

GLI ESPERIMENTI FONDAMENTALI DELLA BIOLOGIA

Il DNA è il depositario dell'informazione genetica

1859-Charles Darwin pubblica il libro L'origine delle specie in cui propone la teoria dell'evoluzione

1866-Pubblicazione degli studi di Gregor Mendel sulle regole dell'ereditarietà- parla dell'esistenza di "fattori" coinvolti nella determinazione di caratteri, ma non identifica tali fattori

1869-Frederich Miescher, chimico e fisiologo svizzero, scopre un composto ricco di fosforo– nucleina- dal nucleo di leucociti

1882-Heinrich Wilhelm Gottfried von Waldeyer-Hartz) individua dei corpi che si colorano rapidamente all'interno del nucleo e che chiamano cromosomi (dal greco chroma, colore- soma- corpo) e Walther Flemming mostra come filamenti che lui chiamò cromatina (perché si visualizzano con coloranti specifici) vengono trasmessi alle cellule figlie.

1884-Morte di Mendel

1902-Walter S. Sutton descrive il comportamento dei cromosomi (studiò i cromosomi nelle cellule germinali di cavallette) suggerendo che corrispondano ai fattori descritti da Mendel e li associa alla nucleina, in quanto li vede scomparire in seguito all'estrazione della nucleina stessa.

1928 - Frederick Griffith scopre il “principio trasformante”

1944 - il DNA è il principio trasformante –Avery, Mac Leod, Mc Carty

1952- Dimostrato in maniera definitiva da Alfred Hershey e Marta Chase

1952- Chargaff- composizione del DNA /Wilkins e Franklin analisi DNA ai raggi X

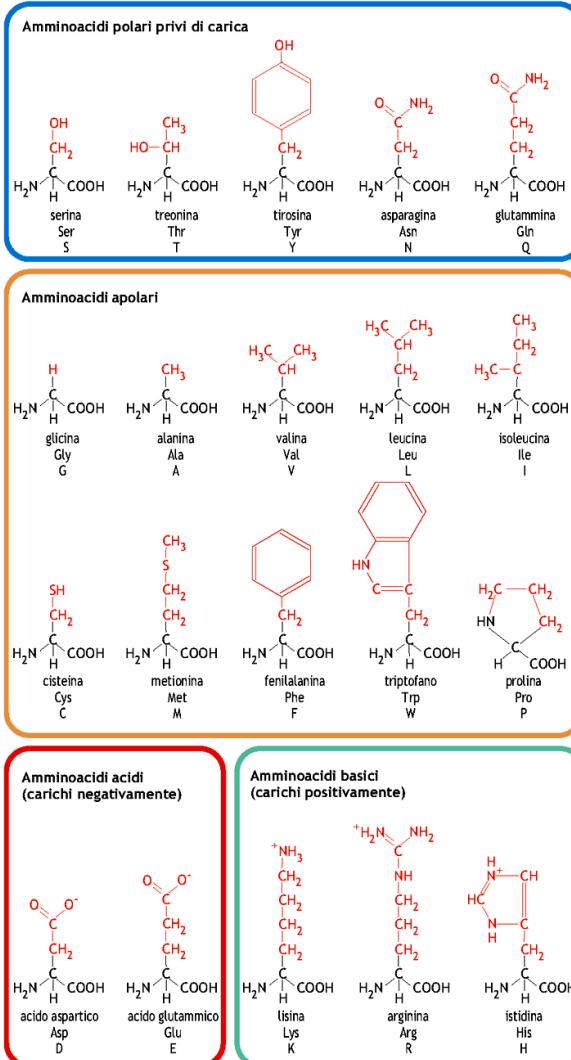
1953 - Watson e Crick – struttura del DNA.



I 22 amminoacidi

Selenocisteina: presente in batteri e in eucarioti, incluso l'uomo.

Pirrolisina:
nel sito attivo di enzimi presenti solo nei batteri

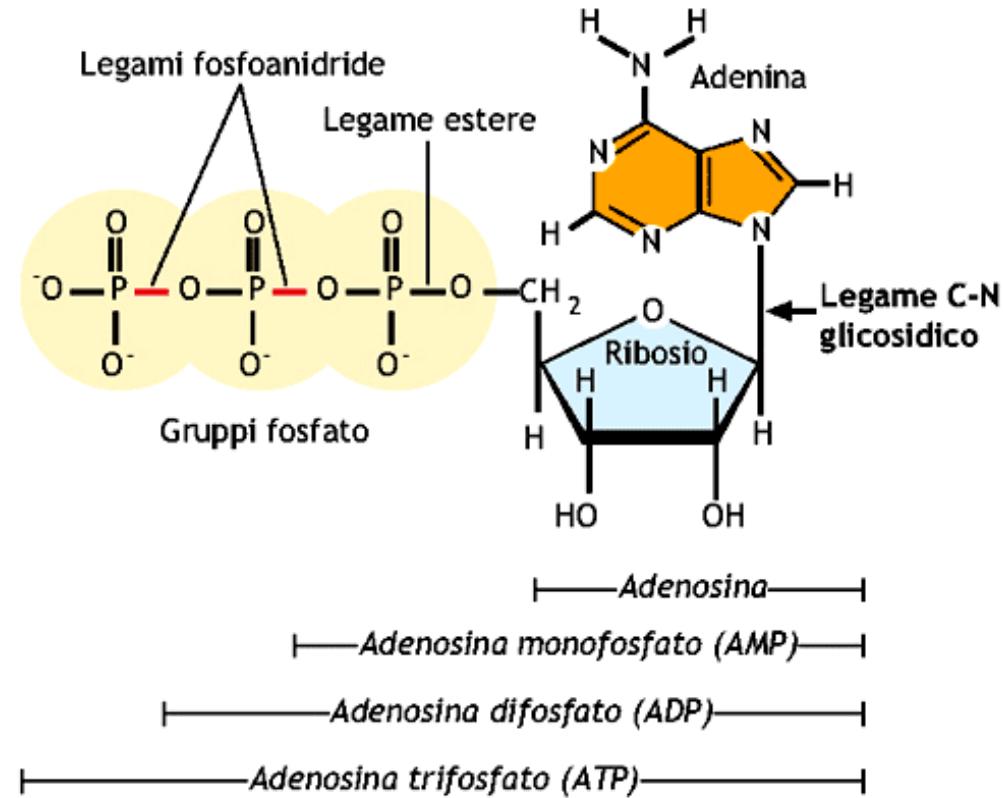


- Suddivisi in base alle caratteristiche del gruppo R in:**
- Polari
 - Apolari
 - Carichi negativamente
 - Carichi positivamente



ACIDI NUCLEICI: DNA E RNA

- DNA ed RNA sono macromolecole per l'immagazzinamento, la trasmissione e l'espressione dell'informazione genetica (DNA-RNA-PROTEINE, flusso dell'informazione genetica);
- Sono polimeri di **nucleotidi**;
- I nucleotidi sono costituiti da **basi azotate** (puriniche o pirimidiniche) legate ad uno zucchero (**ribosio** o **desossiribosio**) fosforilato;
- L'unità **base-zucchero** si chiama **nucleoside**.



