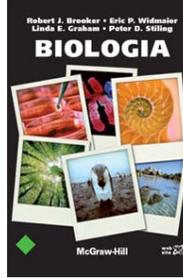


Capitolo 11

Struttura dell'acido nucleico e duplicazione del DNA

Il materiale genetico deve essere capace di:

- Contenere l'informazione necessaria per costruire l'intero organismo
- Passare dai genitori ai figli e da cellula a cellula durante la divisione cellulare
- Essere copiato accuratamente
- Essere responsabile della variazione nota all'interno e tra specie



Livelli di struttura del DNA

1. I nucleotidi sono i blocchi costituenti il DNA (e RNA).
2. Un filamento di DNA (o RNA)
3. Due filamenti formano una doppia elica
4. In cellule vive, il DNA è associato con una serie di proteine differenti per formare i cromosomi
5. Un genoma è il materiale genetico di un individuo comprendente tutti i suoi componenti

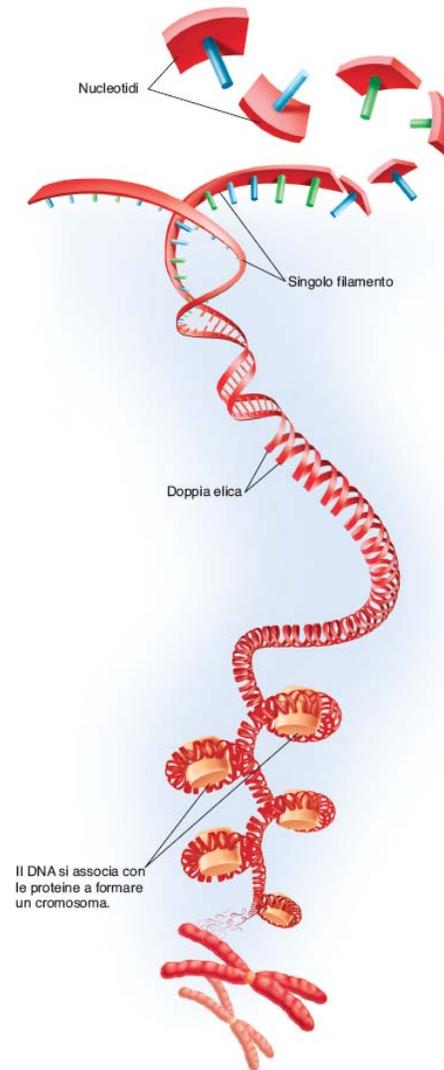
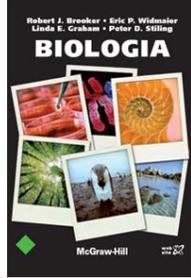


Figura 11.5 Vari livelli strutturali del DNA per formare un cromosoma.

