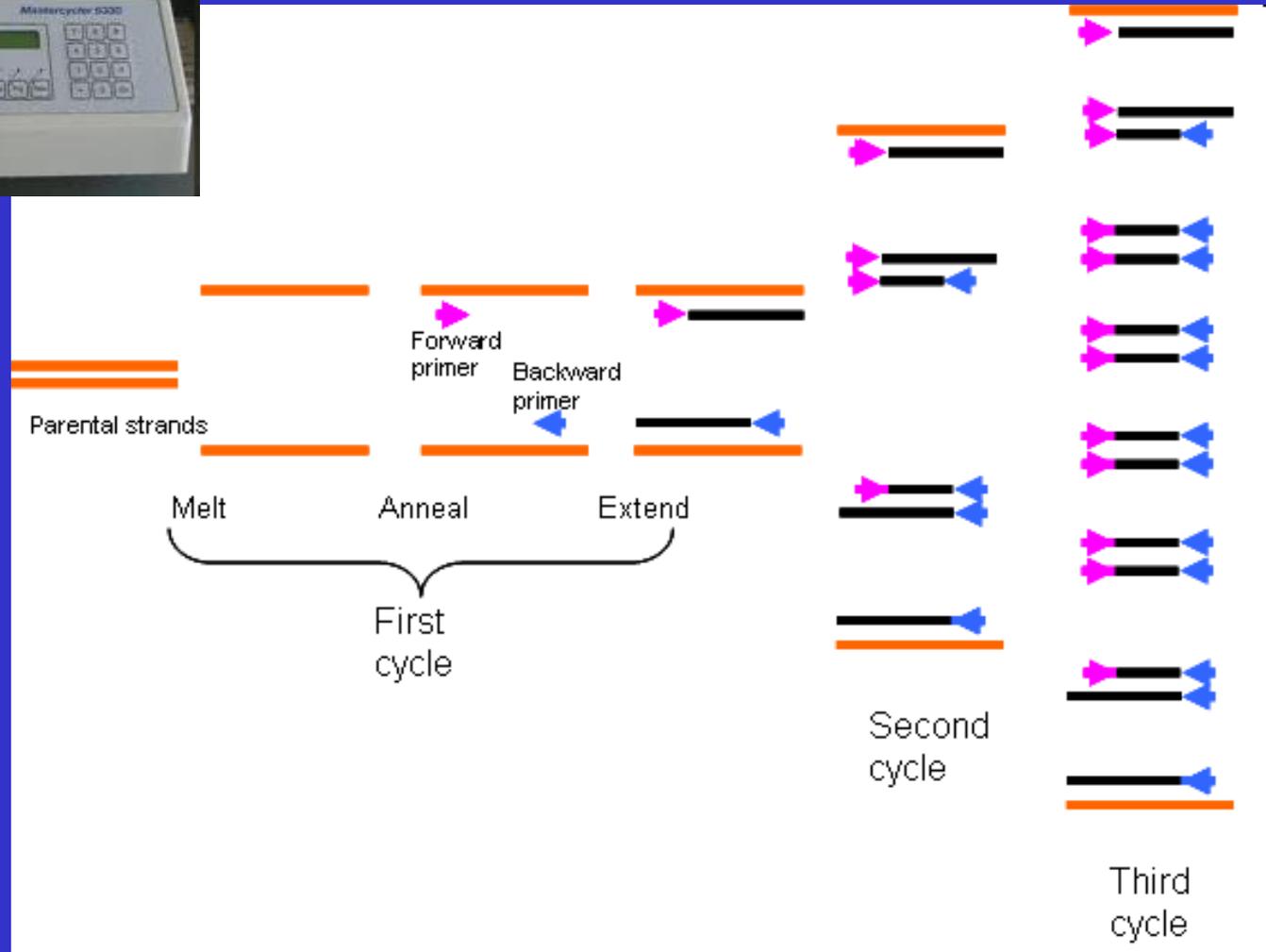
Southern blot

Northern blot

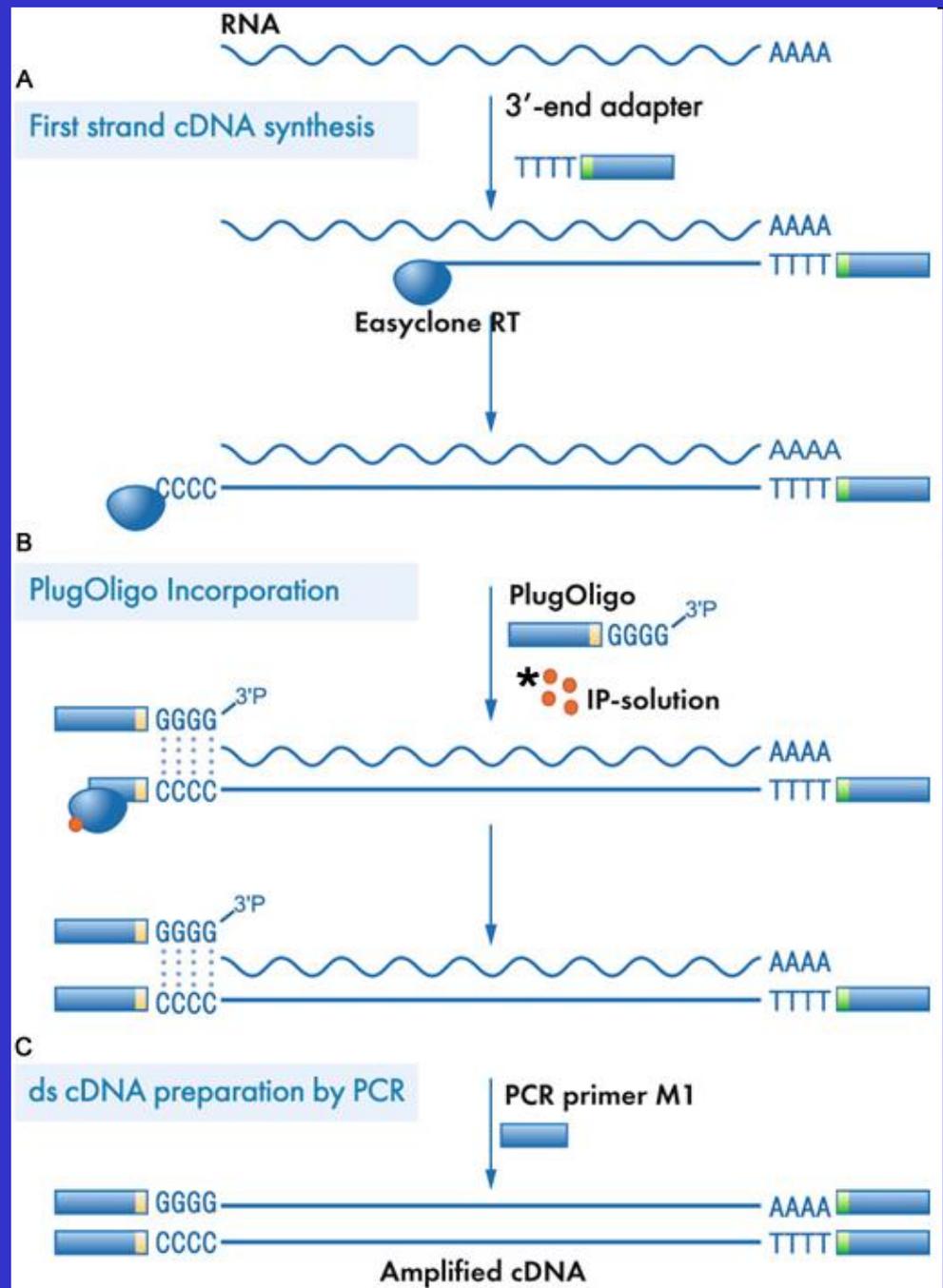
Western blot



PCR