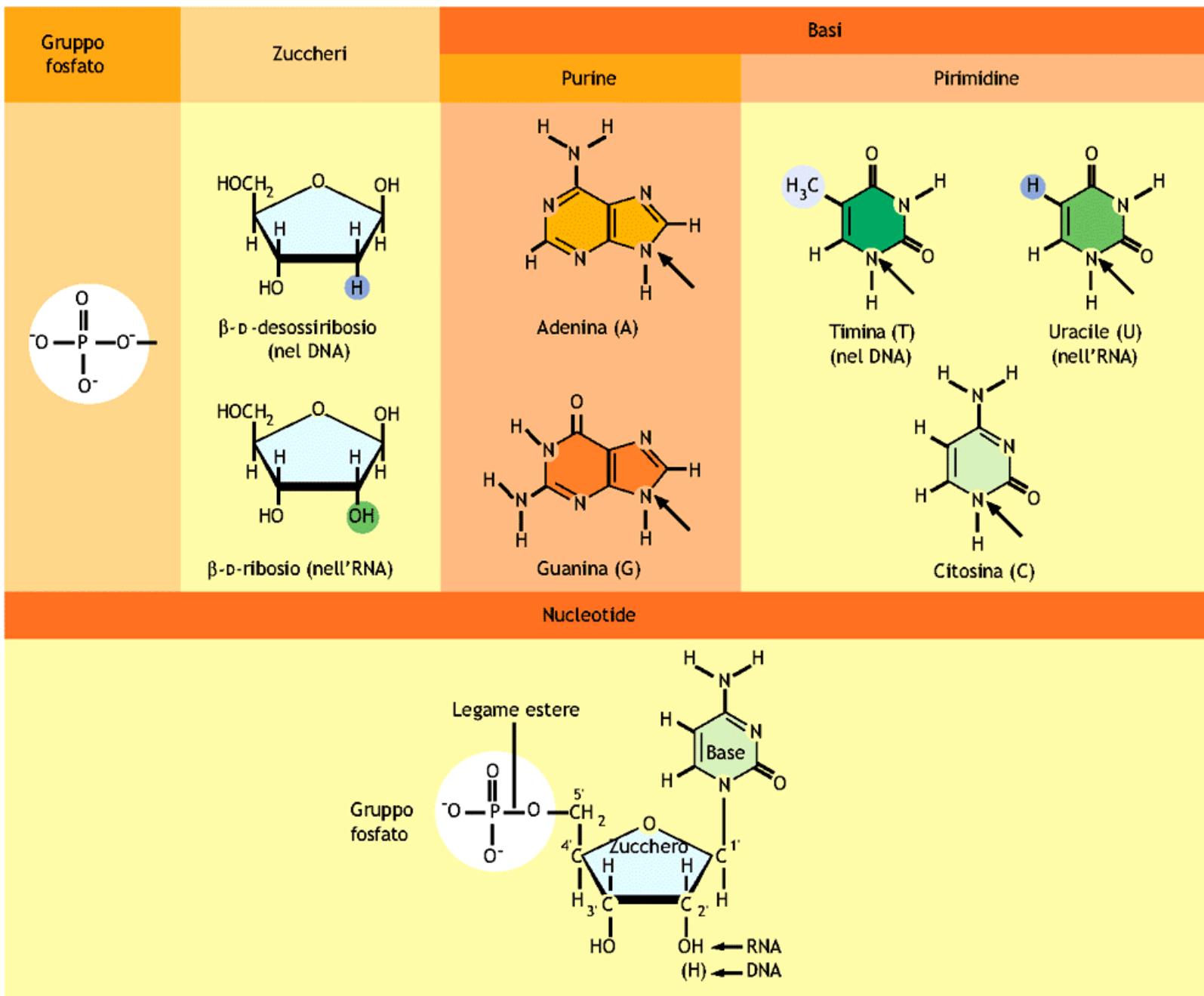
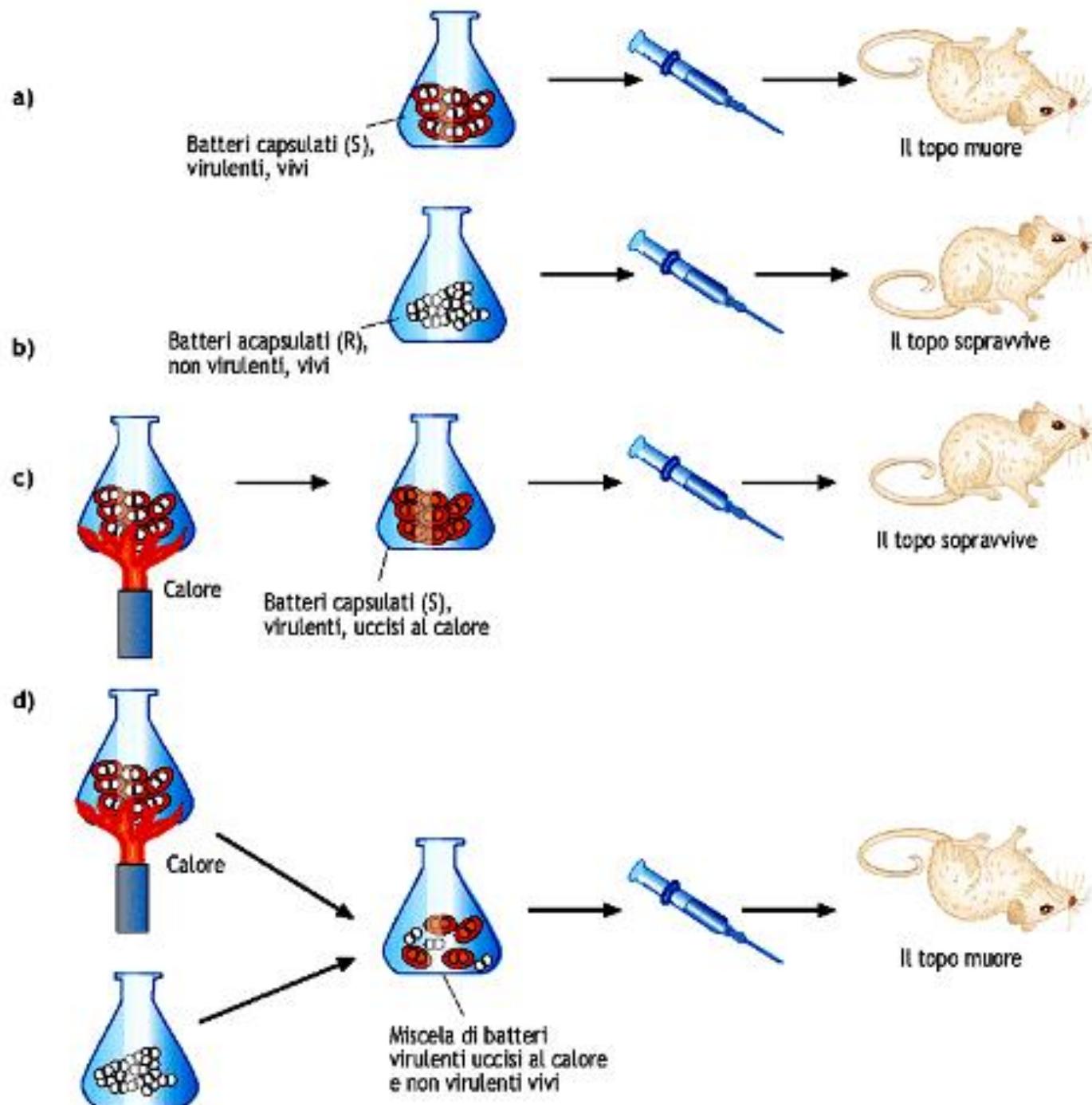


Figura 1.48 Elementi che costituiscono un nucleotide: gruppo fosfato; zucchero a 5 atomi di carbonio: D-ribosio (nell'RNA) o D-desossiribosio (nel DNA); basi azotate (le frecce indicano gli atomi di azoto impegnati nel legame con lo zucchero).

Esperimento di F. Griffith 1928



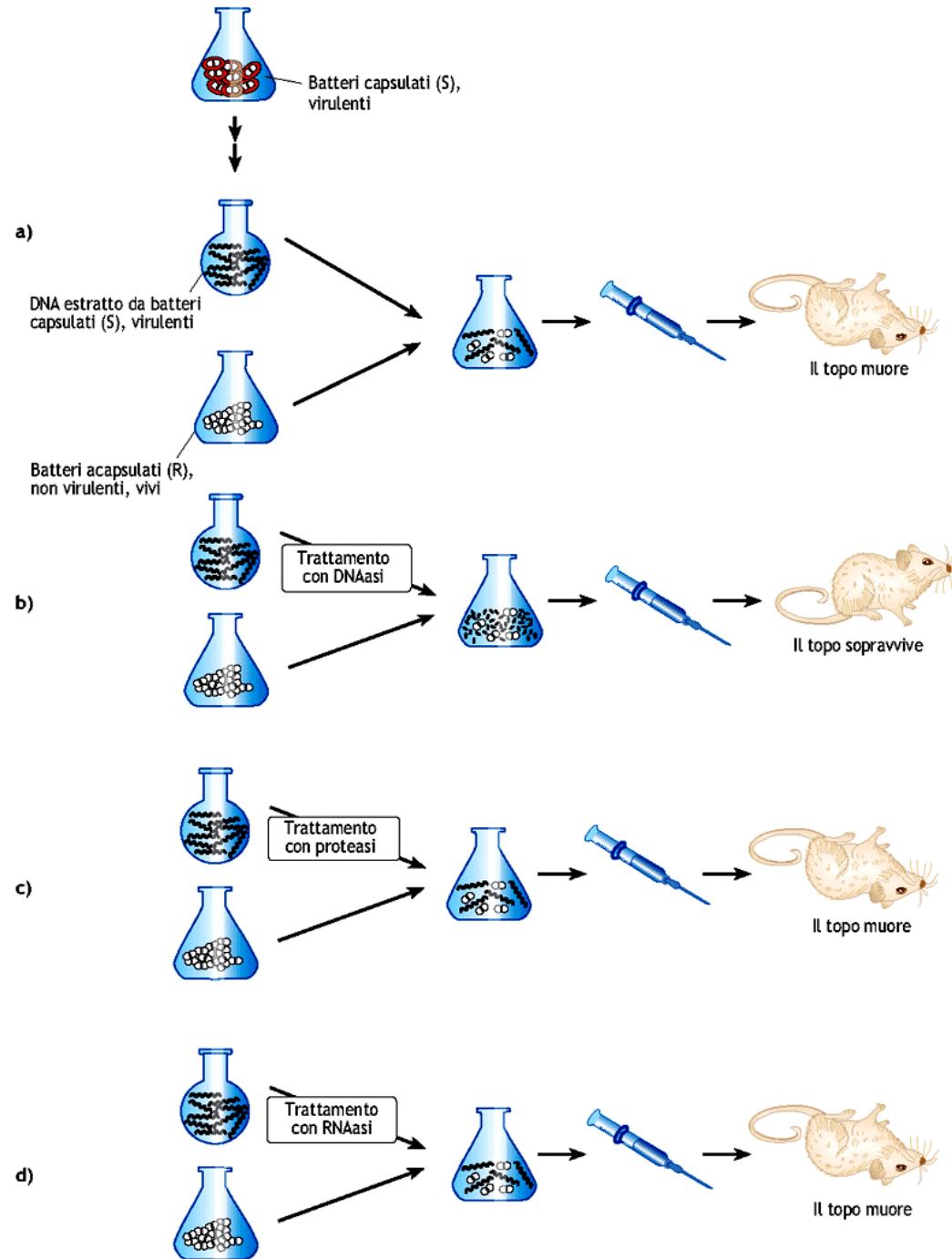
Nonostante il DNA fosse noto sin dal 1869, la sua identificazione come materiale genetico è avvenuta solo nel 1944 ed è intimamente legata agli studi sulla virulenza del microrganismo, il *Diplococcus pneumoniae*, o più semplicemente pneumococco, che causa la polmonite nei mammiferi.

