

Flusso dell'informazione e regolazione dell'espressione genica

Il dogma centrale della Biologia

Duplicazione

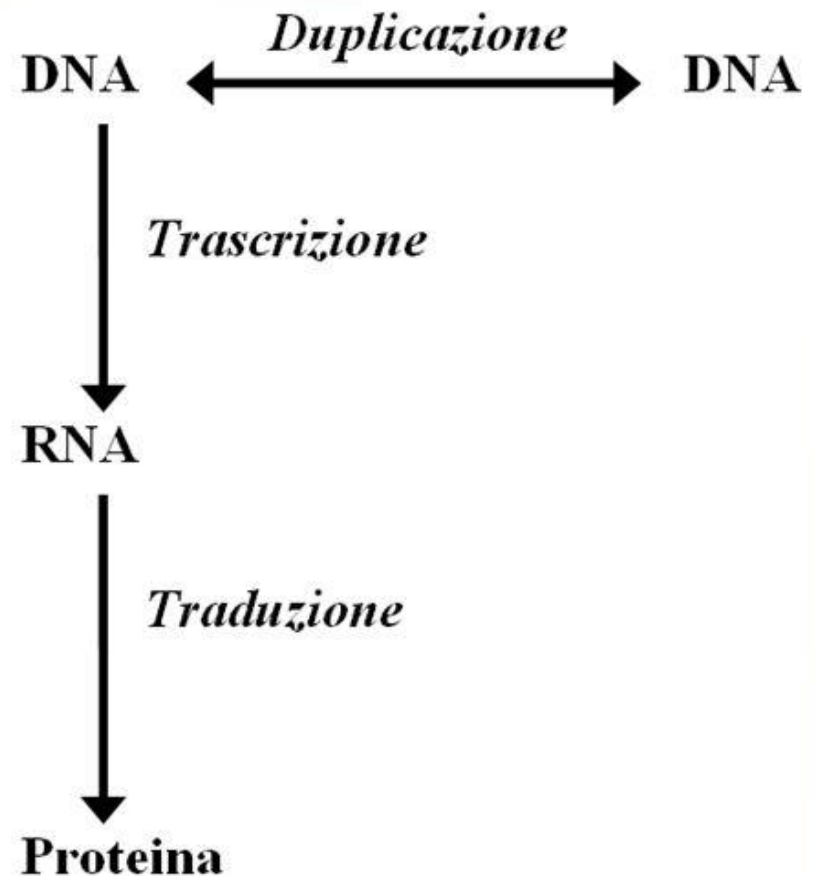
Porta alla formazione di nuove molecole di DNA e al trasferimento di materiale genetico.

Trascrizione

L'informazione contenuta nel DNA passa alle molecole di RNA.

Traduzione

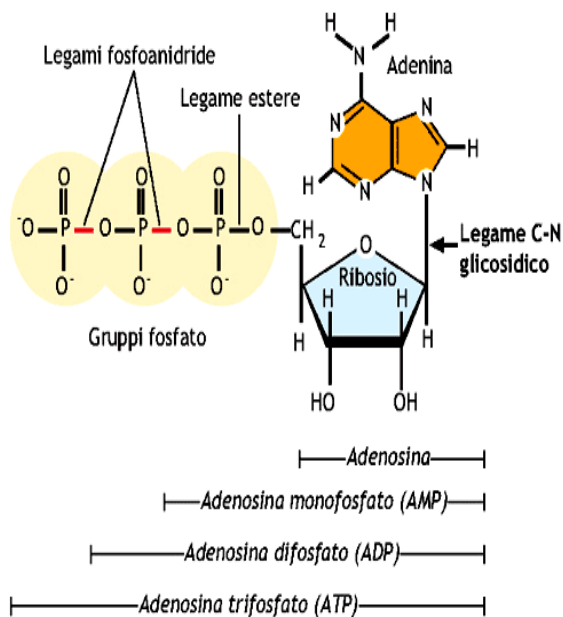
Processo finale in cui dall'RNA si arriva alla sintesi delle proteine.

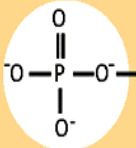
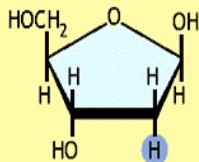
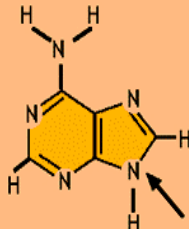
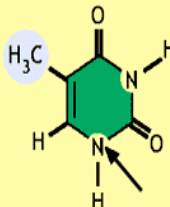
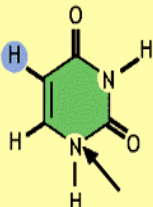
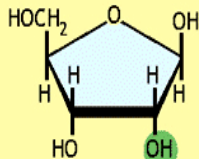
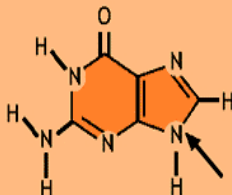
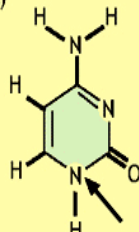
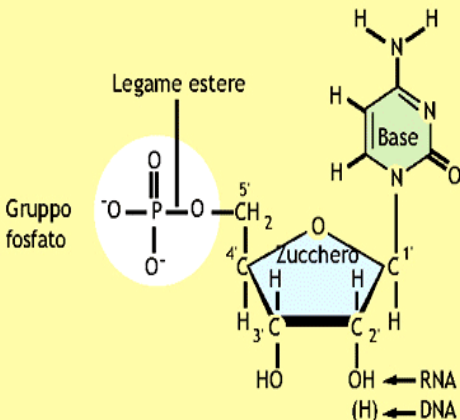


Replicazione (duplicazione) del DNA



**polimeri di nucleotidi
che sono costituiti da
basi puriniche e
pirimidiniche legate a
zuccheri fosforilati.**



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

■ **Figura 1.48** Elementi che costituiscono un nucleotide: gruppo fosfato; zucchero a 5 atomi di carbonio: D-ribosio (nell'RNA) o D-desossiribosio (nel DNA); basi azotate (le frecce indicano gli atomi di azoto impegnati nel legame con lo zucchero).



