

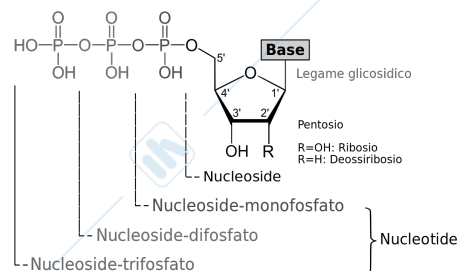
DNA ha una struttura fissa e la sua funzione è di conservare e trasmettere l'informazione genetica, contiene informazioni per codificare proteine

RNA ha ruolo regolatorio e funzionale e enzimatico, è più versatile e ne esistono più tipi:

- mRNA trascrive l'info contenuta nel DNA e la trasferisce ai ribosomi
- tRNA permette il trasporto di amminoacidi e il riconoscimento di codoni di mRNA
- rRNA ha funzione enzimatica va a costituire il ribosoma insieme a proteine

DNA e RNA sono entrambi formati da successioni nucleotidiche (struttura primaria)

I NUCLEOTIDI sono formati da una BASE AZOTATA, uno ZUCCHERO pentoso (a 5 carboni) e un GRUPPO FOSFATO



Lo ZUCCHERO pentoso è nel caso del DNA un desossiribosio e nel caso dell'RNA un ribosio, la differenza tra questi due zuccheri è che nel ribosio in posizione 2' si ha un OH che manca nel desossiribosio, questa differenza è importante perché comporta l'impossibilità di fare una catena doppia all'RNA data dall'ingombro che porta

In entrambe i casi il legame con la base azotata si ha in posizione 1'

Le BASI AZOTATE sono molecole aromatiche eterocicliche che si distinguono in:

PURINE formate da 2 cicli uno a 6 termini e uno a 5, sono Adenina (a in posizione 6' un gruppo ammidico) e Guanina (ha in posizione 6' un gruppo carbonilico)

Legano il carbonio C1 dello zucchero in posizione 9' con legame  $\beta$ -glicosidico

PIRIMIDINE formate da un ciclo a 6 termini, sono Timina, Citosina e Uracile

Legano il carbonio C1 dello zucchero in posizione 1' con legame  $\beta$ -glicosidico

Gli zuccheri in soluzione acquosa si trovano in maniera favorita in posizione ciclica, cioè chiusa, con la ciclizzazione si va a formare un carbonio chirale che chiamiamo  $\alpha$  nel caso in cui l'OH stia sotto il piano dell'anello e  $\beta$  nel caso in cui sia sopra. Il legame  $\beta$ -glicosidico prende questo nome perché coinvolge il C1 dello zucchero che è enantiomero  $\beta$  Lo zucchero è fosforilato in 5'

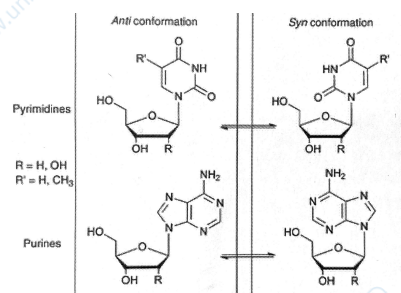
BASE + ZUCCHERO = NUCLEOSIDE

NUCLEOSIDE + GR.FOSFATO = NUCLEOSIDE MONOFOSFATO + GR.FOSFATO = N.DIFOSFATO + GR.FOSFATO = NUCLEOSIDE TRIFOSFATO = NUCLEOTIDE

Lo zucchero è un ciclo a 5 carboni 4 dei quali sono planari e uno sporge dal piano, in questo modo si crea una conformazione a vista, i carboni che possono sporgere sono il c2 o il c3, se il carbonio sporgente punta dalla stessa parte del c5 si dice *endo* se punta dall'altra parte *exo*

Il ribosio assume conformazione a busta C3 endo mentre il desossiribosio C2 endo, perché nel ribosio sul c2 si ha l'oh che manca nell'altro zucchero, questo tende a impedirgli il movimento