I pneumococchi possono esistere in 2 varietà:

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

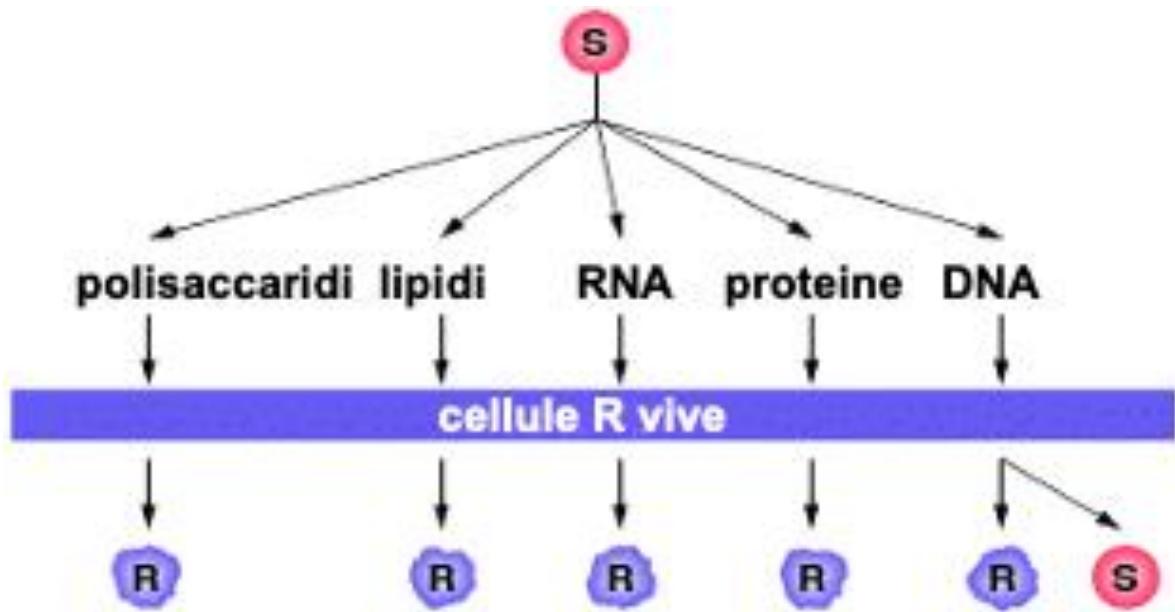
**PRINCIPIO
TRASFORMANTE**

Esperimento di O. Avery, C. MacLeod, M. McCarty, 1944: qual è il principio trasformante?



Primo esperimento: sottrazione

Esperimento di O. Avery, C. MacLeod, M. McCarty, 1944 qual è il principio trasformante?

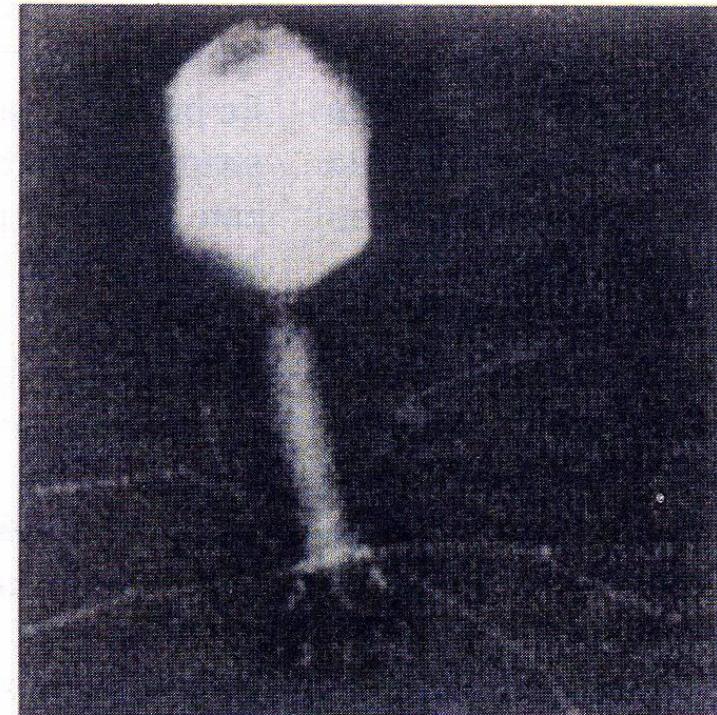
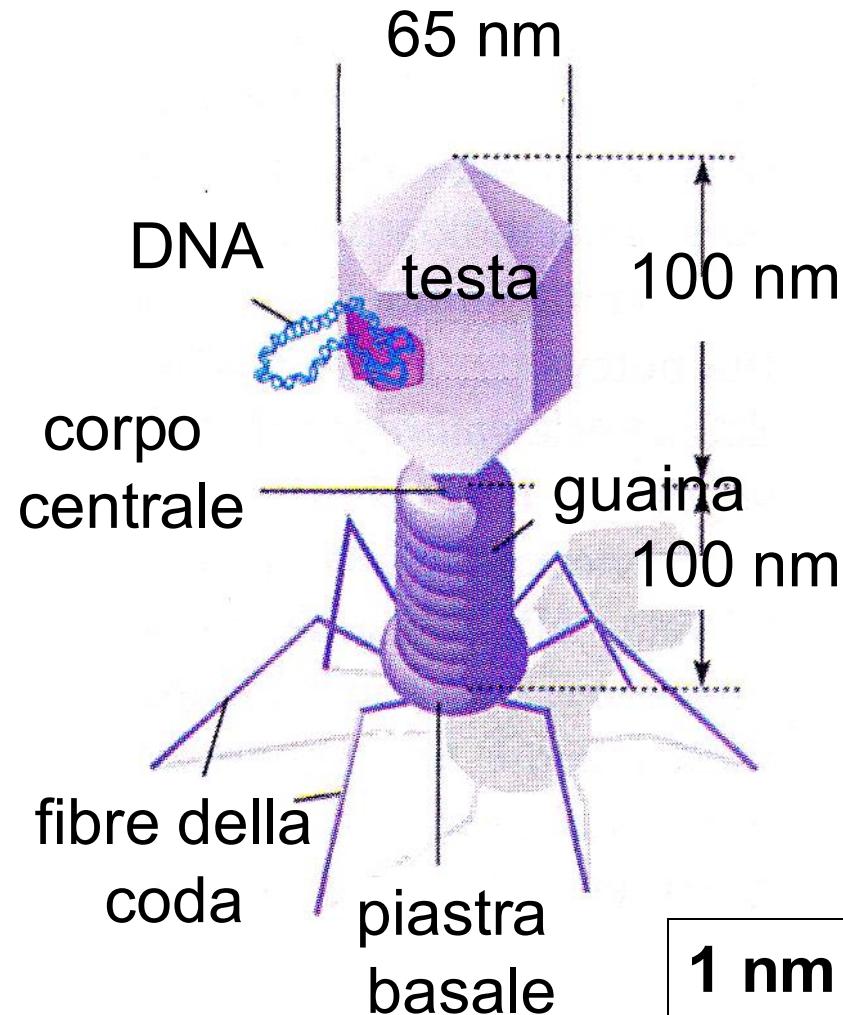


Secondo esperimento: addizione

Stabilirono che il principio trasformante era il DNA, purificandolo da estratti batterici e al tempo stesso dimostrando che l'attività del principio trasformante veniva eliminata dalla digestione enzimatica del DNA ma non dalla digestione delle proteine.

**Esperimento di Hershey e Chase, 1952:
dimostrazione che il DNA, e non le proteine, contiene l'informazione genetica**

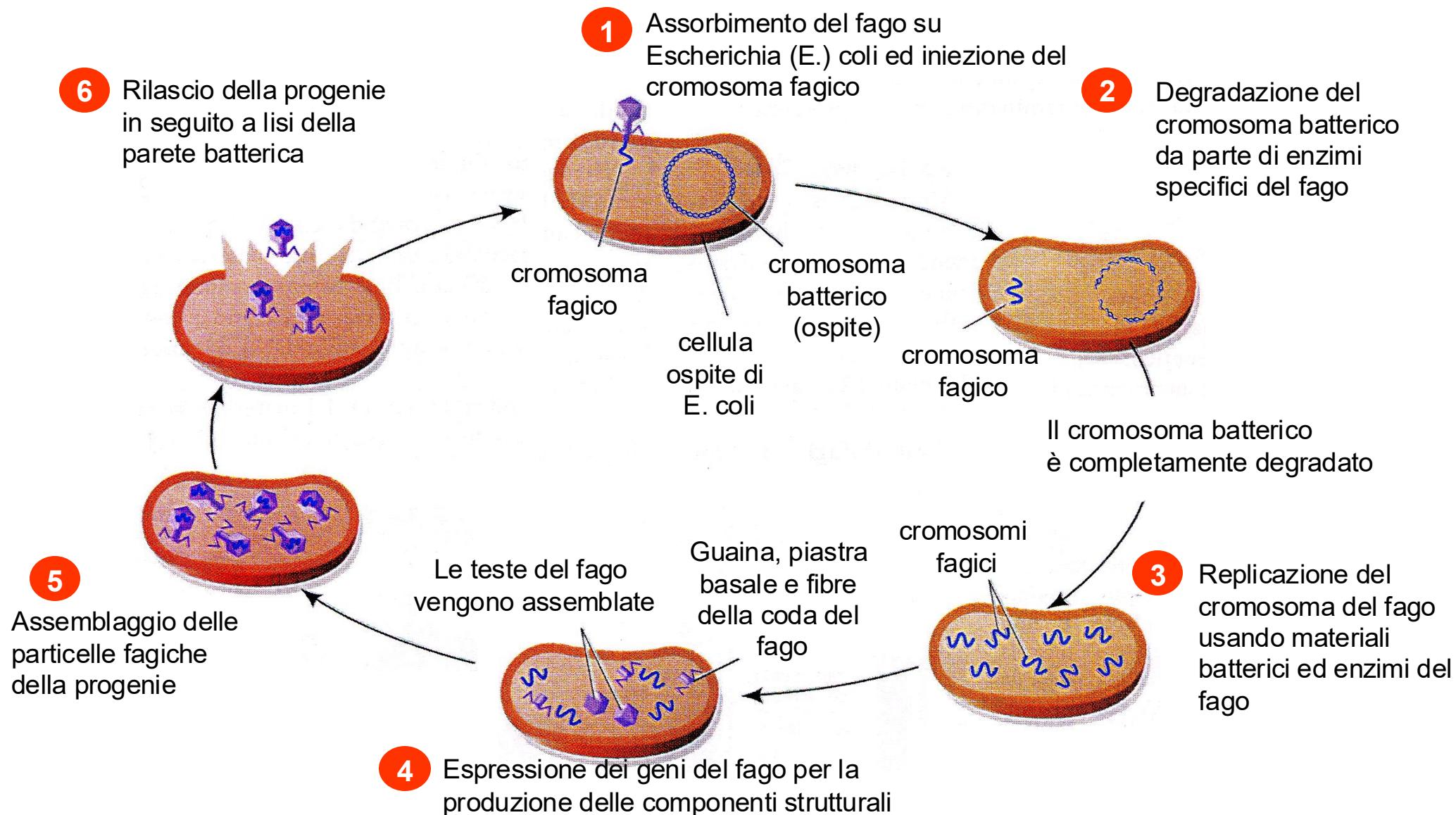
Alfred Hershey e Martha Chase stavano studiando nel 1952 un **batteriofago** chiamato T2.