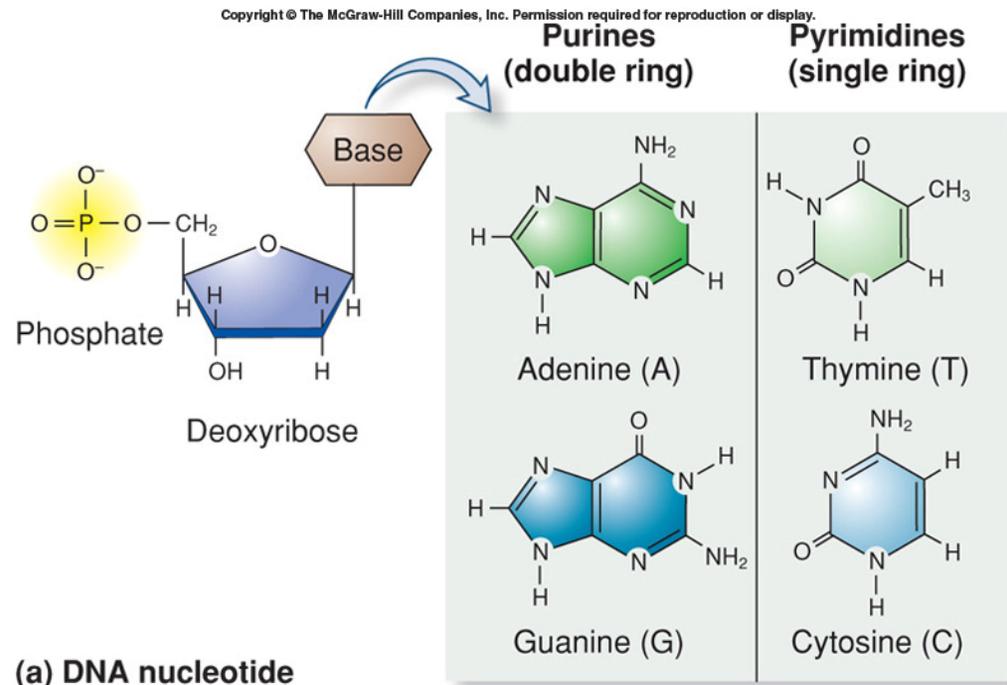


Nucleotidi

- 3 componenti
 - Gruppo fosfato
 - Zucchero pentoso
 - Base azotata

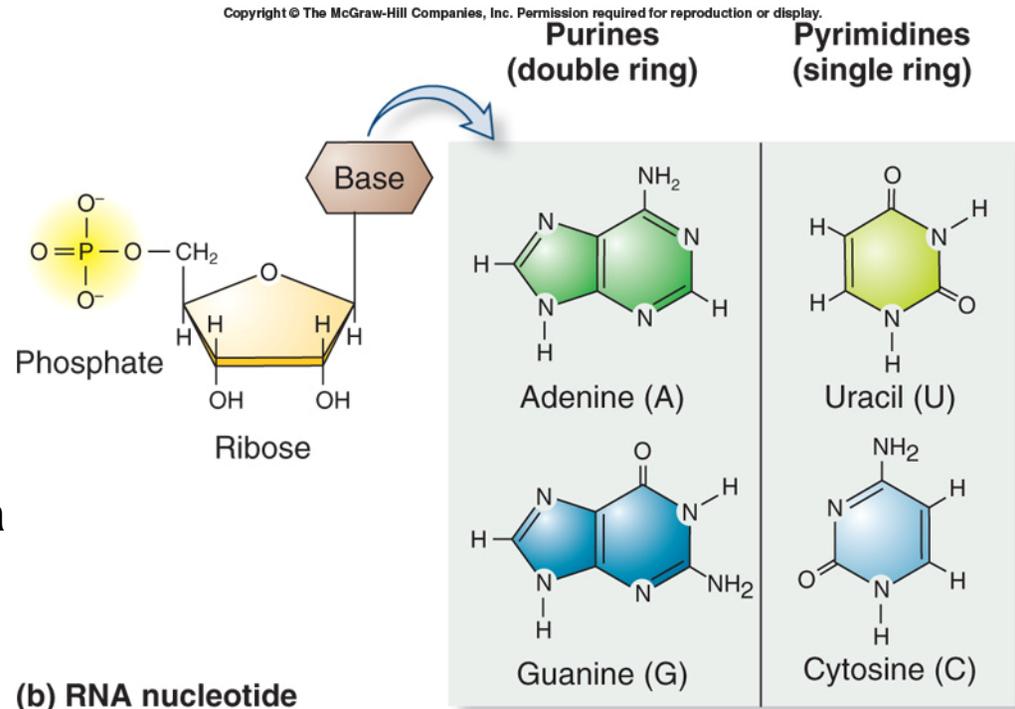
DNA

- 3 componenti
 - Gruppo fosfato
 - Zucchero pentoso
 - Desossiribosio
 - Base azotata
 - Purine
 - Adenina (A), guanina (G)
 - Pirimidine
 - Citosina (C), timina (T),



RNA

- 3 componenti
 - Gruppo fosfato
 - Zucchero pentoso
 - Ribosio
 - Base azotata
 - Purine
 - Adenina (A), guanina (G)
 - Pirimidine
 - Citosina (C), Uracile(U)



- Sistema di numerazione convenzionale
- Atomi di carbonio dello zucchero da 1' a 5'
- Base attaccata a 1'
- Fosfato attaccato a 5'

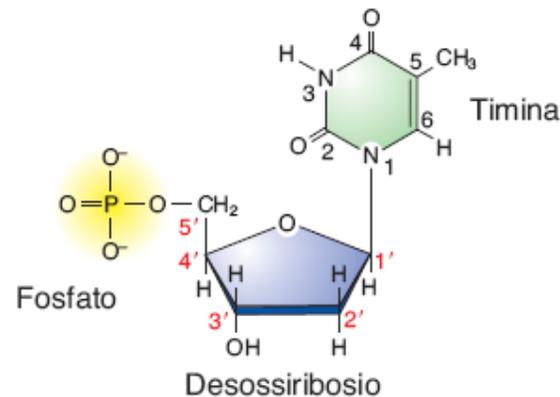
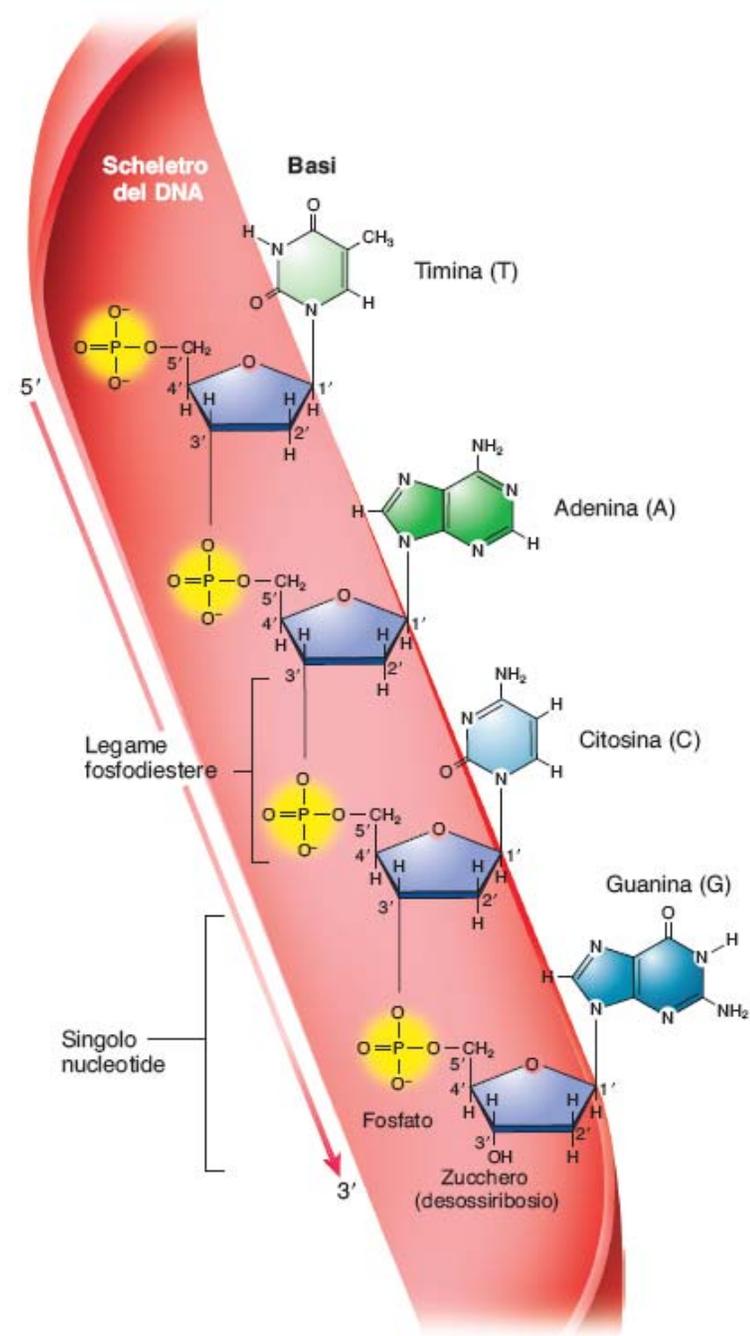