Legame fosfodiesterico tra le basi

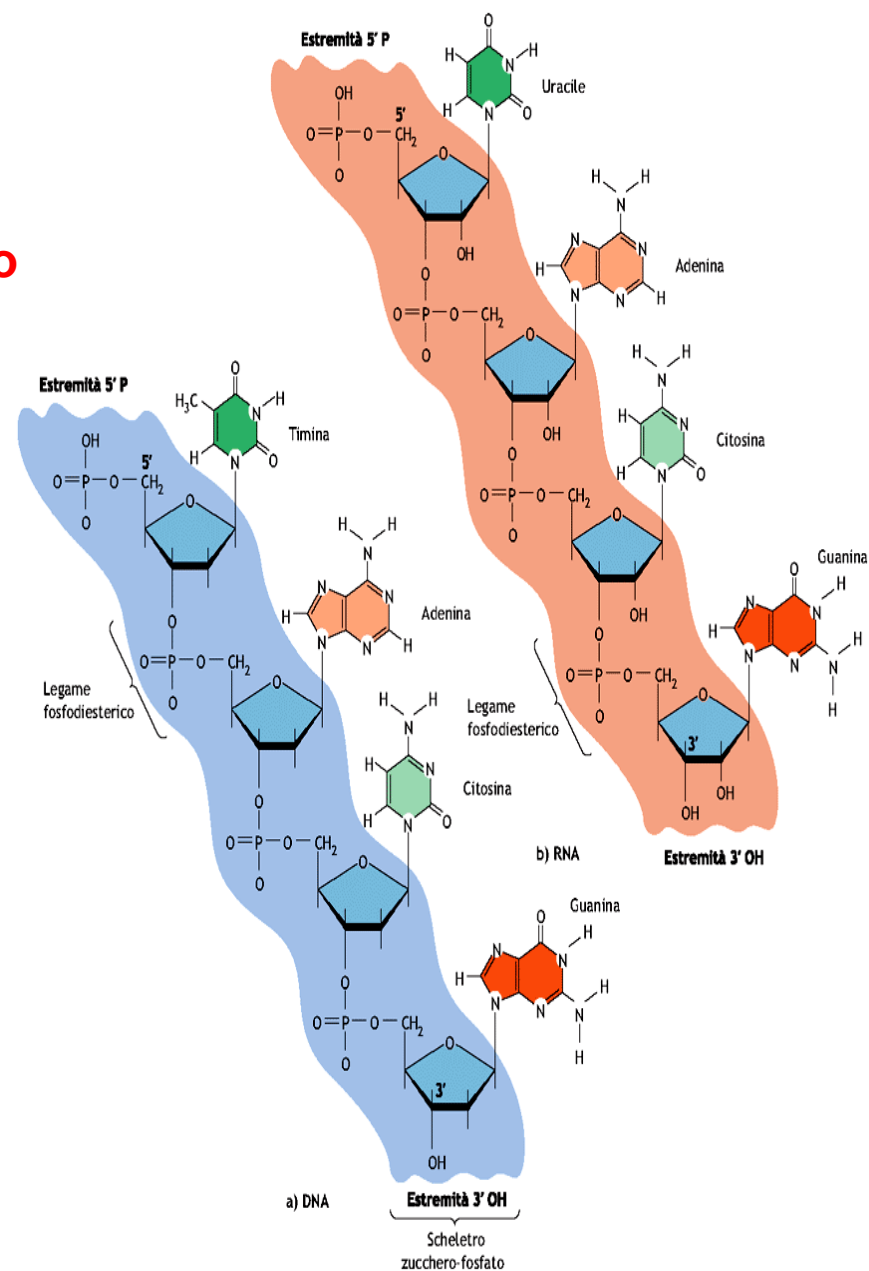
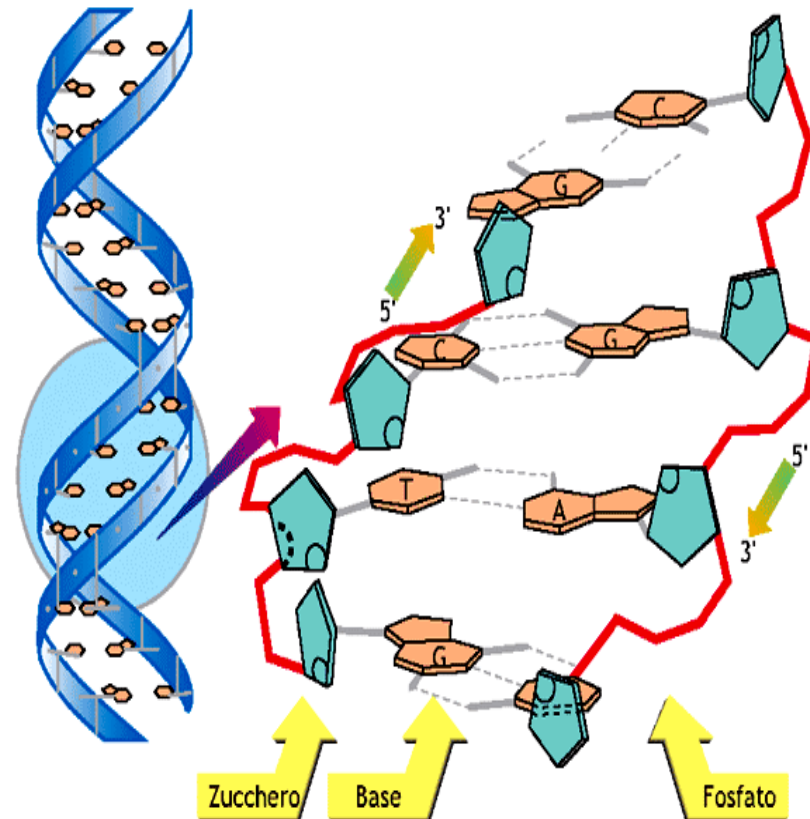


Figura 1.50 Costruzione di una singola elica. Gli acidi nucleici sono costituiti da catene lineari di nucleotidi uniti fra loro grazie ad un ponte fosfodiesterico che si instaura tra l'estremità 3' OH del primo nucleotide e l'estremità 5' P del secondo. Un polinucleotide così costituito ha, per convenzione, una polarità 5' P \rightarrow 3' OH. Sia nel DNA che nell'RNA, lo scheletro è rappresentato dal regolare alternarsi di molecole di zucchero e di acido fosforico, da cui sporgono le basi azotate.