La base rispetto allo zucchero può assumere due conformazioni *syn* e *anti*, nella prima i gruppi più ingombranti si trovano nella stessa parte nella seconda in parti opposte, le purine si possono trovare in entrambe le conformazioni, le pirimidone prevalentemente in anti, in generale la conformazione più stabile è quella anti perché in questo modo si hanno meno forze repulsive



È importante essere a conoscenza del fatto che esistono anche basi modificate dette basi minori

LEGAME TRA DUE NUCLEOTIDI è un legame di tipo fosfodiesterico, si forma

tra il fosfato (in 5' sul nucleotide) che funge da ponte e l'ossidrile OH (in posizione 3' del nucleotide successivo)

Il nucleotide libero possiede tre gruppi fosfato, quando si forma un legame con un altro nucleotide che interessa il fosfato quello che si lega è il primo (chiamato  $\alpha$ ) mentre gli altri due ( $\beta$  e  $\gamma$ ) vengono liberati sotto forma di pirofosfato, una molecola altamente energetica, la reazione è quindi termodinamicamente favorita

Le catene nucleotidiche (sia per DNA che RNA) avranno sempre un'estremità 5' che termina con un fosfato e una 3' che ha un OH libero

Il DNA è costituito da due catene antiparallele nelle quali le basi sono rivolte verso l'interno e i gruppi fosfato verso l'esterno, questo perché le basi sono apolari, inoltre queste hanno possibilità di interagire tra loro andando a formare legami a idrogeno che stabilizzano la molecola, questi legami vengono istituiti seguendo la teoria della complementarità delle basi: l'Adenina con la Timina e la Citosina con la Guanina, inoltre sappiamo che tra Adenina e

timina si formano 2 legami a idrogeno e tra guanina e citosina tre legami a idrogeno. La composizione in basi del DNA non varia nella specie, la somma delle purine è uguale alla somma delle pirimidine.

Gli acidi nucleici hanno strutture complesse che si possono schematizzare in tre gradi:

- struttura primaria: è la sequenza nucleotidica
- Struttura secondaria: è la geometria che la molecola assume dopo l'interazione tra le basi
- Struttura terziaria: è la struttura tridimensionale assunta dal DNA al fine di entrare nel nucleo

Il DNA è formato da due catene elicoidali avvolte sullo stesso asse a formare una doppia elica destrorsa.

La doppia elica ha due periodicità: una periodicità primaria, la distanza di una base con la successiva e una periodicità secondaria che è il passo dell'elica.

Inoltre, siccome c'è un'asimmetria tra il piano sul quale giacciono le basi e il legame con lo zucchero, nella superficie della doppia elica si formano un solco minore e uno maggiore, quest'ultimo è il principale punto di interazione con le proteine.

Le basi hanno una certa libertà di movimento, possono farne tre diversi:

Il twist, che è la rotazione di una base rispetto a un'altra, il roll che è una rotazione della base rispetto all'asse dell'elica e il tilt che è la rotazione rispetto allo scheletro zucchero-fosfato

Vediamo le strutture secondarie che possono essere assunte dal DNA:

- Conformazione B: si trova più comunemente, il passo dell'elica è di 36 Å, ogni giro dell'elica contiene 10,5 paia basi, il diametro di 20 Å, la periodicità primaria di 3,4 Å
- Conformazione A: più tozza e tarchiata, si trova in vivo solo in alcuni casi, come nell'RNA duplex, il passo dell'elica è 25 Å, ogni giro comprende 11 paia basi, il diametro è di 23 Å e la periodicità primaria di 2,6 Å
- Conformazione Z: si trova solo in vitro, elica sinistrorsa, conformazione a zig-zag data dall'alternarsi Din conformazioni sin e anti, il passo dell'elica è 46 Å, il diametro 18 Å

In certi casi si può trovare anche il DNA a tripla elica, questo succede se si trova un tratto di DNA, minimo di 20 basi, formato solo da purine e l'altro da pirimidine