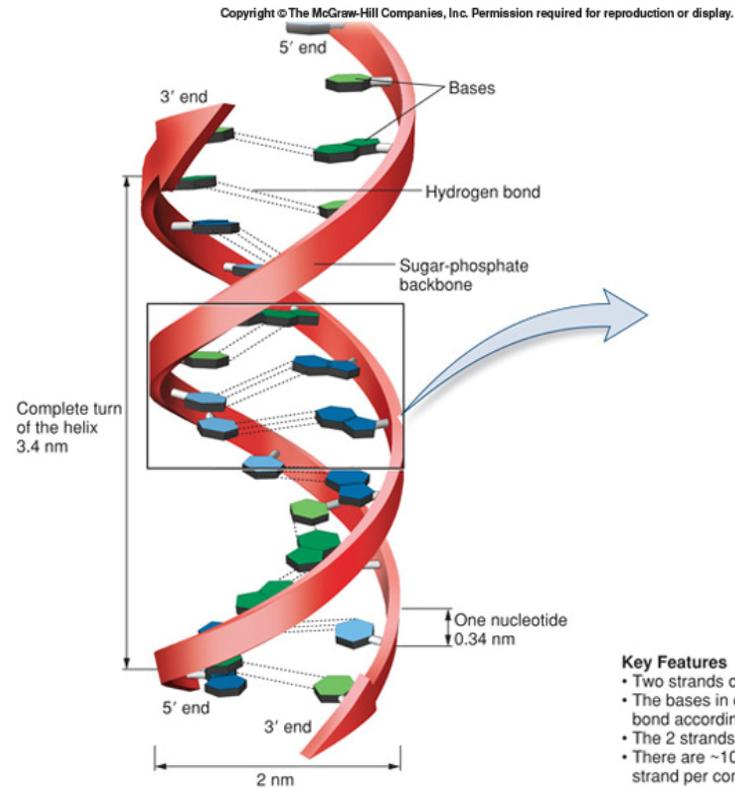
Figura 11.7 Numerazione convenzionale in un nucleotide di DNA. I carboni nello zucchero sono indicati con un apostrofo, mentre quelli nelle basi sono senza apostrofo.

Filamenti

- Nucleotidi legati covalentemente
- Legame fosfodiesterico – il gruppo fosfato lega 2 zuccheri
- Fosfati e zuccheri dello scheletro
- Le basi si proiettano dallo scheletro
- Direzione- 5' to 3'
- 5' – TACG – 3'



- Il DNA è
 - Doppio filamento
 - A elica
 - Scheletro zucchero-fosfato
 - Basi all'interno
 - Stabilizzato da legami ad idrogeno
 - Coppie di basi con appaiamento specifico

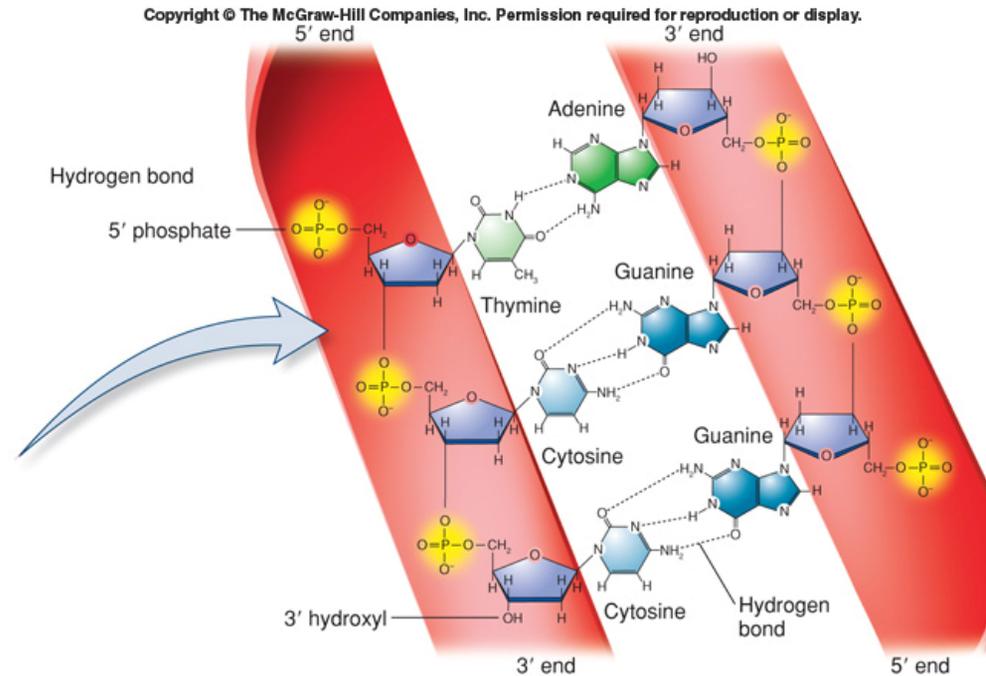


Key Features

- Two strands of DNA form a double helix.
- The bases in opposite strands hydrogen-bond according to the AT/GC rule.
- The 2 strands are antiparallel.
- There are ~10 nucleotides in each strand per complete turn of the helix.

(a) Double helix

- Regola AT/GC o di Chargoff
 - A si appaia a T
 - G si appaia a C
- 10 paia di basi per giro
- I 2 filamenti di DNA sono complementari
 - 5' – GCGGATTT – 3'
 - 3' – CGCCTAAA – 5'
- I 2 filamenti sono anti-paralleli
 - Un filamento da 5' a 3'
 - Altro filamento da 3' a 5'



(b) Base pairing

Key Features

- Two strands of DNA form a double helix.
- The bases in opposite strands hydrogen-bond according to the AT/GC rule.
- The 2 strands are antiparallel.
- There are ~10 nucleotides in each strand per complete turn of the helix.