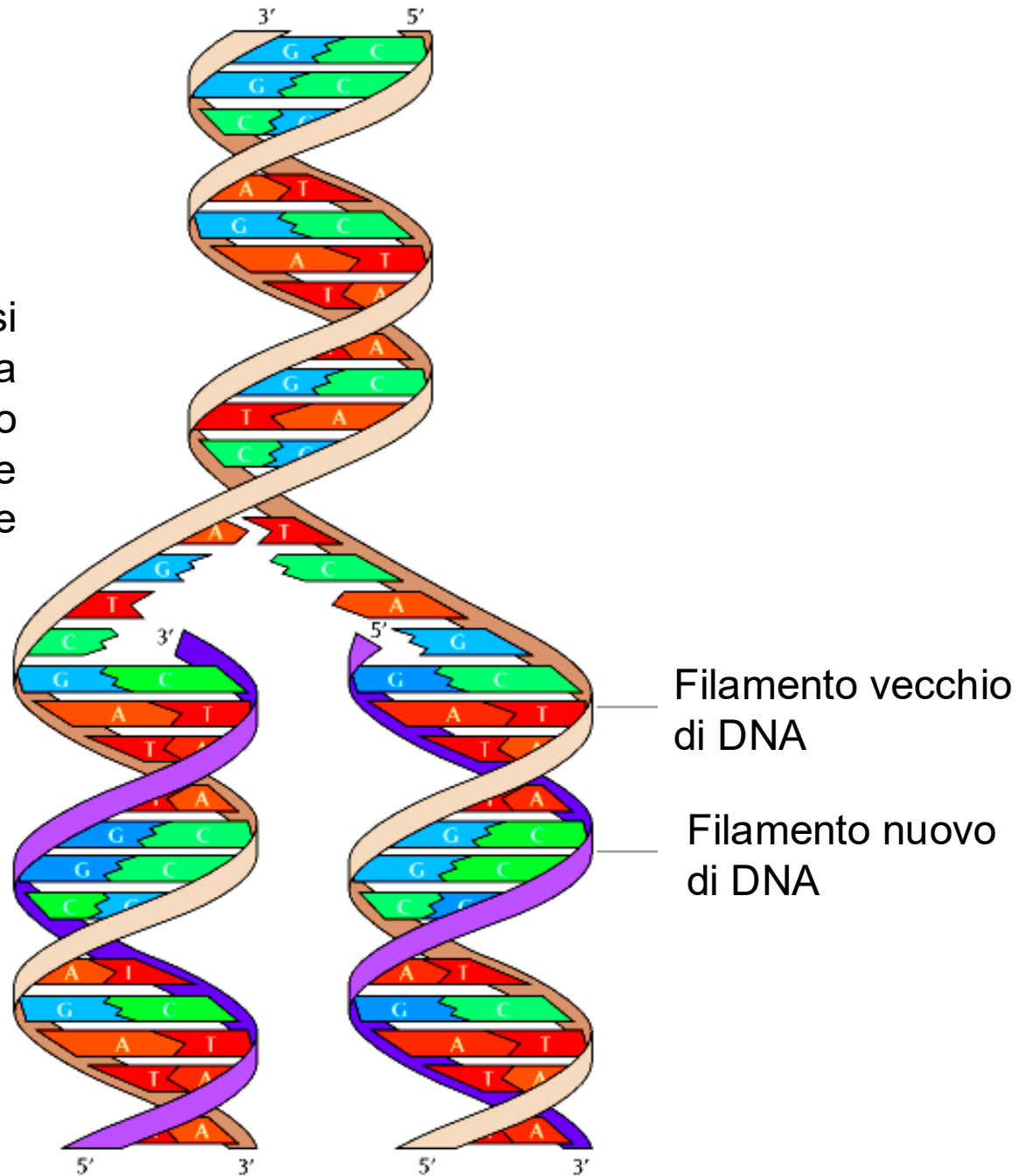
Antiparallelismo dei filamenti del DNA

■ **Figura 1.52** L'antiparallelismo consente la formazione di legami idrogeno fra le basi complementari. Grazie all'orientamento antiparallelo delle due eliche, le basi azotate si trovano nella giusta posizione per formare legami idrogeno corretti (notare la posizione del legame C-N glicosidico rispetto al piano del foglio).



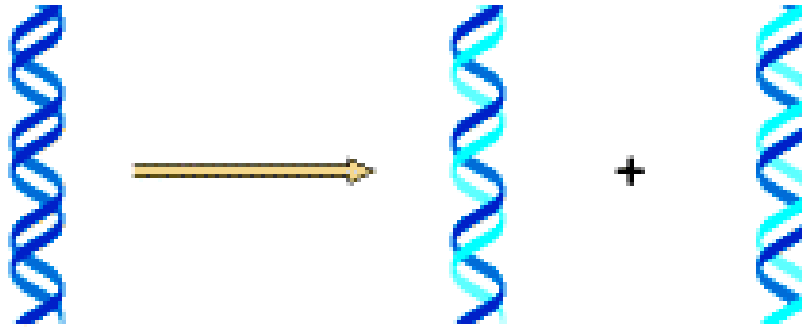
Replicazione semiconservativa del DNA.

I due filamenti di DNA parentale si separano e ciascuno serve da stampo per la sintesi di un nuovo filamento figlio che avviene mediante accoppiamento delle basi.