Fotografia al microscopio elettronico del batteriofago T2

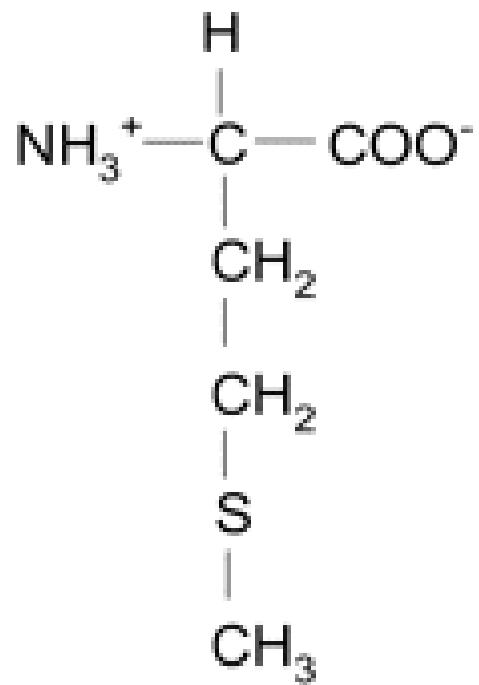
$$1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$$

Hersey 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.**

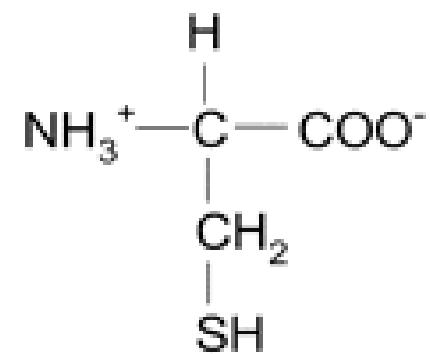


LE PROTEINE CONTENGONO LO ZOLFO (METIONINA E CISTEINA)

Metionina



Cisteina



II DNA CONTIENE FOSFORO

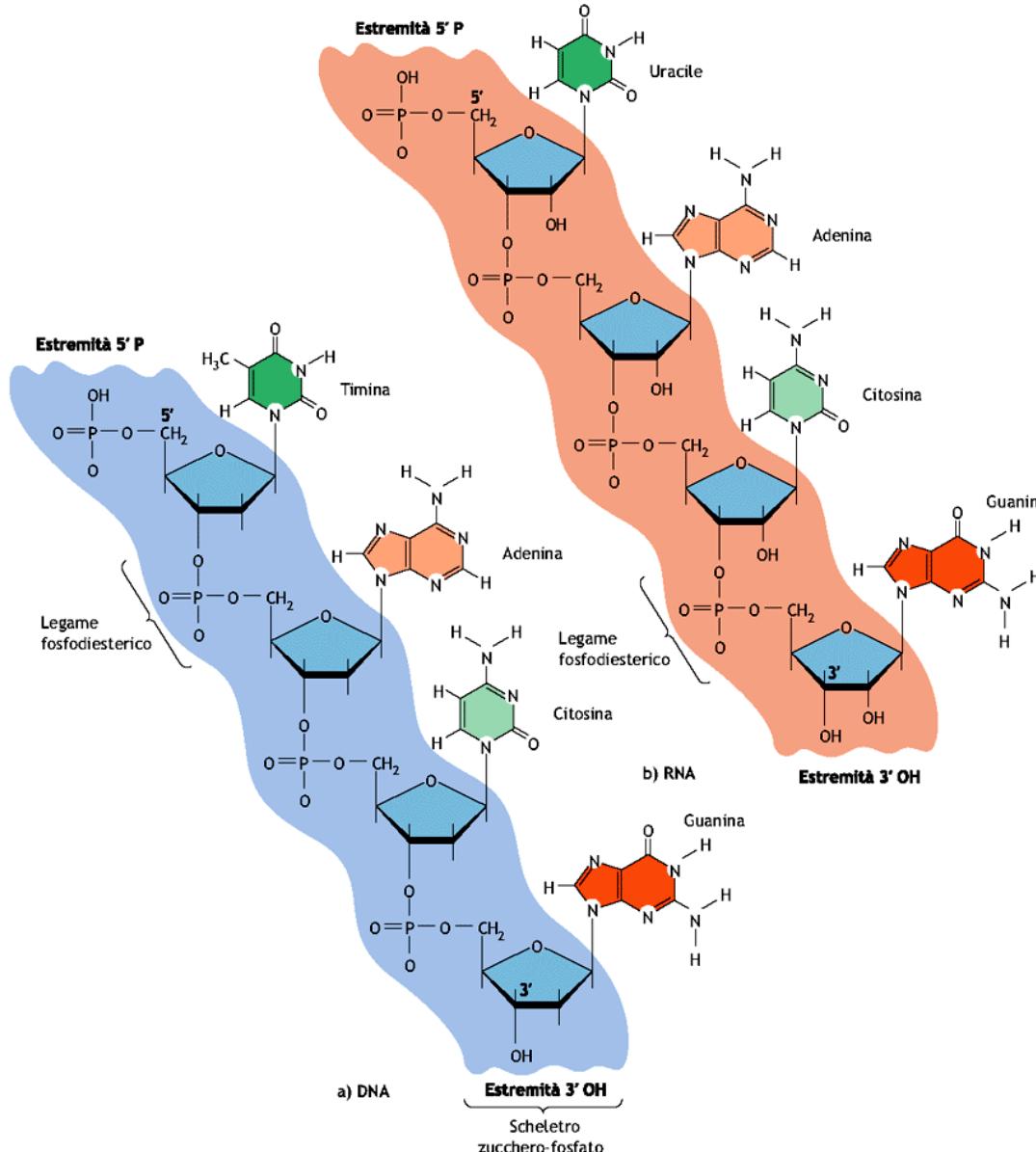
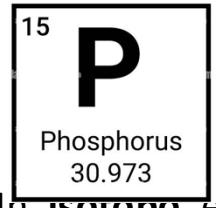


Figura 1.50 Costruzione di una singola elica. Gli acidi nucleici sono costituiti da catene lineari di nucleotidi uniti fra loro grazie ad un ponte fosfodiesterico che si instaura tra l'estremità 3'OH del primo nucleotide e l'estremità 5'P del secondo. Un polinucleotide così costituito ha, per convenzione, una polarità 5'P → 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.

Il numero atomico di un elemento (Z) indica il numero di protoni presenti nel nucleo di ogni suo atomo e, per il fosforo (simbolo chimico P), è 15



Un **isotopo** è un atomo di uno stesso elemento chimico, e quindi con lo stesso numero atomico Z (numero di protoni), ma con differente numero di massa A (protoni più neutroni), e quindi differente massa atomica (M- approssimativamente la massa atomica è la somma delle masse di protoni e neutroni presenti nel nucleo). La differenza dei numeri di massa è dovuta ad un diverso numero di neutroni presenti nel nucleo dell'atomo a parità di numero atomico.