- Il modello a riempimento di spazio mostra solchi
- Solco maggiore
 - Dove si legano le proteine
- Solco minore

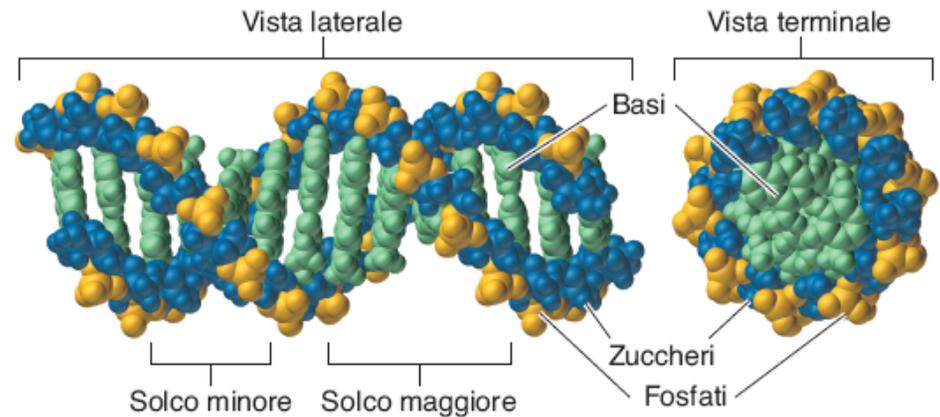
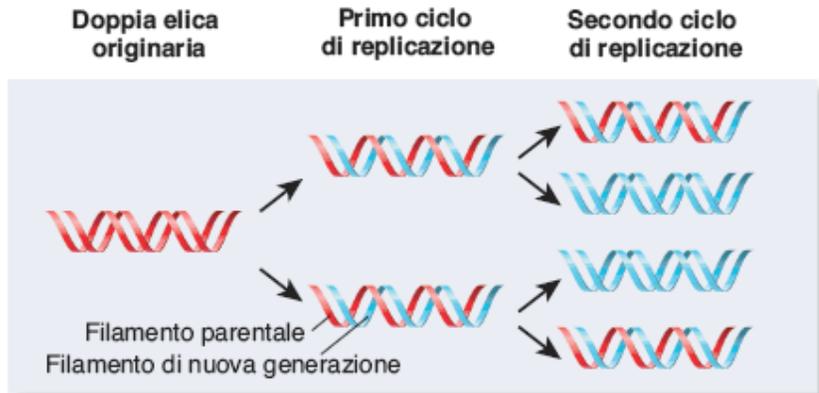


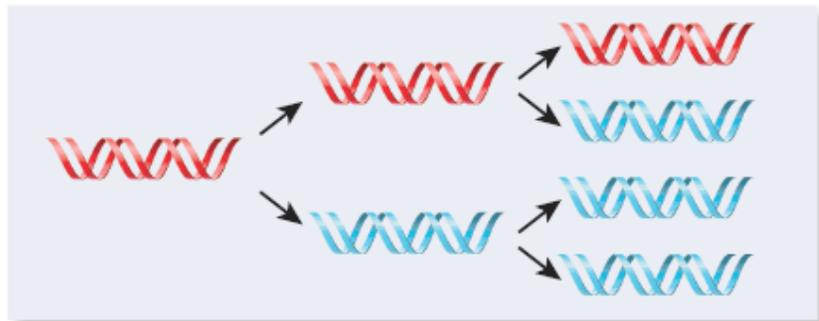
Figura 11.11 Modello a riempimento spaziale della doppia elica del DNA. Nello scheletro zuccherofosfato, le molecole di zucchero sono colorate in blu e i gruppi fosfati in giallo. Questo scheletro è sulla superficie più esterna della doppia elica. Gli atomi delle basi, colorati in verde, sono situati più all'interno della struttura a doppia elica. Notare, i solchi maggiore e minore che si formano con questa disposizione.

Duplicazione

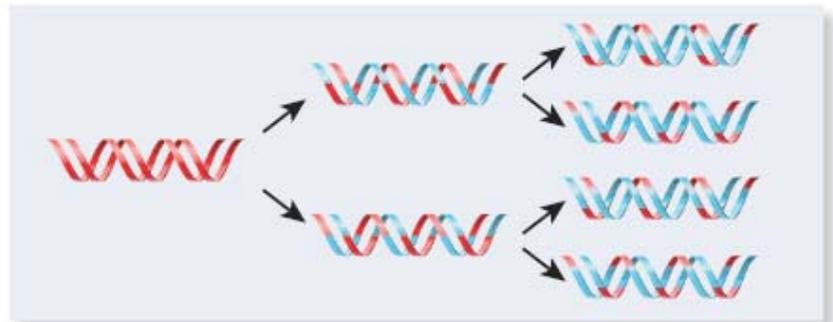
- 3 modelli diversi per la duplicazione del DNA proposti alla fine del 1950
 - Semiconservativo
 - Conservativo
 - Dispersivo
- I filamenti di nuova generazione sono i filamenti figli
- I filamenti originari sono i filamenti parentali



(a) Meccanismo semiconservativo. La replicazione del DNA produce delle molecole di DNA con 1 filamento parentale e 1 filamento di nuova generazione.



(b) Meccanismo conservativo. La replicazione del DNA produce 1 doppia elica con tutti e due i filamenti parentali, e un'altra doppia elica formata dai 2 filamenti di nuova generazione.



(c) Meccanismo dispersivo. La replicazione del DNA produce dei filamenti di DNA in cui al posto dei frammenti di nuova generazione sono sparsi nei filamenti di DNA parentale.

Figura 11.12 I tre meccanismi di replicazione del DNA. I filamenti della doppia elica originaria sono colorati in rosso. Sono stati prodotti dei nuovi filamenti in due cicli di replicazione; questi nuovi filamenti sono colorati in blu.

- Nel 1958, Matthew Meselson e Franklin Stahl idearono esperimenti per differenziare tra i 3 meccanismi proposti
- L'azoto esiste comunemente in forma leggera (^{14}N) e in una forma più rara pesante (^{15}N)
- Crescere *E.coli* in terreno con soltanto ^{15}N
- Poi passare ad un terreno con soltanto ^{14}N
- Raccogliere un campione dopo ogni generazione
- I filamenti originali parentali saranno ^{15}N mentre i filamenti di nuova generazione saranno ^{14}N
- I risultati sono consistenti con il meccanismo semi-conservativo

1 Crescere i batteri nei terreni con ^{15}N .

2 Trasferire i batteri in un terreno con ^{14}N e proseguire la crescita per <1, 1, 2, o 3 generazioni.

4 Osservare il DNA che si colora alla luce UV.

3 Isolare il DNA dopo ogni generazione. Trasferire il DNA su gradiente di CsCl, e centrifugare.

5 I DATI

Generazioni approssimative dopo il trasferimento nel terreno con ^{14}N .