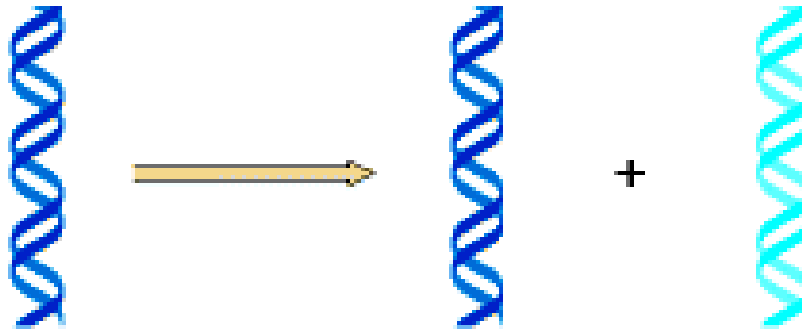


Modelli di replicazione del DNA

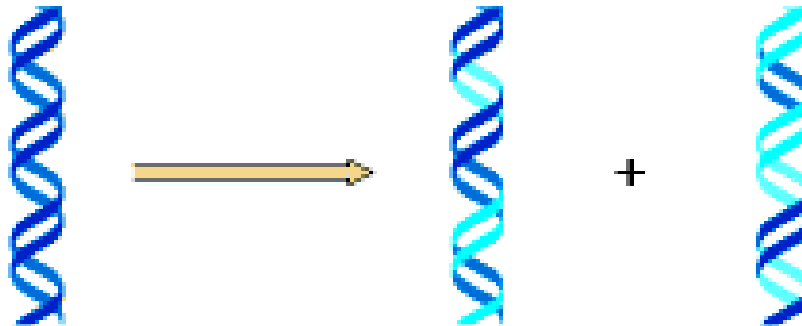
Semiconservativo



Conservativo



Dispersivo

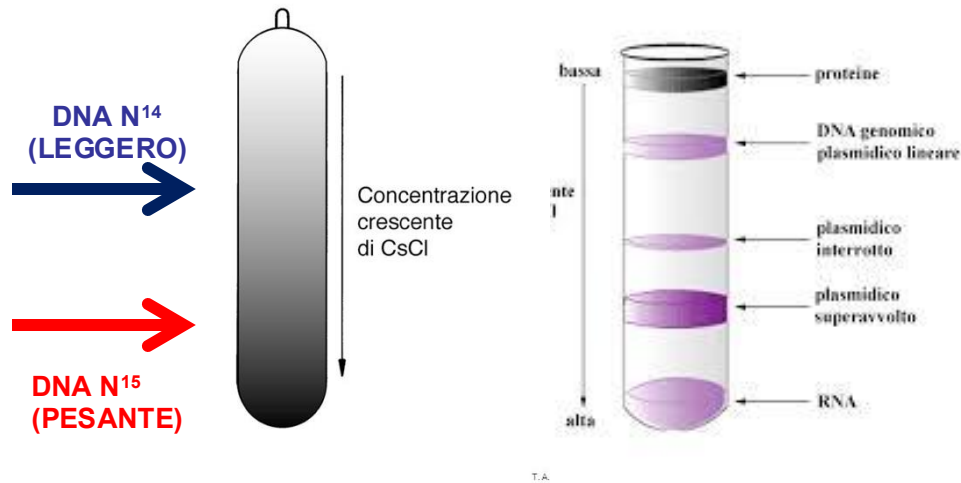


- L'azoto-15 (N^{15}) viene usato per tracciare l'azoto nei processi biologici e chimici, come nell'esperimento di **Meselson e Stahl** per dimostrare la **replicazione semiconservativa del DNA**.
- L'azoto-14 (N^{14}), con 7 protoni e 7 neutroni, per un totale di 14 particelle nel nucleo (numero di massa), è **l'isotopo più comune**
- L'azoto-15 (N^{15}) è un **isotopo stabile dell'azoto**, con 7 protoni e 8 neutroni. È più pesante del più comune isotopo N^{14} .

Centrifugazione gradiente di densità

- Mezzi comunemente usati:
- Saccarosio (**analisi dei ribosomi**);
- Cloruro di cesio 6 M (**analisi del DNA**).
- Gradiente di densità corrisponde al gradiente di concentrazione di saccarosio o cloruro di cesio.
- Si prepara il gradiente prima (saccarosio- concentrazione dipende dalla densità di ciò che si vuole separare) oppure si forma durante la centrifugazione (cloruro di cesio).
- Ultracentrifugazione: fino a 1.000.000 g / 3- 24 ore
- **Dopo la centrifugazione le molecole/virus/organelli non si troveranno sul fondo della provetta ma si posizioneranno nel gradiente in base alla loro densità (densità= massa / volume) (molecole con densità minore si posizioneranno nella zona del gradiente a concentrazione più bassa- più in alto nella provetta).**