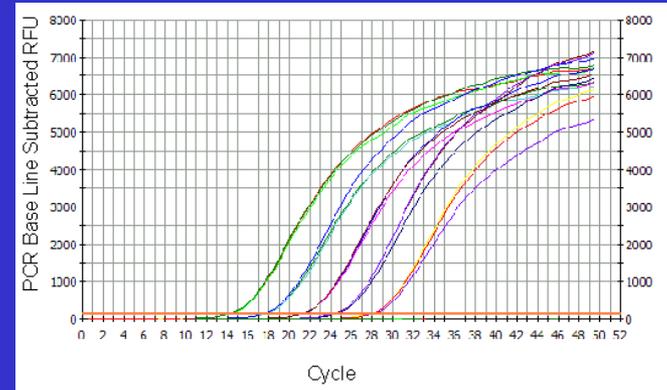


RT-PCR (retrotrascrizione)



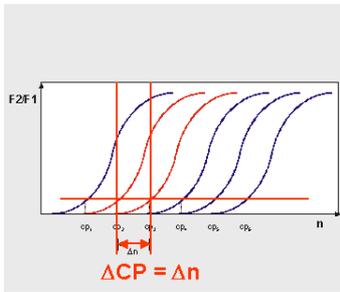
Real-time PCR

(seconda generazione della PCR)