Sequenze palindromiche: sequenza uguale se letta su due filamenti

Sequenze ripetute invertite: come la precedente con una parte centrale non ripetuta, quando questa è presente la molecola di DNA può riarrangiarsi nello spazio in modo da posizionare fronte fronte le sequenze ripetute invertite, si crea così una struttura a forcina nella quale si identificano un'ansa e uno stelo, nel caso in cui la sequenza ripetuta invertita si trovi in entrambi i filamenti si formano due forcine assumendo una struttura cruciforme

Il DNA in generale non è dritto, infatti le coppie di basi tendono a piegarsi, ma lo fanno in direzioni opposte (A-T verso il solco minore e C\_G verso il solco maggiore) quindi un tratto casuale di DNA, nel quale si ha un'alternanza di queste coppie, risulterà pressoché dritto, nel caso in cui si abbiano coppie ripetute con una certa propedeuticità il DNA risulta maggiormente curvato

Il DNA genomico steso è lungo 2 metri e deve entrare in uno spazio di 10  $\mu\text{m}$  che è il nucleo, per fare ciò deve essere altamente compattato e avvolto nella cromatina

Il DNA circolare può essere rilassato o superavvolto, le forze che regolano il super avvolgimento sono due: il twist, la torsione e il writhe, l'attorcigliamento

Numero di legame  $L_k = T_w - W_r$  (numero di twist+ numero di writhe)

Quando la differenza tra il numero di legame tra lo stato superavvolto e quello rilassato è minore di 0, il DNA è superavvolto negativamente, maggiore di zero, il DNA è superavvolto positivamente

Il DNA tende in maniera spontanea a superavvolgersi perché è il meccanismo mediante il quale tiene costante il numero di legame, è il suo sistema per compensare le tensioni indotte (es. apro il DNA per duplicarlo). Il superavvolgimento non è infinito, infatti se aumenta oltre un certo limite si rischia la rottura, intervengono le topoisomerasi (sono endonucleasi) Esistono topoisomerasi 1 che non richiedono ATP, tagliano un solo filamento e aumentano di uno il numero di legame e le topoisomerasi 2 che richiedono ATP, tagliano entrambe i filamenti e aumentano il numero di legame di due unità

Ma come possiamo vedere se il DNA è rilassato o superavvolto? Servendoci dell'elettroforesi, tecnica che tramite l'applicazione di un campo elettrico permette di dividere le macromolecole discriminandole per dimensione, il DNA essendo carico negativamente per i gruppi fosfato si muoverà verso l'anodo, un DNA superavvolto si muoverà più velocemente delle dimensioni minori.

La denaturazione è un processo che con la rottura dei legami a idrogeno tra le basi porta all'apertura della doppia elica, si può indurre per riscaldamento, la rinaturazione è un processo più complicato dal momento che i legami si devono formare, si induce per raffreddamento. Ogni DNA possiede un melting Point ( $T_m$ ) che rappresenta la temperatura alla quale quel DNA si trova per il 50% denaturato

La degradazione del DNA e dell'RNA è ad opera delle nucleasi che rompono il legame fosfodiesterico, si dividono in: DNasi e RNasi, queste, a loro volta si dividono in endonucleasi (attaccano il filamento al centro) ed esonucleasi (attaccano all'estremità)

Esistono anche tipi di trasformazioni non enzimatiche:

- deaminazione delle basi, per esempio la citosina quando la subisce diviene uracile perché perde il gruppo amminico al posto del quale si attacca un carbossilico, questo è il motivo per il quale il DNA non ha l'uracile ma ha la timina (uracile metilato), se si subisse deaminazione e l'uracile fosse una base normalmente compresa nel DNA la cellula non riconoscerebbe l'errore e non lo correggerebbe, si avrebbe una mutazione che ha alto rischio cancerogeno. Adenina e guanina deaminano ma più lentamente, dalla prima si ottiene ipoxantina e dalla seconda xantina
- Depurazione, si crea un sito apurinicco staccando la base, è un modo per indurre meccanismi di riparazione
- Reazioni UV indotte
- Reazioni da agenti chimici: agenti metilanti, sono alchilanti e agenti deaminanti che deaminano