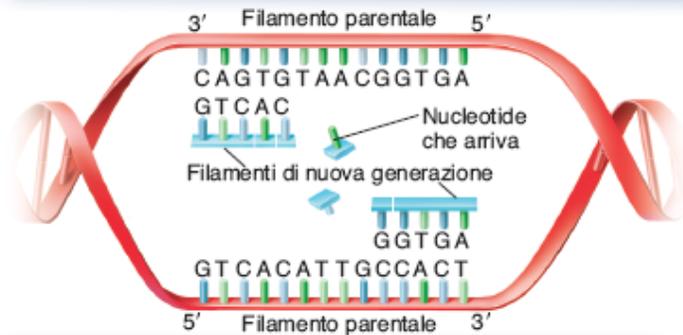
Figura 11.13 Esperimento di Meselson e Stahl che dimostra che la replicazione del DNA è semiconservativa.

- Durante la duplicazione i 2 filamenti parentali si separano e funzionano da filamenti stampo
- I nuovi nucleotidi devono obbedire alla regola AT/GC
- Alla fine si producono 2 nuove doppie eliche con la stessa sequenza di basi dell'originale

1 Sequenza della doppia elica del DNA prima della replicazione.



2 I filamenti di DNA si separano. I nucleotidi si legano ai filamenti parentali secondo la regola AT/GC e sono legati insieme per formare i filamenti di nuova generazione.



3 Il processo procede per produrre 2 doppie eliche con la stessa sequenza di basi.

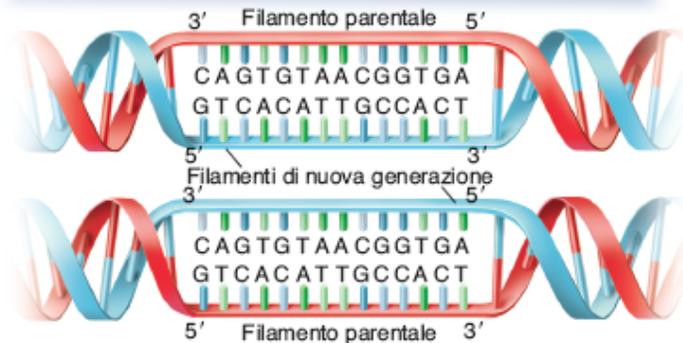
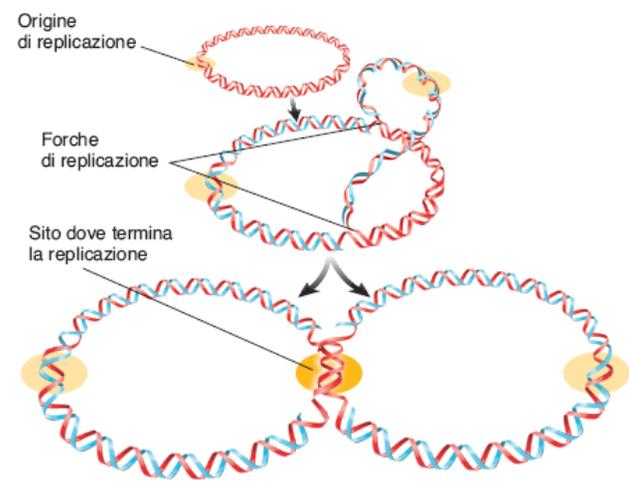
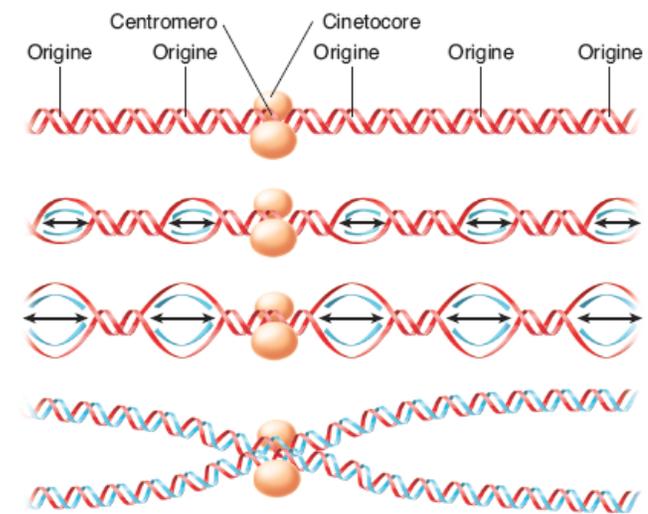


Figura 11.14 Replicazione del DNA secondo la regola AT/GC.

- Origine di duplicazione
 - Sito di inizio per la duplicazione
- Duplicazione bidirezionale
 - La duplicazione procede verso l'esterno in direzioni opposte
- I batteri hanno una singola origine
- Gli eucarioti richiedono origini multiple