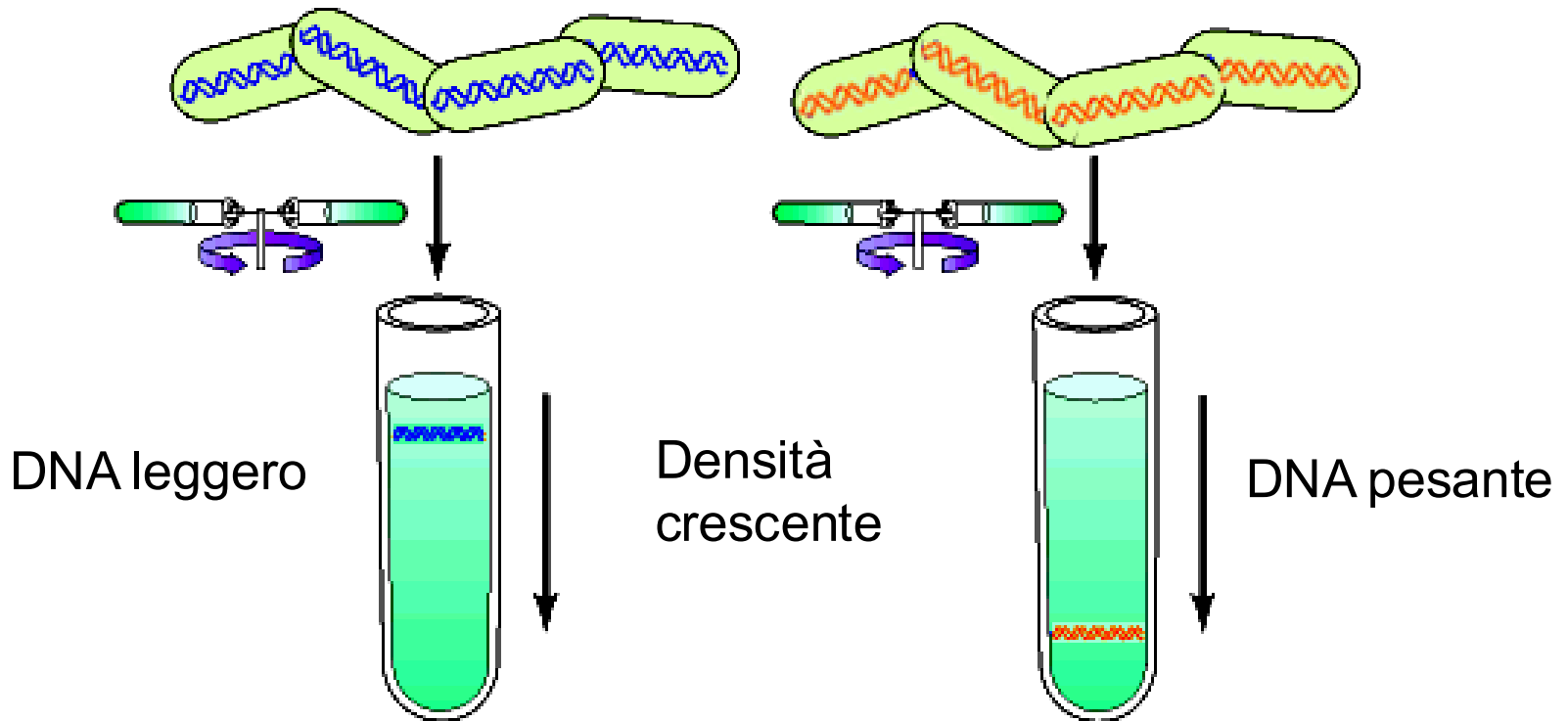
Gradiente di cloruro di cesio (usato nell'esperimento di Meselson e Stahl)



6M CsCl
100.000g

Esperimento di M. Meselson e F. Stahl, 1958

- 1) il DNA in *Escherichia coli* venne marcato con isotopi che ne alteravano la densità.
(Batteri cresciuti in un mezzo contenente ^{14}N e batteri cresciuti in un mezzo contenente ^{15}N)
- 2) Estrazione del DNA e centrifugazione in una soluzione di CsCl (Cloruro di cesio)



Esperimento di M. Meselson e F. Stahl, 1958

Coltura di E. coli

DNA in gradiente di CsCl

Inizio

Terreno
contenente ^{15}N



DNA
pesante
($^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$)

Continuazione della
crescita per una
generazione
in terreno ^{14}N



DNA ibrido
($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)

Primo ciclo di replicazione

Continuazione
della crescita per una
seconda generazione



DNA
leggero
($^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$)

DNA ibrido
($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)