Il fosforo (P NUMERO ATOMICO 15 P)

^{31}P (16 neutroni) ISOTopo STABILE PRESENTE IN NATURA

^{32}P RADIOATTIVO (17 neutroni)

^{33}P RADIOATTIVO (18 neutroni)

(radioattivi, artificiali usati in biologia)

Lo zolfo (S NUMERO ATOMICO 16)

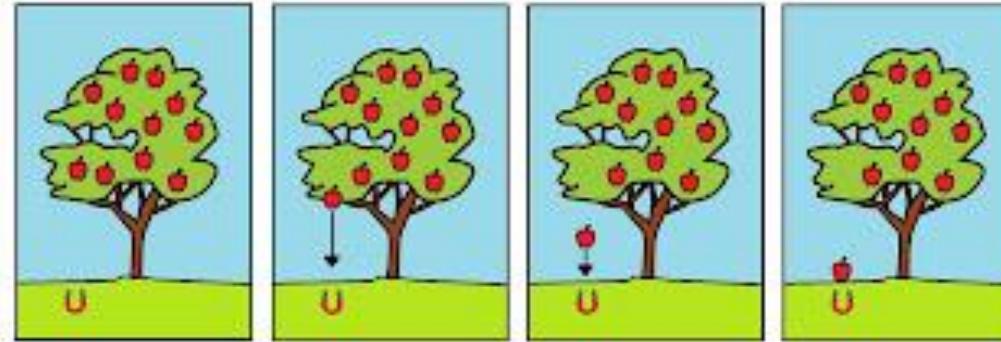
^{32}S ISOTopo STABILE PRESENTE IN NATURA

^{35}S RADIOATTIVO

Il fosforo e lo zolfo radioattivi decadono emettendo della **radiazioni** che possono essere rilevate.

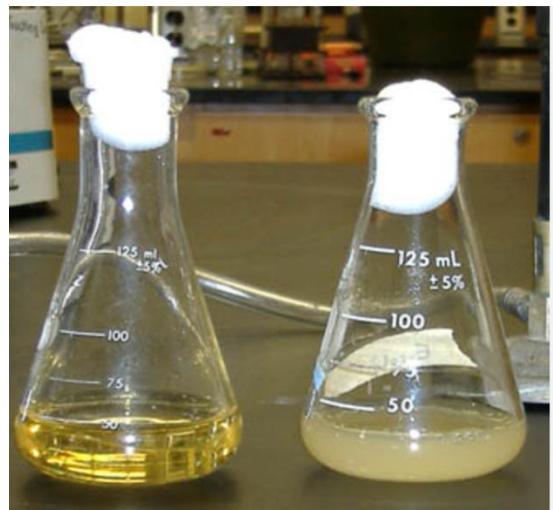


Misuratore di radiazioni
Geiger–Müller



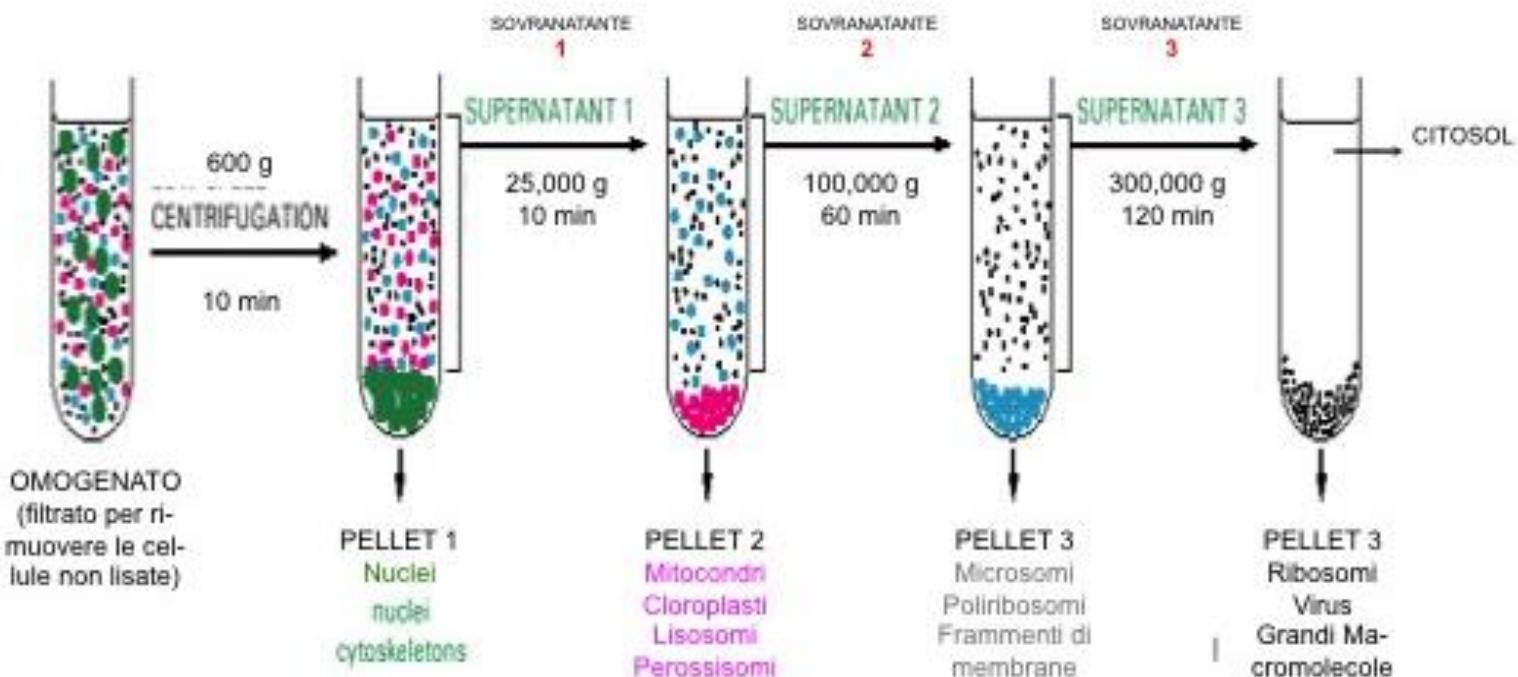
Forza peso = massa (la quantità di materia che caratterizza un corpo) \times g (accelerazione di gravita)





Le cellule del sangue (o in coltura) e i batteri possono essere separati o raccolti mediante **sedimentazione** (naturale)

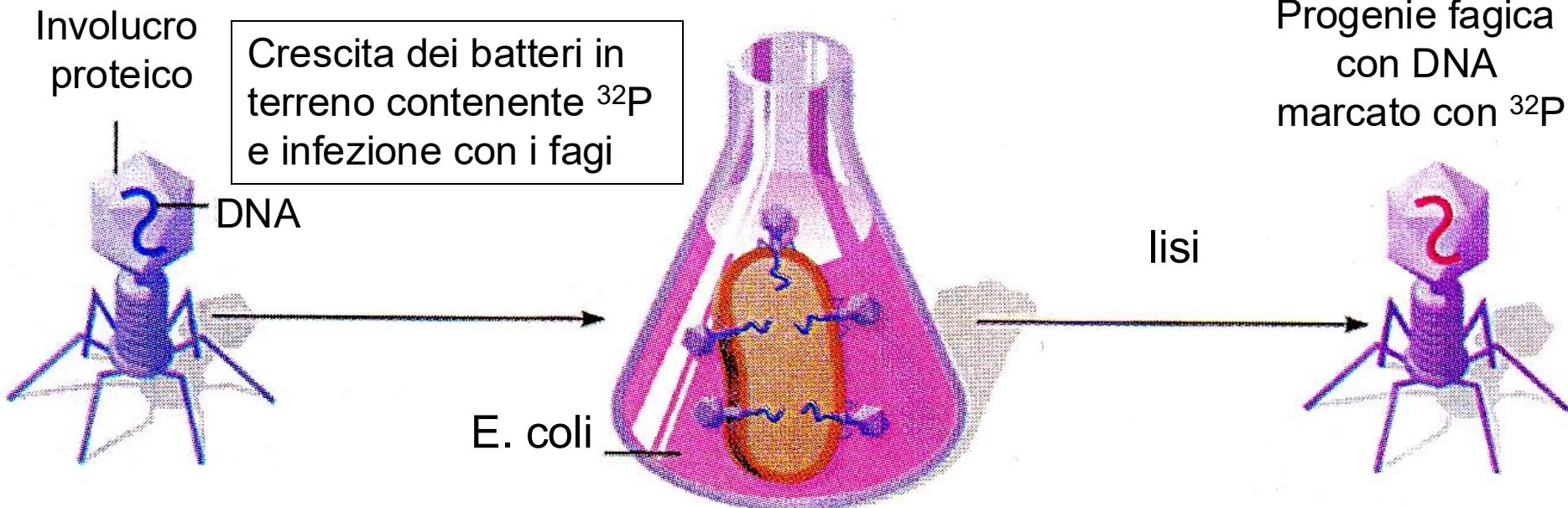
Centrifugazione differenziale



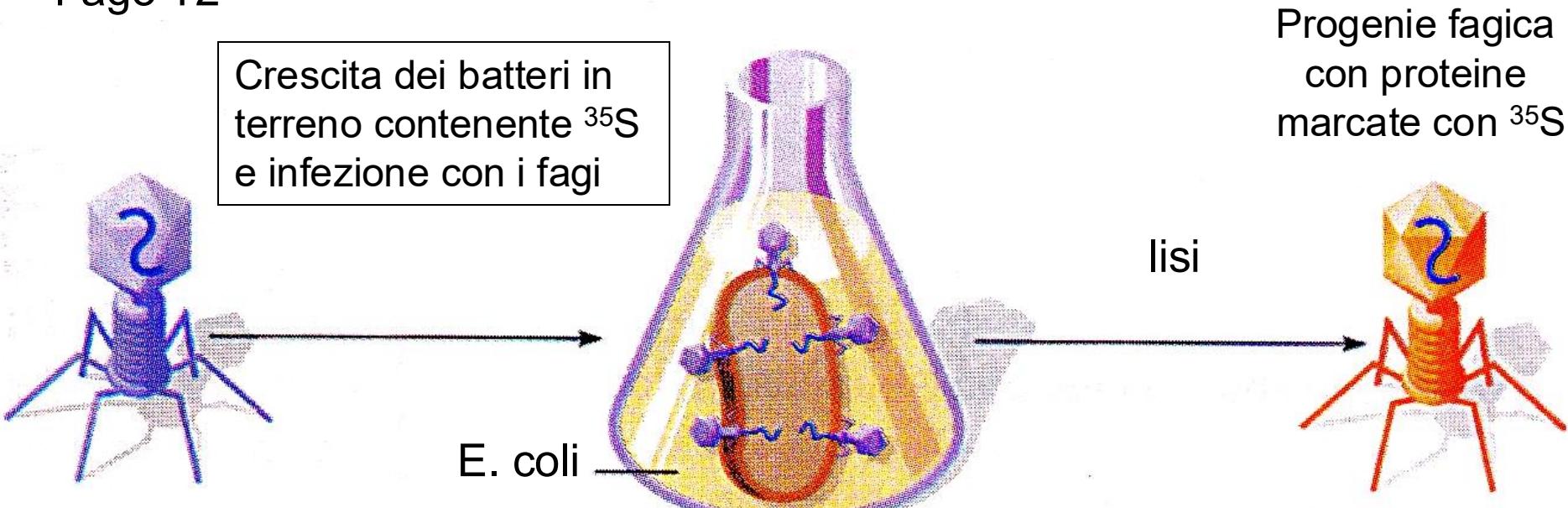
Forza peso = massa x g (accelerazione di gravita)