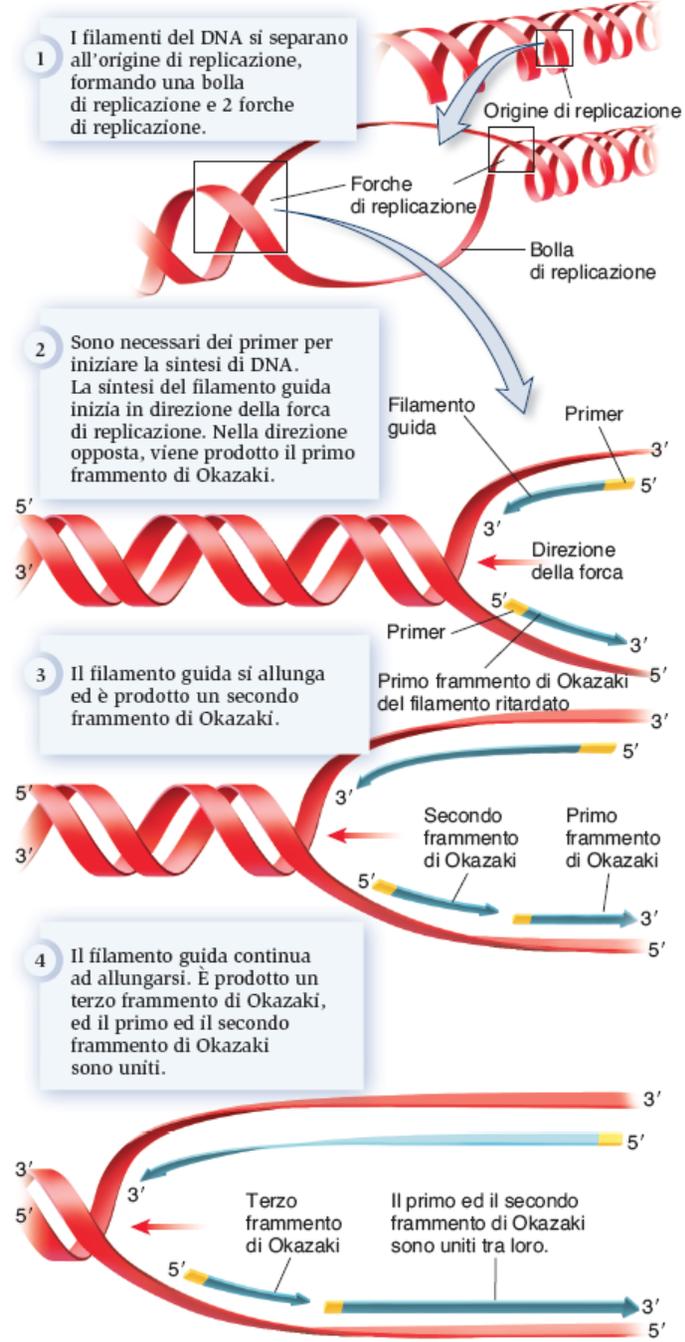
(a) Replicazione del cromosoma batterico



(b) Replicazione del cromosoma eucariotico

Figura 11.15 Origini di replicazione nei cromosomi di diversi organismi. (a) Nei batteri si trova un'unica origine di replicazione. (b) In un cromosoma eucariotico ci sono più origini di replicazione. La descrizione dei centromeri, dei cinetocori (proteine legate ai centromeri) e dei cromatidi fratelli è presente nel Capitolo 15.

- L'origine di duplicazione fornisce un'apertura chiamata bolla di duplicazione che forma due forche di replicazione
- La duplicazione del DNA avviene in prossimità della forca
- La sintesi inizia con un primer
- Procede da 5' a 3'
- Il filamento guida sintetizzato in direzione della forca si muove
 - Sintetizzato come una lunga molecola singola
- Il filamento ritardato sintetizzato come frammenti di Okazaki che devono poi essere uniti



- DNA elicasi
 - Si lega al DNA e viaggia da 5' a 3' usando ATP per separare il filamento e muovere la forca in avanti
- DNA topoisomerasi
 - Svolge l'ulteriore avvolgimento davanti alla forca di duplicazione
- Proteine che si legano al filamento singolo
 - Mantengono i filamenti parentali aperti per poter agire da stampo

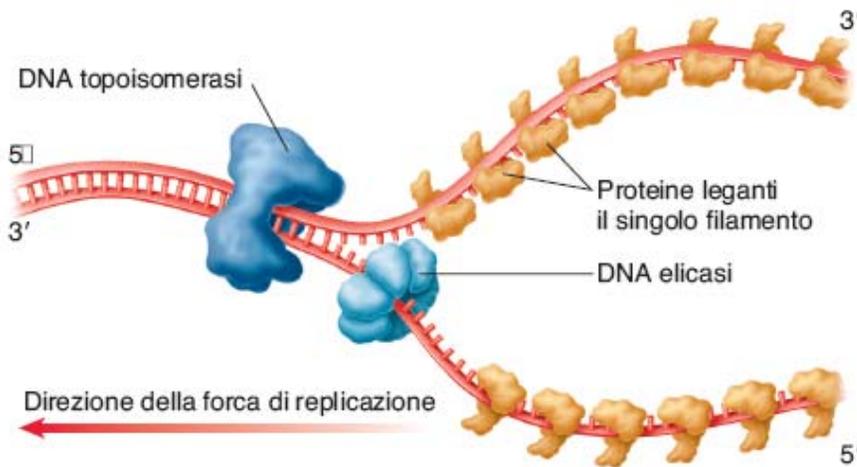
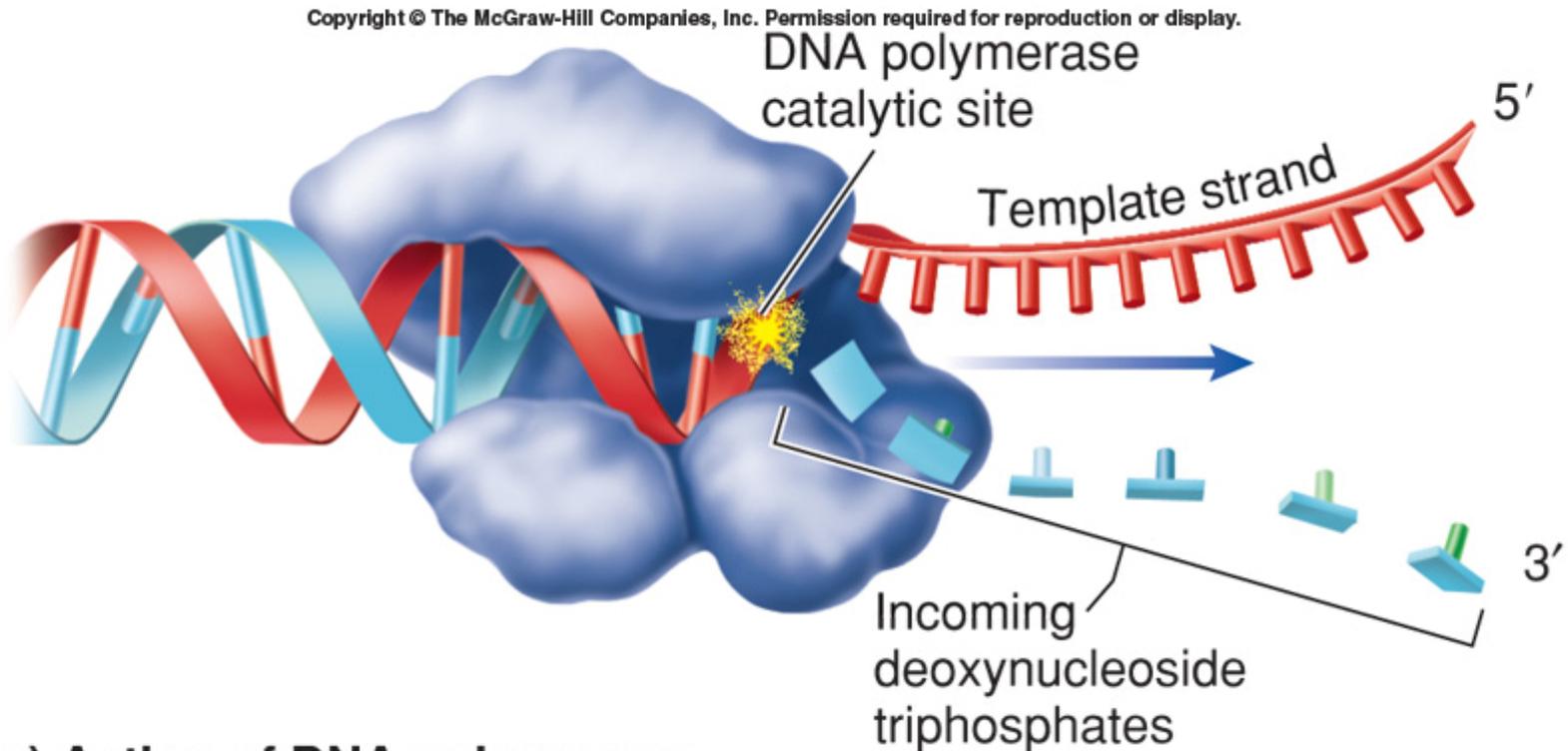