Secondo ciclo di replicazione

Continuazione
della crescita per una
terza generazione



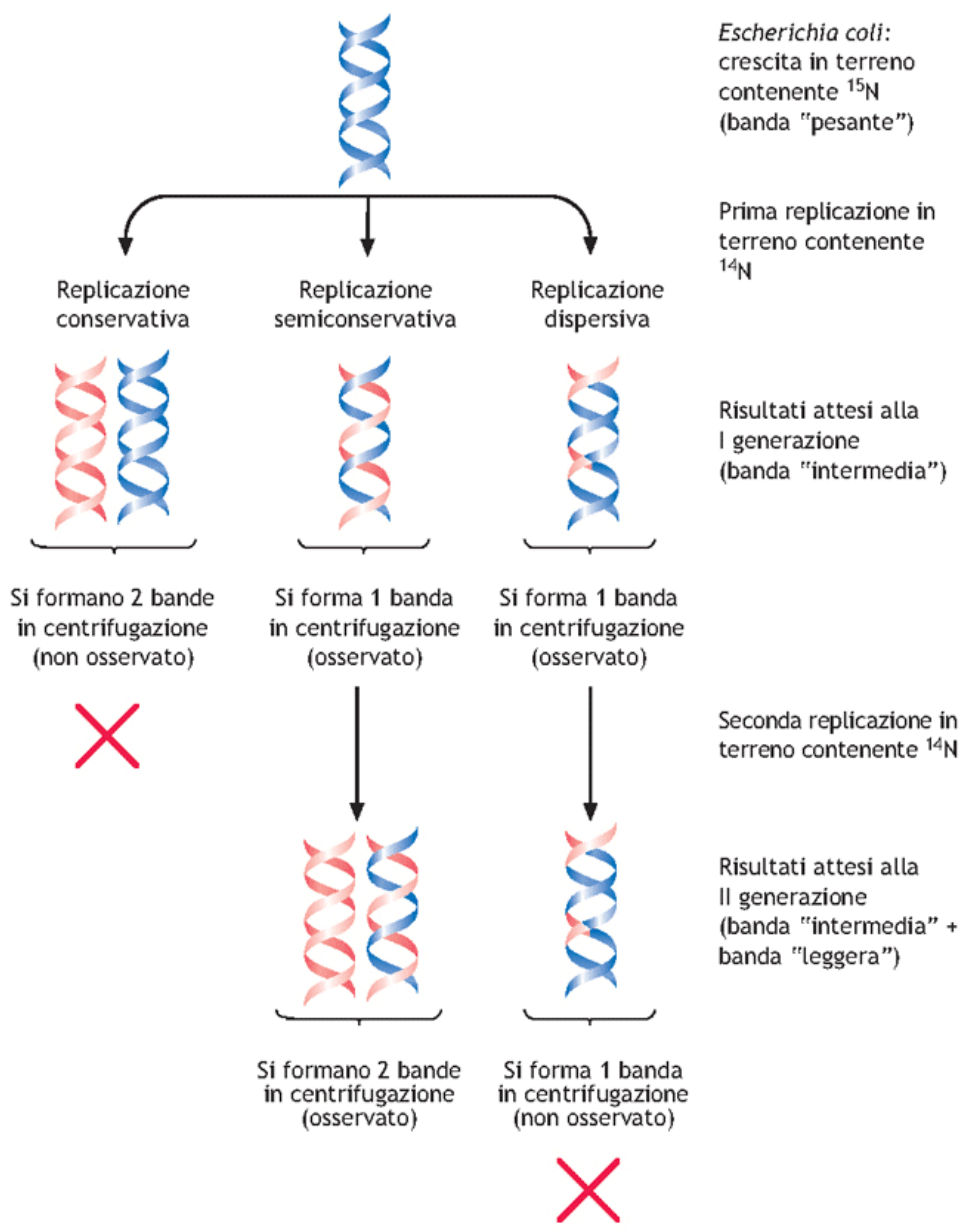
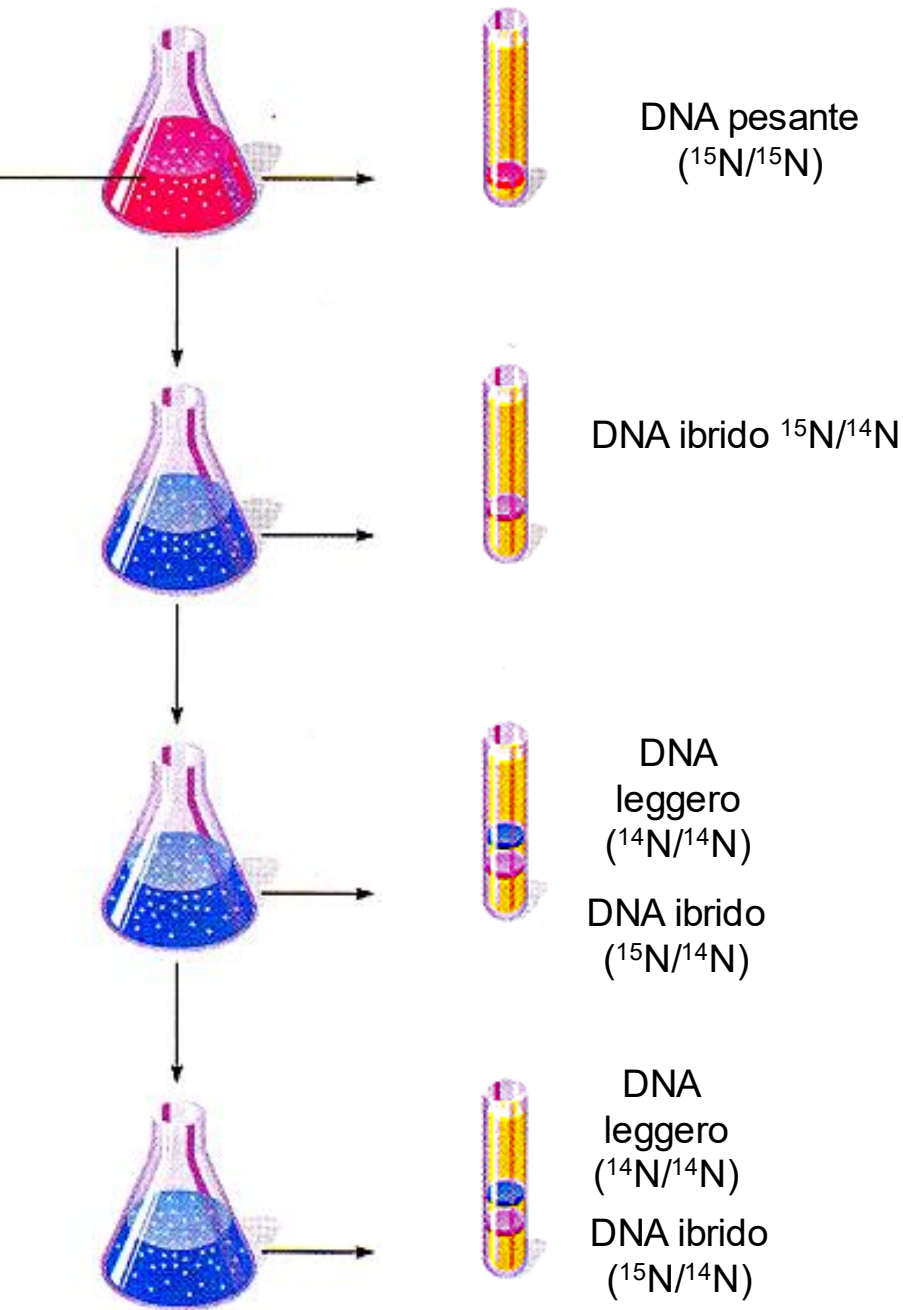
DNA
leggero
($^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$)

DNA ibrido
($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)

Terzo ciclo di replicazione

Coltura di E. coli

DNA in gradiente di CsCl



L'enzima coinvolto nella replicazione del DNA è la DNA polimerasi

Tutte le DNA polimerasi note hanno **due proprietà fondamentali in comune** che hanno implicazioni fondamentali per la replicazione del DNA:

1. sintetizzano DNA **soltanto in direzione 5'-3'**, aggiungendo dNTP al gruppo 3' ossidrilico di una catena in crescita;
2. non sono capaci di iniziare la sintesi di DNA catalizzando la polimerizzazione di dNTP liberi ma hanno bisogno di un filamento **primer** preformato che forma legami idrogeno con lo stampo.