- **Centrifughe da banco:** Raggiungono forze fino a circa **3.000 – 6.000 g**
- **Supercentrifughe:** Raggiungono forze fino a circa **20.000 – 50.000 g**
- **Ultracentrifughe:** Raggiungono forze tra **100.000 g e 1.000.000g**

Esperimento di Hershey e Chase, 1953 (parte 1)

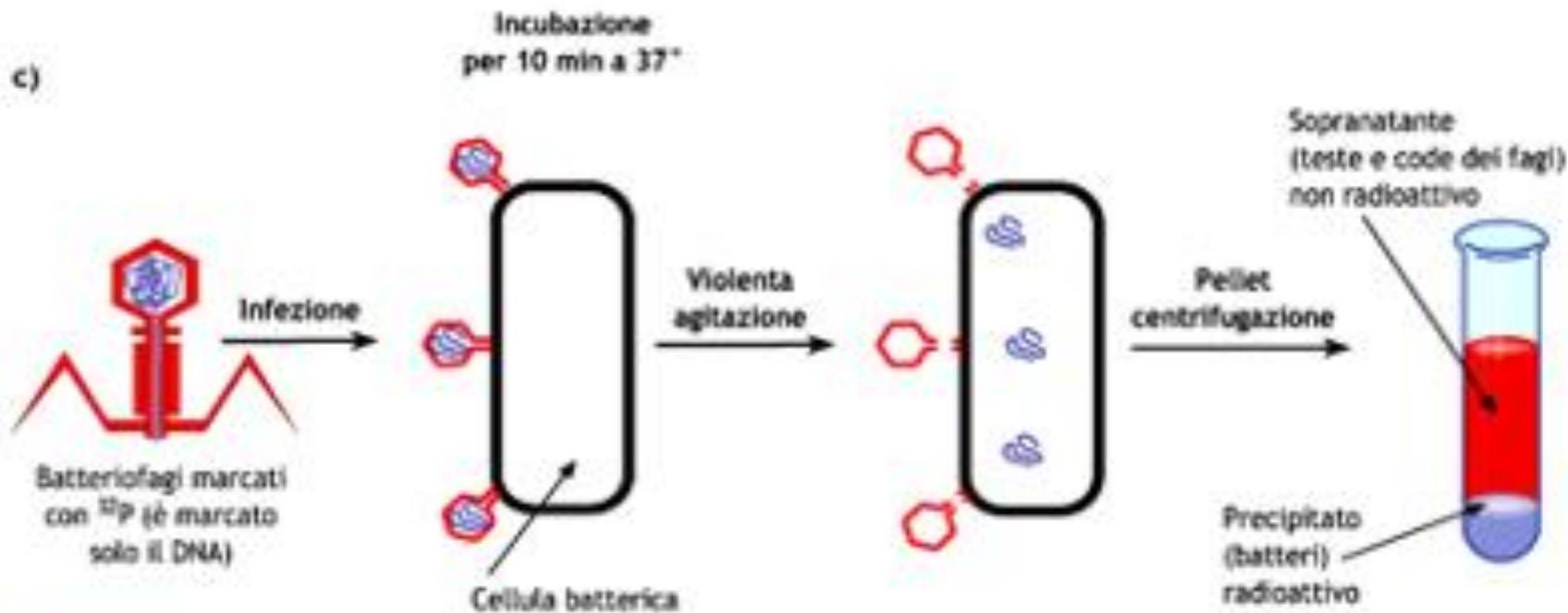


Fago T2



Esperimento di Hershey e Chase, 1953 (parte 2)

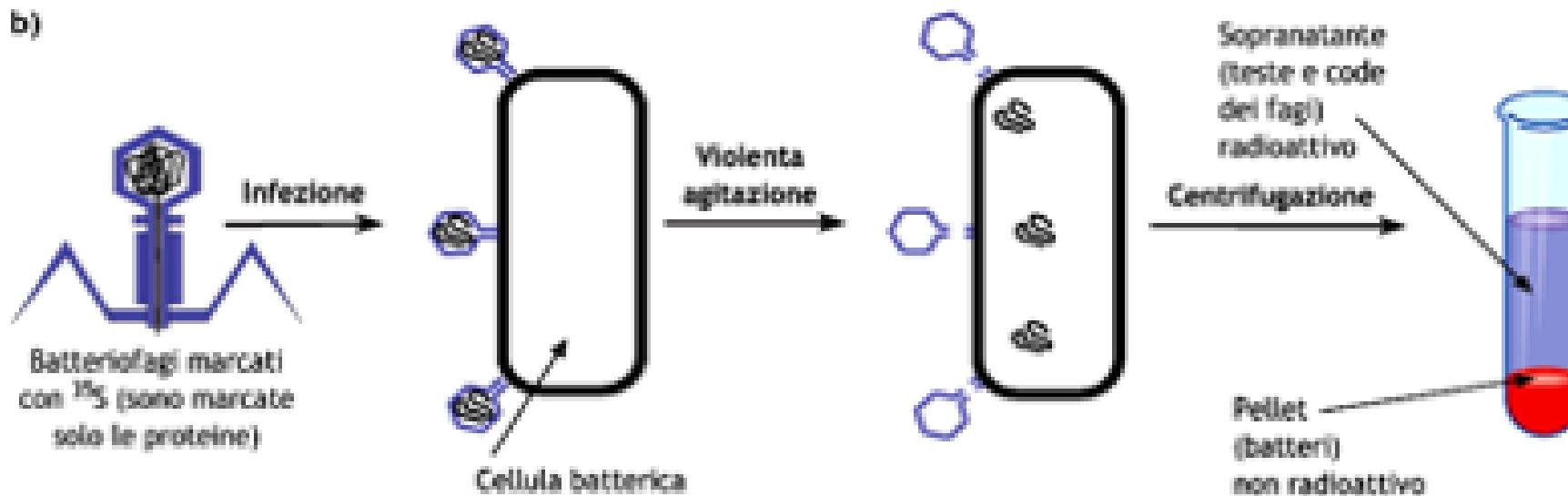
Fagi con DNA radioattivo



■ **Figura 1.46 Esperimento di Hershey e Chase – dimostrazione che è il DNA del fago che viene inserito nel batterio nel momento dell'infezione.** (a) Struttura di un fago della serie T4 e relativa immagine al ME; (b) infezione di batteri da parte di fagi che hanno le proteine del capside marcate con ^{35}S . Dopo centrifugazione, il pellet che contiene i batteri non è radioattivo; (c) infezione di batteri da parte di fagi che hanno il DNA marcato con ^{32}P . Dopo centrifugazione, il pellet che contiene i batteri è radioattivo.

Esperimento di Hershey e Chase, 1953 (parte 2)

Fagi con proteine radioattive



Esperimento di Hershey e Chase: conclusioni

Usarono gli isotopi radioattivi del fosforo e dello zolfo per marcare rispettivamente il DNA e le proteine virali. Ciò fu possibile in quanto le proteine virali sono ricche di zolfo ma mancano di gruppi fosfato, mentre il DNA presenta una situazione opposta.

Gli esperimenti mostrarono che **solo il DNA virale entra nella cellula batterica** e, quindi, questa molecola deve contenere le informazioni capaci di indirizzare la cellula verso la produzione del DNA e delle proteine di tipo virale.