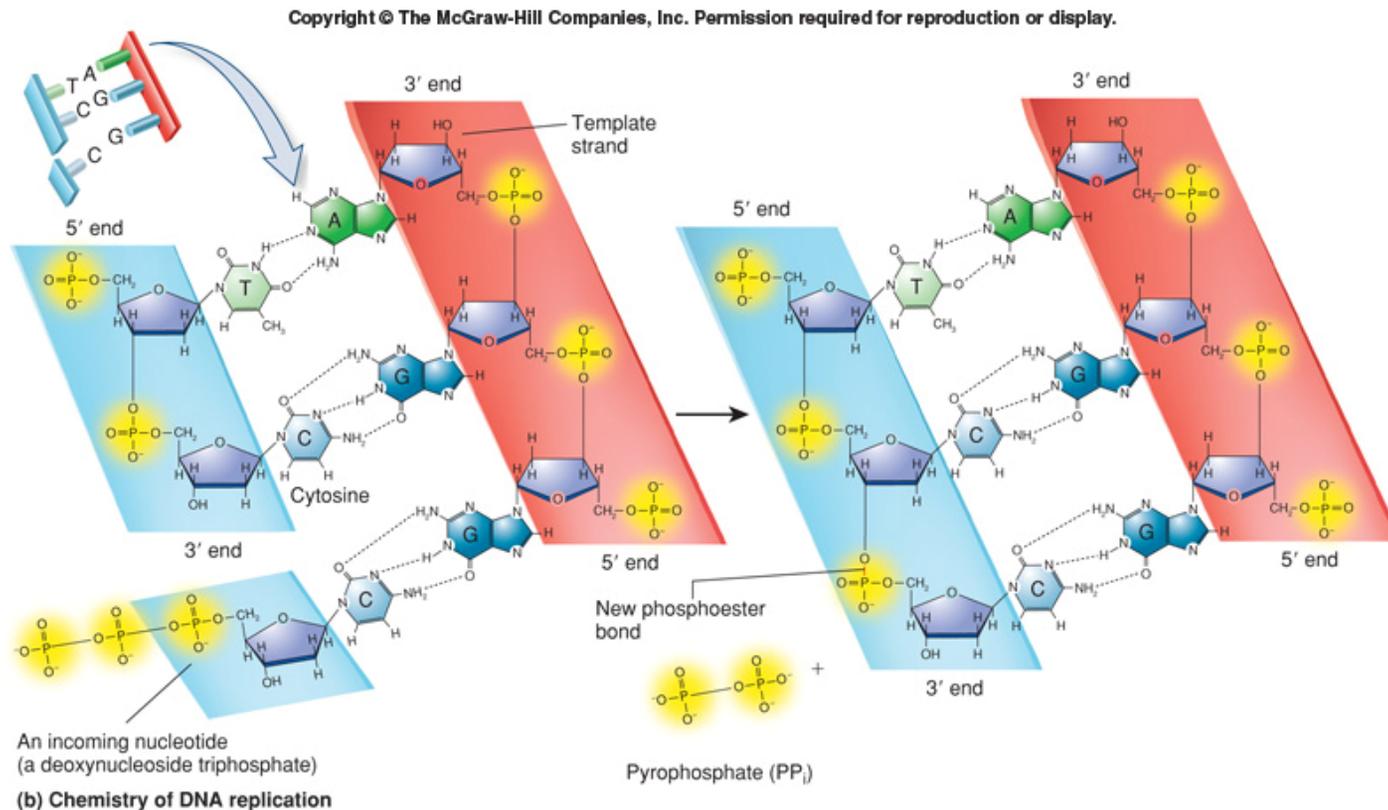
Figura 11.17 Proteine che facilitano la formazione e il movimento della forca di replicazione. La DNA elicasi scorre lungo un filamento di DNA in direzione 5'-3' e separa i filamenti del DNA. Dopo che i filamenti sono separati, le proteine leganti il filamento singolo rivestono i filamenti di DNA perché non si riformi una doppia elica. La topoisomerasi scorre poco più avanti della forca di replicazione in modo da ridurre gli avvolgimenti prodotti dall'azione dell'elicasi.