Filamento vecchio usato come stampo Filamento nuovo che viene polimerizzato

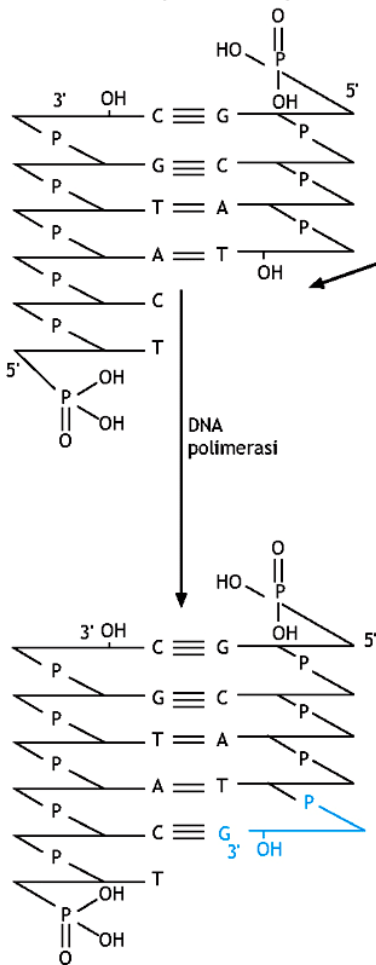
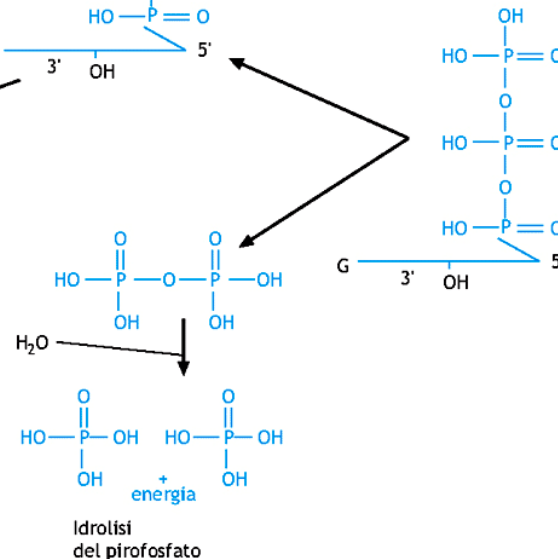


Figura 4.4 Chimica della polimerizzazione del DNA: un nucleoside trifosfato in 5' (G) riconosce, per complementarità delle basi, C. In seguito alla liberazione del pirofosfato e, successivamente del fosfato, si forma il legame fosfodiesterico. La polimerizzazione in direzione 5'P → 3'OH continua con l'aggiunta di A.



Replicazione del DNA- enzima DNA polimerasi

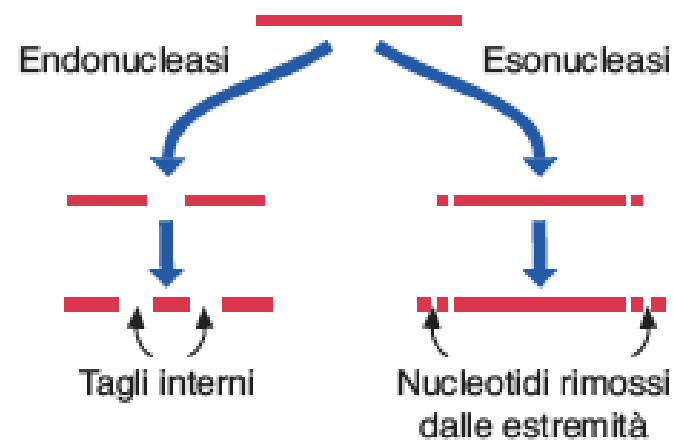
DNA Polimerasi procariotiche ed eucariotiche

Enzimi	Direzione della sintesi	Attività esonucleasica	Funzioni possibili
Procarioti			
Polimerasi I	5' → 3'	5' → 3' 3' → 5'	riempimento dei “gap” lasciati dalla rimozione dell’innesco; riparazione del DNA
<i>Polimerasi II</i>	5' → 3'	5' → 3' 3' → 5'	<i>riempimento dei “gap” lasciati dalla rimozione dell’innesco;</i> <i>riparazione del DNA</i>
Polimerasi III	5' → 3'	3' → 5'	enzima principale della replicazione
Eucarioti			
Polimerasi α	5' → 3'	5' → 3'	enzima principale della replicazione (con la Polimerasi δ); riparazione del DNA
Polimerasi β	5' → 3'	nessuna	riparazione del DNA
Polimerasi γ	5' → 3'	3' → 5'	enzima principale della repl. nei mitocondri e cloroplasti
Polimerasi δ	5' → 3'	3' → 5'	enzima principale della replicazione (con la Polimerasi α)
Polimerasi ε	5' → 3'	3' → 5'	riparazione del DNA; <i>può cooperare con le Polimerasi α e δ nei meccanismi principali della replicazione</i>

A DNA polimerasi



B Nucleasi



C Ligasi

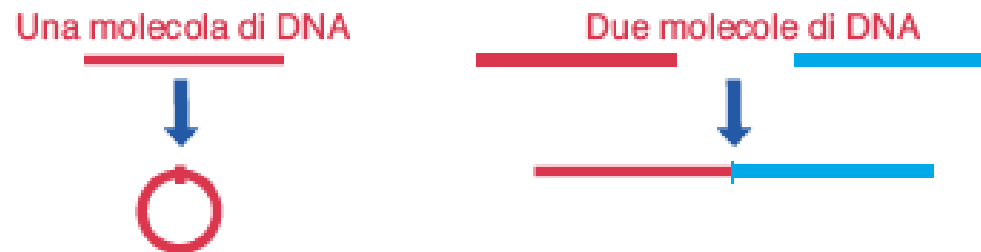


FIGURA 12.1 Attività delle DNA polimerasi (A), nucleasi (B) e ligasi (C).