LABORATORIO VIRTUALE



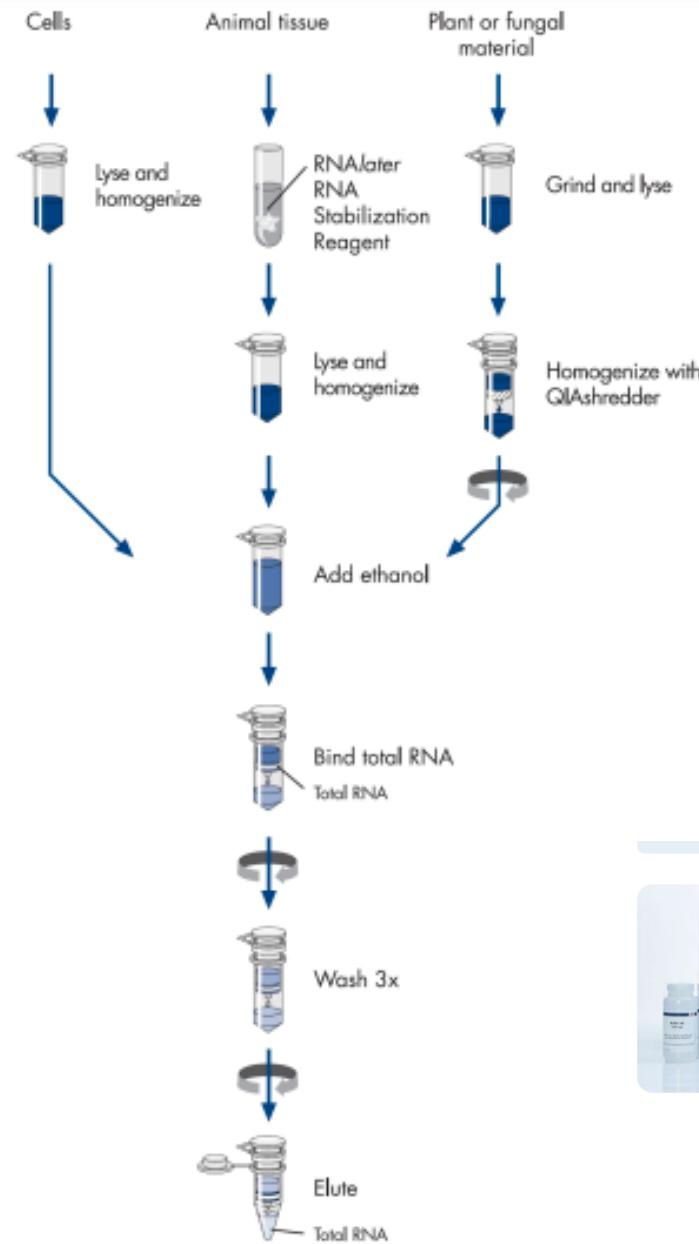
Il DNA e l'RNA possono essere estratti da cellule procariotiche e eucariotiche.

Materiale di partenza:

- ✓ Batteri
- ✓ Diversi tessuti biologici (animali o vegetali)
- ✓ Cellule derivate dai diversi tessuti biologici
- ✓ Liquidi biologici

Perché si estrae:

- ✓ Mutazioni
- ✓ Clonaggio
- ✓ Analisi forensiche



Estrazione di acidi nucleici (oggi) – 1 ora



DNeasy 96 Blood & Tissue Kit (12)

Cat. No. 69582 | DNeasy Blood & Tissue Kits

For 12 x 96 DNA minipreps: 12 DNeasy 96 Plates, Proteinase K, Buffers, S-Blocks, AirPore Tape Sheets, Collection Microtubes (1.2 ml), Elution Microtubes RS, Caps, 96-Well Plate Registers

DNeasy 96 Blood & Tissue Kit (12)

Estrazione manuale

Figure 1. RNeasy Mini, RNeasy Protect Mini, and RNeasy Plant Mini procedures.

Gli **estrattori automatici** moderni ad **alta produttività (high-throughput)** impiegano in media **dai 20 ai 60 minuti** per estrarre 96 campioni, e quindi circa 100 campioni (una piastra da 96 pozzetti).



Estrazione di acidi nucleici (fino agli anni 80)



Fasi

1. *Lisi delle membrane cellulari*
2. *Eliminazione di lipidi, proteine e carboidrati*
3. *Eliminazione dei residui di fenolo e precipitazione del DNA*
4. *Centrifugazione*
5. *Quantificazione e verifica della qualità*

1. Lisi delle membrane cellulari

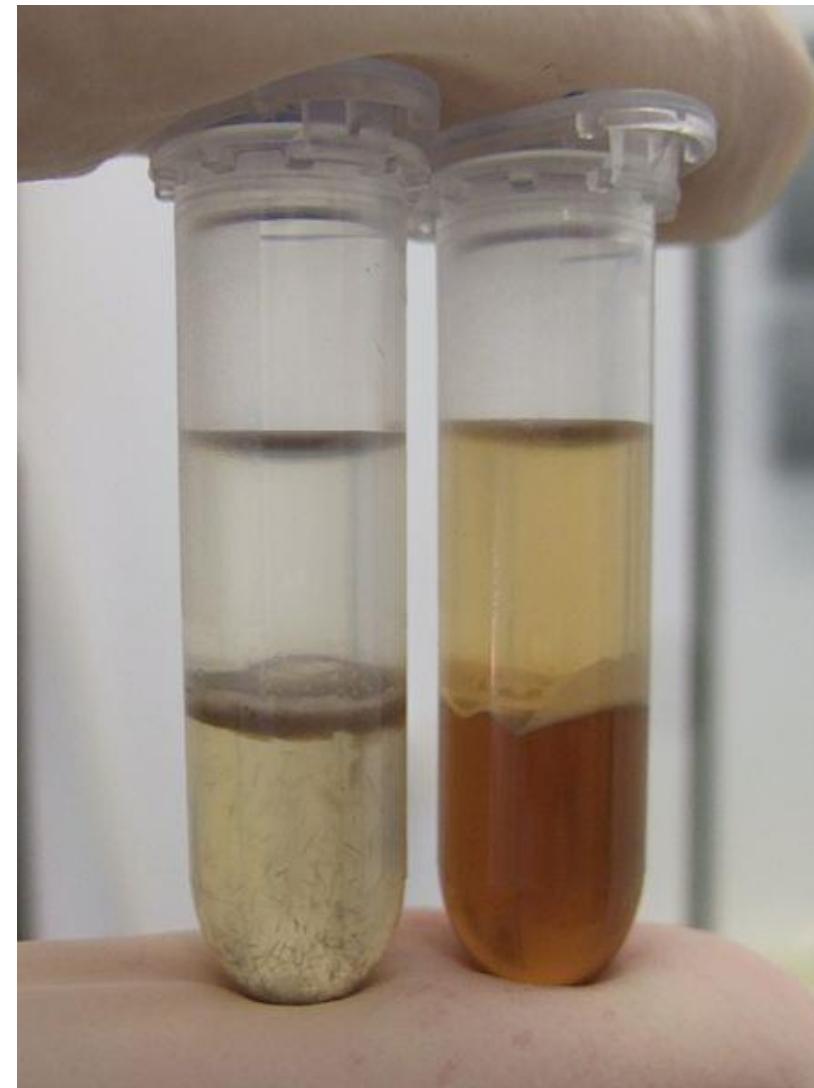


Proteinasi

2. Eliminazione di lipidi, proteine e carboidrati (Fenolo- Cloroformio-Isoamilico)

Si ottengono diverse fasi (necessaria una centrifugazione per separare le fasi):

- ✓ **Superiore** contiene gli acidi nucleici
- ✓ **Interfase** di proteine denaturate
- ✓ **Inferiore** contiene lipidi e proteine ricche di aminoacidi idrofobici

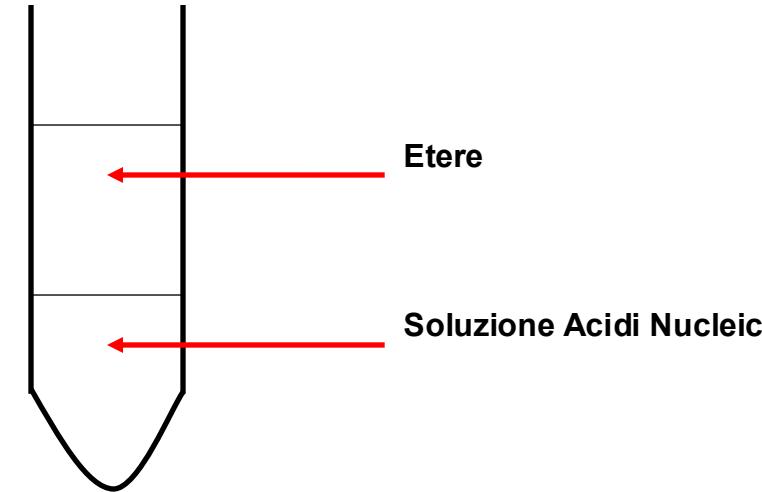


3. Eliminazione dei residui di fenolo e precipitazione del DNA

Durante la centrifugazione l'etere localizzato nella parte superiore del tubo viene allontanato