RNA è una molecola a singola elica destrorsa, la doppia elica non si forma per l'-OH in 2' dello zucchero, sia per l'ingombro sterico che perché l'ossigeno ha un doppietto che crea repulsione elettronica  
l'RNA assume diverse conformazioni per la varietà delle sue funzioni e la libertà intorno ai legami, si possono avere le strutture a forcina, le anse interne, le strutture cruciformi, le regioni di mismatch e le gemme  
Si può avere anche l'ansa a tetraloop se si ha una particolare sequenza: GCUGUUGU, qui le basi si trovano molto vicine e interagendo stabilizzano l'elica

La presenza dell'-OH in 2' dello zucchero ostacola la conformazione B (comune nel DNA), si ha prevalenza della conformazione A alterata nella quale il solco minore è più ampio e quello maggiore meno, infatti l'RNA è difficilmente accessibile alle proteine

Il tRNA trasporta l'amminoacido, lo porta al ribosoma, riconosce il codice messaggero e attiva la traduzione, la sua struttura è a trifoglio ma si organizza in una struttura a L dove alcune basi vengono buttate all'esterno, in questa struttura si distinguono varie parti: il braccio accettore (7 basi accoppiate a 4 basi spaiate) che lega l'amminoacido, opposto a questo si ha il braccio dell'anticodone che lega il codice messaggero, poi si ha il braccio D (contiene residui di diidrouridina) e il braccio T $\psi$ C (residui di pseudouridina)

Il GENOMA Il gene è la porzione del DNA che codifica per una proteina, nel genoma umano solo il 5% è codificante. Il DNA è condensato in cromosomi, questo fatto comporta diversi benefici: compattazione, protezione, stabilizzazione, efficienza nella trasmissione, regolazione dell'espressione dei geni

Le cellule procariotiche hanno diametro di 1  $\mu$ m, il nucleoide è privo di membrana, il DNA è disorganizzato e si trova anche extracromosomiale sotto forma di plasmide, vettore di clonazione, i geni sono spesso organizzati in operoni, gruppi localizzati uno accanto all'altro regolati tutti dal solito promotore  
La cellula eucariotica ha dimensioni che vanno dai 10 ai 100  $\mu$ m, il DNA sta nel nucleo organizzato in 23 coppie di cromosomi, il genoma è di 3200Mb (Mb = mega basi = milioni di paia basi)

Aumentando la complessità dell'organismo la densità genomica (numero di geni/Mb) diminuisce, questo perché le parti non codificanti aumentano, la densità genomica dell'Escherichia coli è di 900, quella dell'uomo di 6,25

Il genoma umano si divide in nucleare e mitocondriale, questo rappresenta lo 0,0005% (circa 37 geni), il DNA nucleare è costituito da circa 3000Mb, il 25% di questo è costituito da geni, il 75% da sequenze extrageniche, di quel 25% solo il 10% è codificante, il resto comprende introni, frammenti genici e pseudogeni

Vediamo quali sono le sequenze extrageniche:

ripetizioni in tandem, divise in:

- satellite, si trovano nel centromero
- minisatellite nei telomeri
- microsatellite in tutto il cromosoma, sono siti poliformici, utili per ricavarne il fingerprinting

Sequenze ripetute interdisperse, sono mobili e si dividono in

- Trasposoni, mobili perché contengono il gene che codifica trasposasi capace di tagliare il DNA e spostarlo da un'altra parte, può muoversi in maniera conservativa o replicativa
- Retrotrasposoni, funzionano tipo i retrovirus, si dividono in LTR (lunghe sequenze terminali ripetute), più simili ai retrovirus, contengono geni gag che codifica per il capsid e pol che codifica per trascrittasi inversa, LINE (sequenze nucleari interdisperse lunghe), hanno una coda poli A terminale, hanno due geni ORF1 e ORF2, SINE (sequenze internucleari interdisperse corte) hanno bisogno delle LINE per spostarsi, non hanno geni