Calculation of real-time PCR efficiency

$$E = 10^{-1/\text{slope}} \Rightarrow E = 10^{-1/3.337} \Rightarrow E = 10^{0.299} \Rightarrow E = 1.99$$



$$N_2 = N_{02} \times E^{n_2} \quad N_3 = N_{03} \times E^{n_3}$$

For $N_2 = N_3$:

$$N_{02} / N_{03} = E^{(n_3 - n_2)} = E^{\Delta n}$$

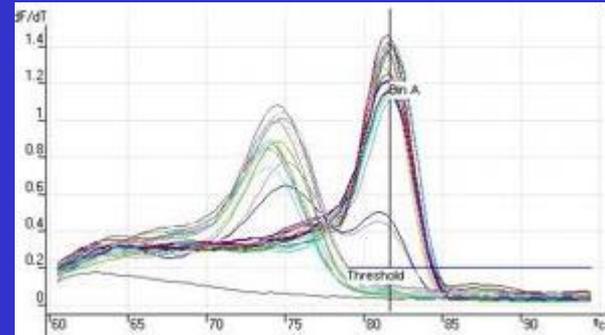
For $N_{02} = 10 \times N_{03}$ (10-fold dilutions):

$$\Delta n = 1 / \log E \quad E = 10^{-1/\text{slope}}$$

e.g. $E = 2.0 \quad \Delta n = 3.32$
 $E = 1.9 \quad \Delta n = 3.58$
 $E = 1.8 \quad \Delta n = 3.91$

Roche Diagnostics, LC rel. Quantification software, March 2001

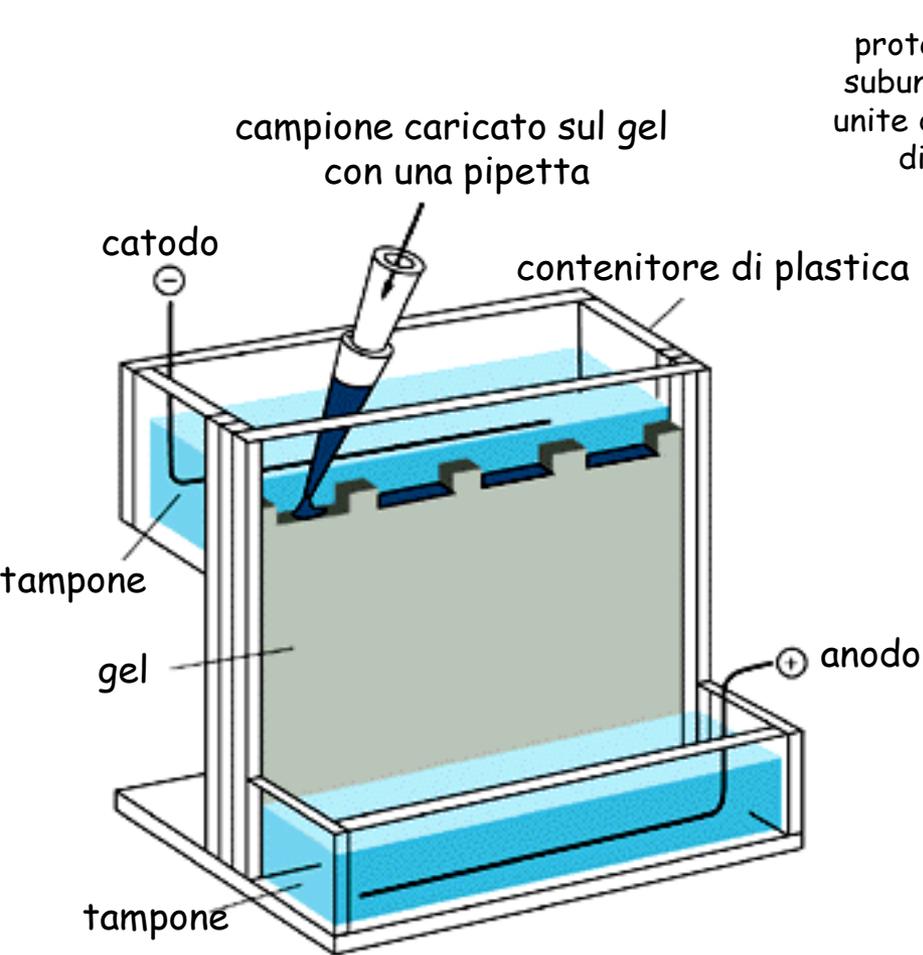
Rasmussen, R (2001) Quantification on the LightCycler. In: Meuer, S, Wittwer, C, Nakagawara, K, eds. Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications Springer Press, Heidelberg, page 21-34



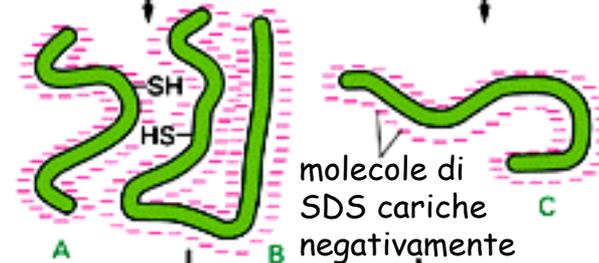
...esiste anche una terza generazione della PCR: digital-PCR...