- DNA polimerasi
 - Lega in modo covalente i nucleotidi
- Desossinucleosidi trifosfato



(a) Action of DNA polymerase

- Desossinucleosidi trifosfato
 - Nucleotidi liberi con 3 gruppi fosfato
 - La rottura di legame covalente rilascia pirofosfato (2 gruppi fosfato) fornendo energia per connettere i nucleotidi adiacenti



- DNA polimerasi possiede 2 caratteristiche enzimatiche per spiegare i filamenti guida e ritardato
 1. DNA polimerasi è incapace di iniziare la sintesi di DNA su un filamento stampo nudo
 - DNA primasi deve fare un corto primer di RNA
 - Il primer di RNA sarà rimosso e sostituito successivamente con DNA
 2. DNA polimerasi può funzionare soltanto in direzione 5' to 3'

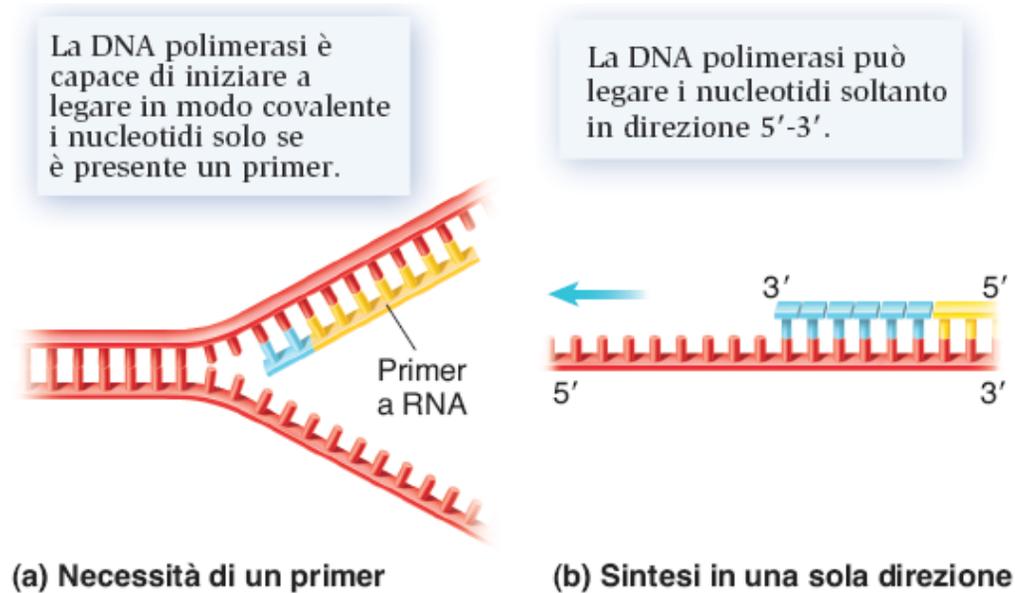
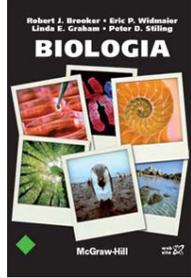
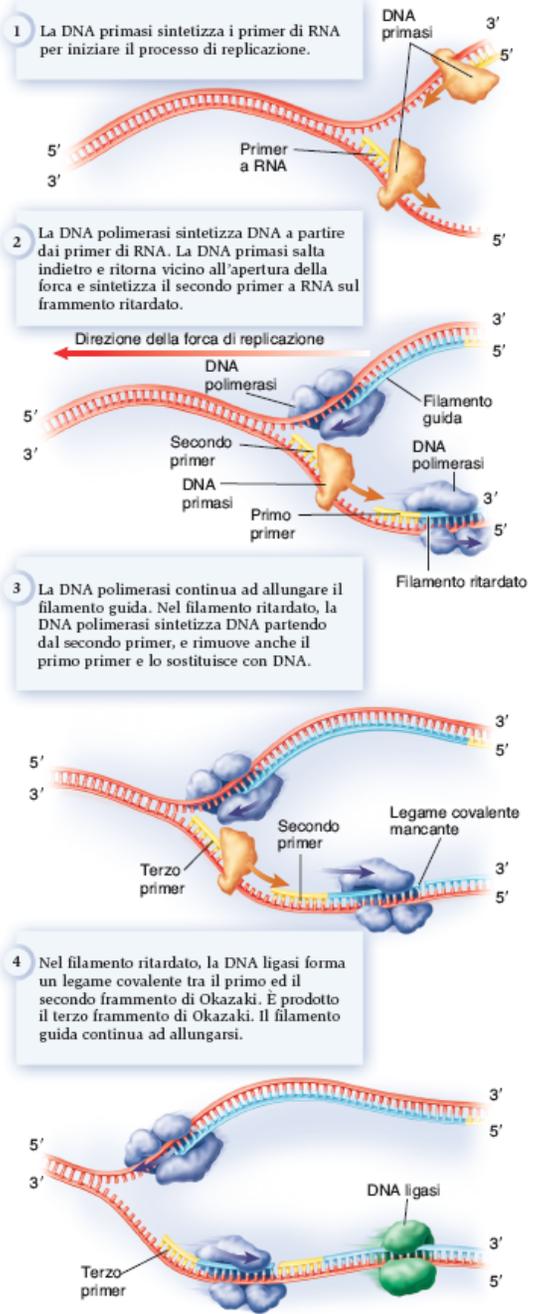


Figura 11.19 **Caratteristiche enzimatiche della DNA polimerasi.** (a) La DNA polimerasi ha bisogno di un primer per iniziare la sintesi di DNA e (b) può sintetizzare DNA solo in direzione 5'-3'.



- Nel filamento guida
 - DNA primasi sintetizza un primer di RNA
 - DNA polimerasi attacca i nucleotidi in direzione 5'-3' non appena si muove in avanti
- Nel filamento ritardato
 - DNA sintetizzato da 5' a 3' ma nella direzione opposta alla forza
 - I frammenti di Okazaki generati come un corto primer di RNA fatto dalla DNA primasi all'estremità 5' e poi il DNA sintetizzato dalla DNA polimerasi
 - I primer di RNA sono rimossi dalla DNA polimerasi e riempiti con DNA
 - DNA ligasi unisce I frammenti adiacenti di DNA



La duplicazione del DNA è molto accurata

- 3 ragioni
 - Legame ad idrogeno tra A e T o G e C è più stabile rispetto a basi non appaiate in modo non corretto
 - È improbabile che il sito attivo della DNA polimerasi formi legami se le coppie di basi sono sbagliate
 - La DNA polimerasi rimuove gli appaiamenti non corretti
 - Risultati a prova di errore perchè la DNA polimerasi torna indietro e digerisce i legami non corretti
 - Altri enzimi di riparo del DNA