Enzimi coinvolti della duplicazione del DNA (procarioti)

- Elicasi
- Topoisomerasi
- Primasi (RNA polimerasi- non ha bisogno di un innesco)
- DNA Polimerasi III
- DNA Polimerasi I
- Ligasi



Il nucleosoma è l'unità fondamentale della cromatina

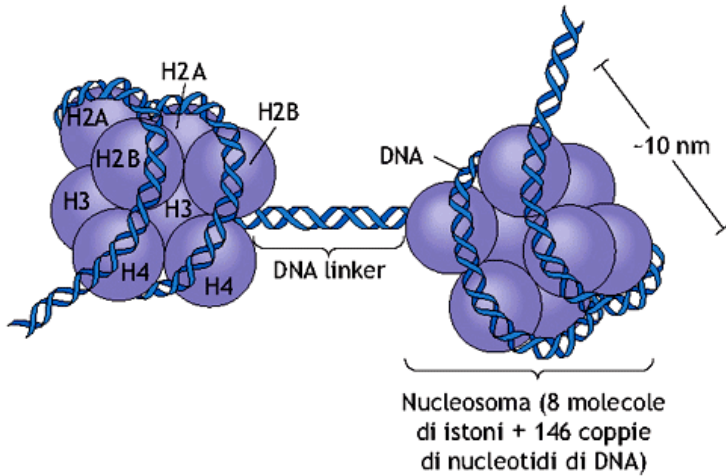


Figura 1.59 Struttura del nucleosoma. Ogni nucleosoma è costituito da un ottamero di istoni (due copie per ciascun istone H2A, H2B, H3, H4) associato a circa 146 coppie di nucleotidi con un tratto di DNA linker di circa 50 coppie di nucleotidi. Il diametro del nucleosoma, detto anche “perla”, è di circa 10 nm.

L'istone H1 stabilizza il nucleosoma

Nucleosoma completo

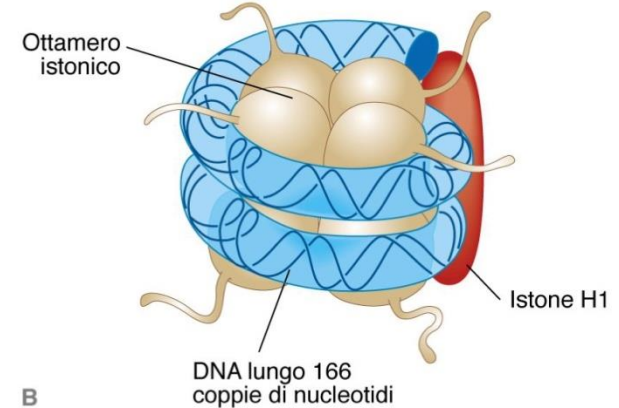


FIGURA 1.60 Istione H1. L'istione H1 svolge un ruolo essenziale nella successiva fase di compattamento del DNA che prevede l'avvicinamento delle “perle”. Ciò avviene grazie ad un legame testa-coda fra i vari istoni H1.



G. De Leo, S. Fasano, E. Ginelli
Biologia e Genetica, IV ed.
EdiSES Università

Il tratto di 146 è costante
mentre la lunghezza del linker può variare nei vari organismi

Negli eucarioti i nucleosomi si duplicano secondo una modalità conservativa degli ottameri

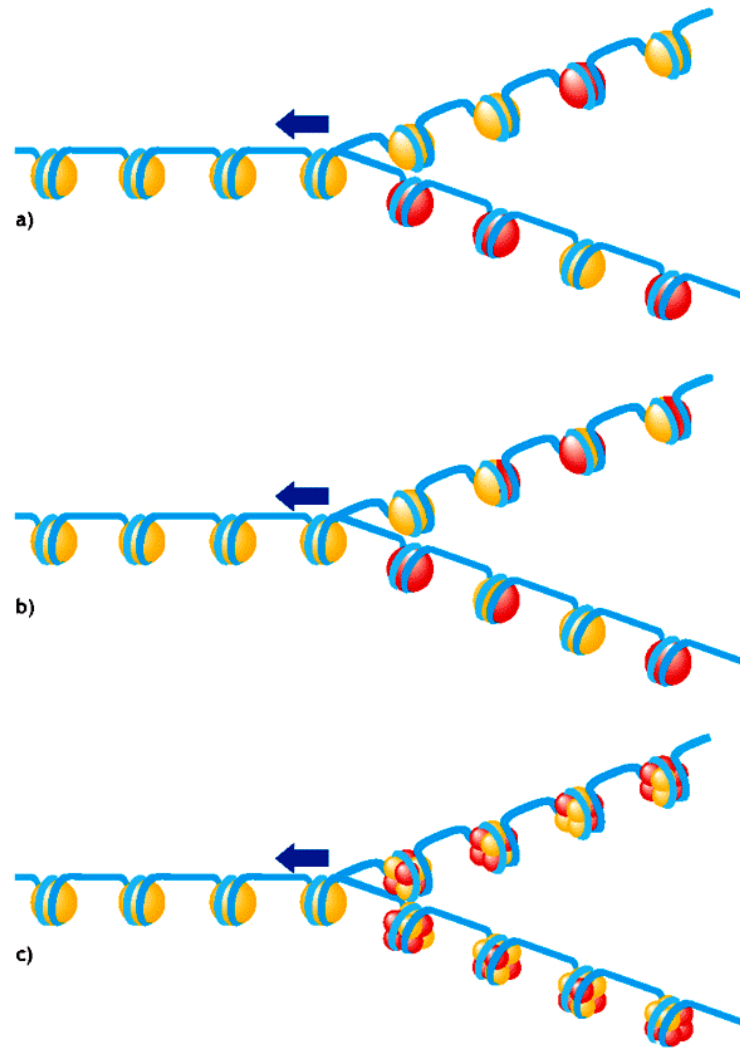


Figura 4.16 Modalità di ripetizione dei nucleosomi.
(a) Conservazione degli ottameri. (b) Conservazione di tetrameri. (c) Distribuzione casuale.