La soluzione risultante costituisce la miscela di acidi nucleici

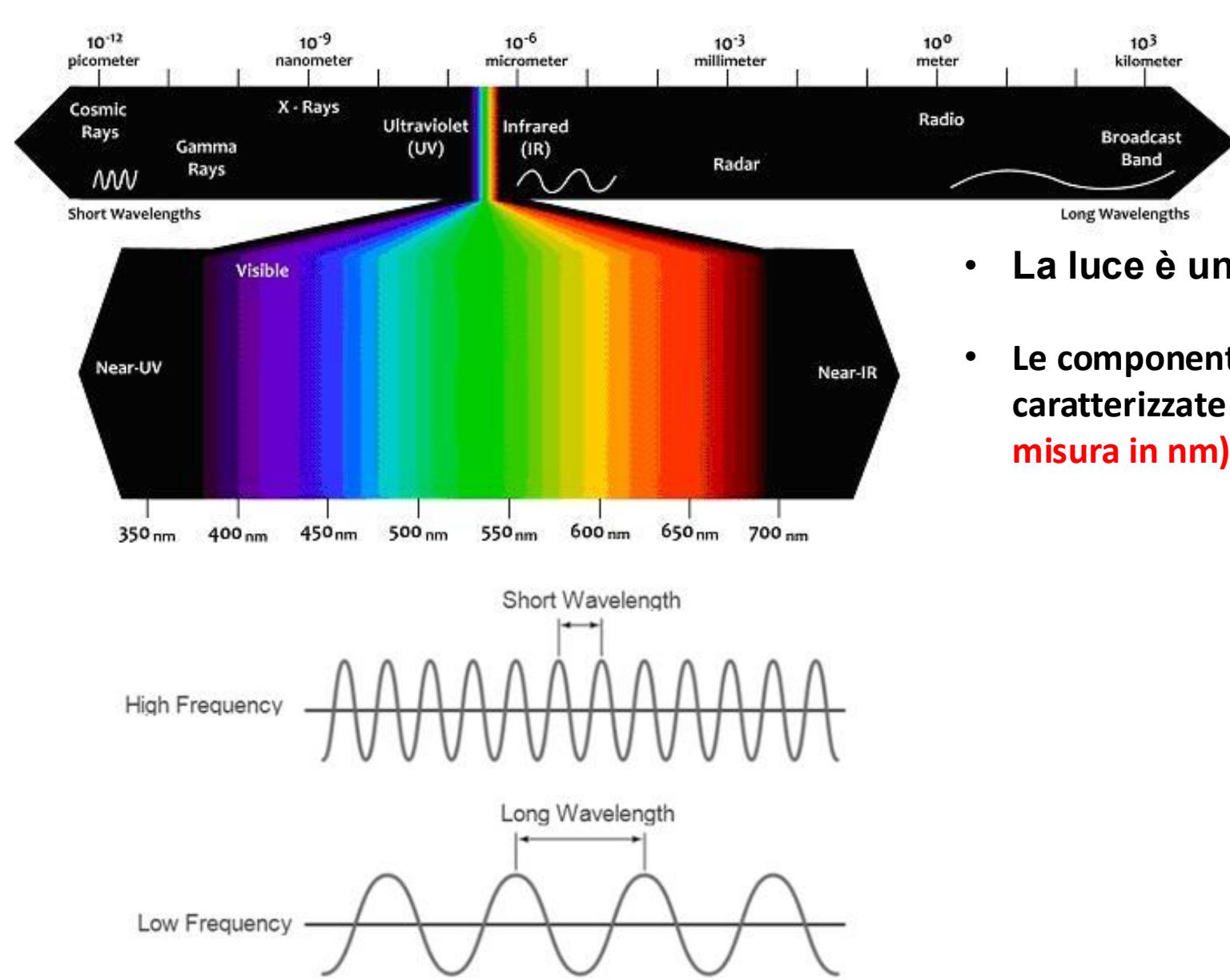
Aggiunta di sali (acetato di sodio) ed etanolo (2.5 volumi) **precipita** il DNA (MA NON SEDIMENTA!)



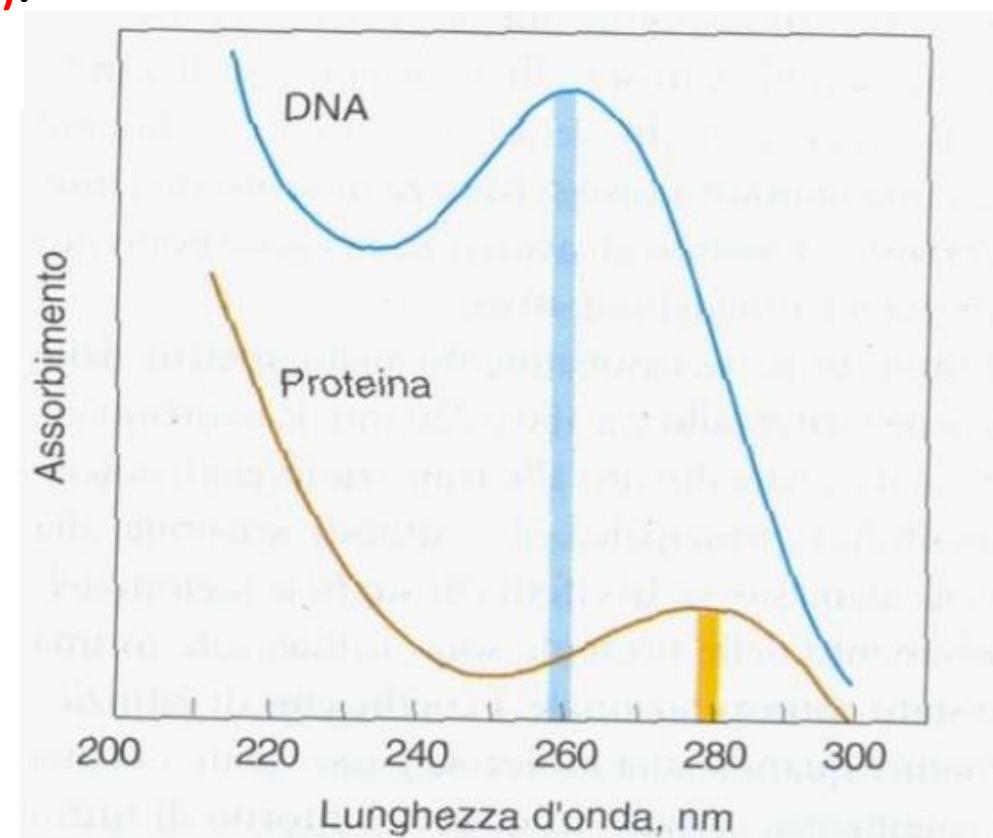
4. Centrifugazione

- Si esegue una **centrifugazione ad alta velocità** (12.000 g, o anche molto di più, a freddo) per separare le molecole di DNA precipitate (*pellet*)
- Il pellet andrà risospeso nel volume di H₂O necessario





- La luce è una forma di radiazione elettromagnetica
- Le componenti dello spettro elettromagnetico sono caratterizzate da diverse **lunghezze d'onda (wavelenght, si misura in nm)**.



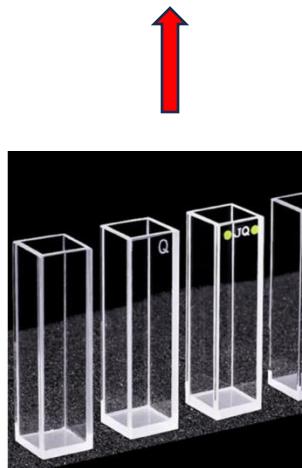
Le proteine e gli acidi nucleici assorbono la luce (280 e 260 nm).

Analisi di RNA e DNA: Assorbanza

Quantità di luce

assorbita (unità di misura OD-Densità

Ottica- dipende dalla **concentrazione**
dell'acido nucleico e dalla **lunghezza del**
percorso attraversato)



Quantità di luce
in entrata

Quantità di luce
in uscita



spettrofotometro

Cuvetta (contiene la soluzione di DNA)

- ❖ Concentrazione DNA doppio filamento (1 cm) (1 OD = 50 ug/ml a 260 nm)
- ❖ Concentrazione RNA (1 cm) (1 OD = 40 ug/ml a 260 nm)

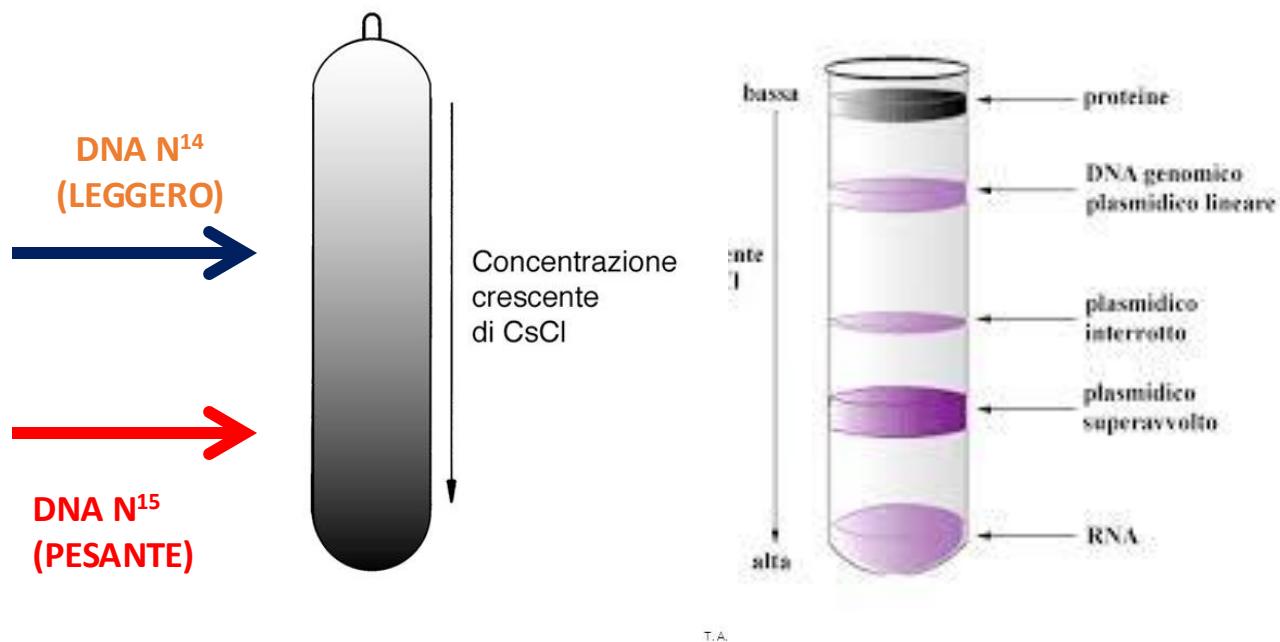
Purezza (quantità di proteine contaminanti): Rapporto 260/280 dovrebbe essere circa 2 (se inferiore a 1,8 indica che la quantità di proteine contaminanti è troppo alta)

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 che ha mostrato come si replica il DNA)



100.000g
6M CsCl