Vediamo ora le sequenze geniche non codificanti:

- gli introni, sono sequenze di un gene non codificanti che insieme agli esoni vengono trascritte dalle RNA polimerasi questo porta alla formazione di un trascritto primario che deve essere sottoposto a splicing, fatto rilevante perché questo non avviene sempre alla stessa maniera infatti esistono splicing alternativi che danno grande variabilità genetica
- Gli pseudogeni, sono copie di geni non funzionali, si ottengono per retrotrascrizione da mRNA, non hanno i promotori per la regolazione della trascrizione, per essere inseriti nel DNA possono seguire due vie: semplice duplicazione, il gene viene duplicato e inserito nel DNA subendo una mutazione che lo inattiva, oppure, processazione, il gene viene trascritto in RNA subendo modifiche posttrascrizionali, forma RNA maturo e poi viene retrotrascritto in cDNA che viene integrato nel DNA di partenza

Altri elementi cromosomiali:

- Origini di replicazione, sono siti del DNA dove si avrà l'apertura della forcella di replicazione
- Centromeri, importanti per la segregazione dei cromosomi
- Telomeri, presentano sequenze particolari come TTAGGG

Fasi della mitosi:

- interfase : il DNA è nello stato decondensato
- Profase: i cromosomi si condensano e si perde la membrana nucleare
- Metafase: si forma il fuso mitotico
- Anafase: si ha la separazione dei cromatidi fratelli che vengono attratti ai poli del fuso
- Telofase: si ha la diminuzione della condensazione dei cromosomi e la formazione della membrana nucleare attorno ai cromosomi segregati
- Citochinesi: si ha la separazione finale delle cellule figlie

Impacchettamento del DNA, è legato alla formazione dei nucleosomi, il DNA si avvolge attorno agli stoni a formare una struttura simile a un filo di perle. Il core del nucleosoma è la regione centrale del nucleosoma sul quale si avvolgono circa 150 paia basi, tra due nucleosomi continui si ha una porzione lineare detta DNA linker formata da circa 40-50 paia basi

Gli istoni sono varie isoforme delle stesse proteine e sono 5: H2A, H2B, H3, H4 e H1, sono tutte proteine basiche (costituite soprattutto da a.a. basici, arginina e lisina) queste hanno carica positiva che stabilizza quella negativa del fosfato presente nel DNA. Gli istoni H2A, H2B, H3, H4 entrano a far parte del core mentre H1 si lega alla regione linker. Gli istoni permettono l'assemblaggio del DNA sulle proteine e quindi la formazione del nucleosoma ma hanno anche il ruolo di cambiare il grado di accessibilità del DNA, il passaggio dallo stato avvolto a srotolato è necessario per la trascrizione e viene regolato dagli istoni che modificandosi chimicamente cambiano la struttura del nucleosoma e rendono accessibili regioni del DNA che non sarebbero raggiungibili. Gli istoni H2A, H2B, H3, H4 posseggono un dominio histone-fold che è la porzione che forma il core formata da 3 domini  $\alpha$  elica, una coda N-terminale, una regione carbossiterminale, gli istoni H2A e H2B si associano a formare dimeri, H3 e H4 si associano a formare un tetramero.

Vediamo la sequenza per l'assemblaggio del nucleosoma, il primo a legarsi è il tetramero che si lega al DNA nella parte più alta del nucleosoma, questo innesca l'avvolgimento del DNA che innesca l'attacco del dimero da sotto, l'istone H1 si lega al linker ma anche al nucleosoma, è come se avvicinasse i due nucleosomi, ognuno lega un solo istone H1 e quindi assembla le 'perle'

La cromatina, esiste in diverse forme a seconda che questa sia più o meno compatta, l'eucromatina è lo stato aperto, eterocromatina è lo stato compatto, le due forme si trovano in equilibrio compatto tra loro, il fattore che regola il passaggio tra l'una e l'altra è la modificazione degli istoni, l'istone H1 stabilizza la struttura cromatica di ordine superiore chiamata fibra di 30nm della quale si possono avere due modelli, a solenoide e a zig-zag (quello che si realizza di più in natura).