Come si studiano le macromolecole: le proteine

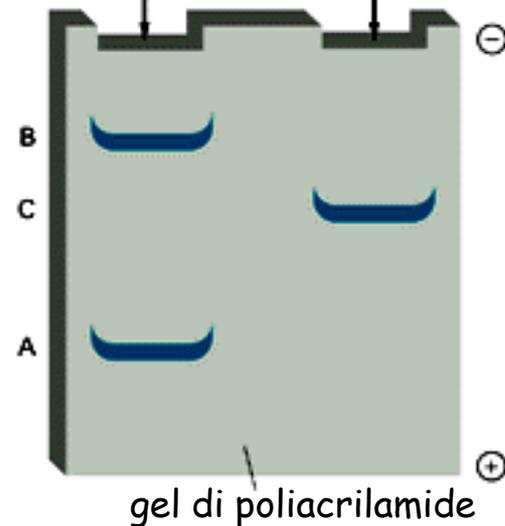
Le dimensioni e la composizione in subunità di una proteina possono essere determinate mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide in SDS (SDS-PAGE)



RISCALDAMENTO CON SDS E MERCAPTOETANOLO



ELETTROFORESI SU GEL DI POLIACRILAMIDE



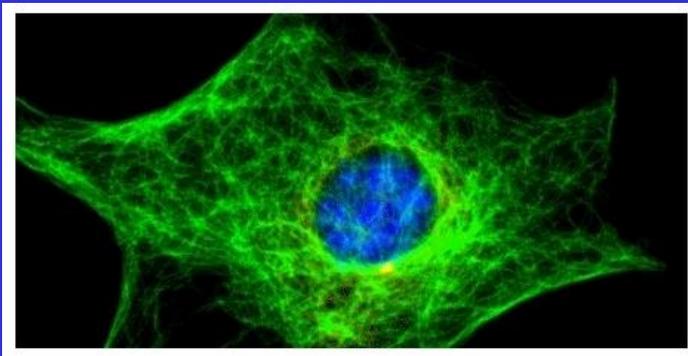
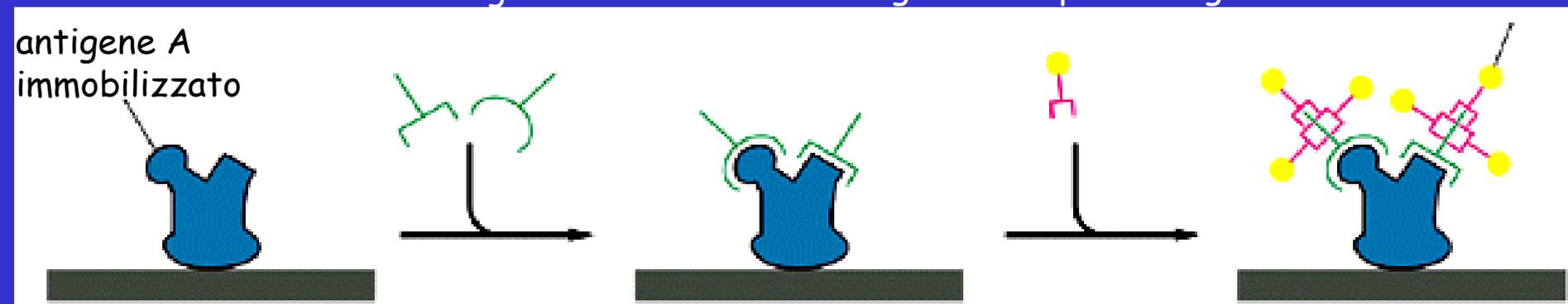
Identificazione e studio delle molecole all'interno delle cellule

Immunoistochimica

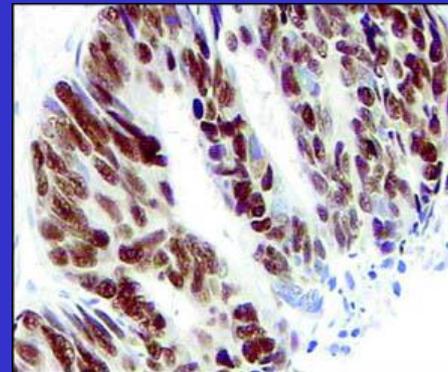
anticorpi primari:
anticorpi di coniglio
diretti contro
l'antigene A

anticorpi secondari:
anticorpi accoppiati ad un
marcatore diretti contro
gli anticorpi di coniglio

marcatore



Immunofluorescenza:
Fibroblasti embrionali di topo T3T;
tubulina in verde e DNA in blu



Immunoistochimica:
Sovraespressione di p53 mutata in cellule
metastatiche epatiche provenienti da un tumore
colonrettale umano.