Le modificazioni degli istoni riescono a spostare l'equilibrio, gli amminoacidi più frequentemente e facilmente modificati sono lisina (principalmente acetilazione e metilazione), arginina (metilazione), serina (fosforilazione) e treonina (fosforilazione), gli enzimi che mediano le modificazioni sono: HAT catalizza l'acetilazione degli istoni, HDAC: induce deacetilazione, HMT: attiva metilazione, HDM: induce demetilazione. Acetilazione e fosforilazione modificano lo stato di carica degli istoni, le forze repulsive prevalgono e il nucleosoma si rilassa, attivano la trascrizione. L'acetilazione porta all'esposizione di bromo domini che vengono attaccati da proteine come il fattore TFIID che è un fattore di trascrizione, mentre la metilazione espone i cromosomi che richiamano proteine Polycomb che sono repressori della trascrizione.

Gli enzimi che modificano gli istoni lavorano in maniera coordinata con il complesso di rimodellamento dei nucleosomi, complesso enzimatico con attività di traslocasi che si lega tramite 7 siti di interazione con il nucleosoma, attraverso un dominio ad azione traslocasica che si pone a 2 giri dell'elica rispetto all'asse centrale si ha lo spostamento del nucleosoma su DNA, quindi lo scivolamento e si libera una regione del DNA che prima era inglobata nel core istonico.

La REPLICAZIONE del DNA è semiconservativa, in una nuova doppia elica avrà un filamento originario e uno sintetizzato ex novo. Perché avvenga la duplicazione del DNA sono necessari dei substrati: dNTP (deossi nucleotidi trifosfati) e la giunzione innesco stampo, la polimerasi che svolgerà la copiatura non è in grado di attaccare nucleotidi ex novo quindi serve un primer dal quale partire, questo presenterà un OH libero in 3' ed è il punto nel quale la polimerasi inizierà ad attaccare i nucleotidi

La polimerasi per scegliere un nucleotide rispetto a un altro opera una selezione cinetica, quindi sulla base della velocità di reazione, se il nucleotide è corretto questo andrà a posizionarsi perfettamente nella tasca di legame dell'enzima terminando che il fosfato in alpha si posizioni esattamente davanti all'ossidrile con il quale deve fare il legame e quindi si verificano le condizioni ottimali per fare il legame fosfodiesterico, se il nucleotide incorporato è errato il nucleotide si posizionerà in maniera ruotata rispetto all'altro non prendendo contatto con il suo sito catalitico, non si forma il legame a idrogeno con il nucleotide adiacente e il fosfato si pone lontano dall'ossidrile, la reazione catalitica non avviene, la velocità rallenta, la polimerasi si accorge dell'errore e lo corregge.

La polimerasi è paragonata a una mano a pugno chiuso dove si identificano, il palmo che è la regione dove avviene la catalisi, le dita che hanno ruolo nel favorire la reazione e il pollice che mantiene la corretta posizione della polimerasi sul DNA, pollice e dita sono alpha elica il palmo è a beta foglietto. Nel sito catalitico è importante la presenza di due ioni bivalenti, (es Mg e Zn), il primo va a coordinarsi con l'ossigeno in 2' e lo rende ancora più capace di legare il fosfato aumentandone il potenziale nucleofilo, il secondo si coordina con i fosfati e favorisce il rilascio di pirofosfato. Le dita si muovono aprendosi e chiudendosi durante la replicazione, quando non ce sintesi sono aperte, quando entra un nucleotide le dita si chiudono ruotando di 40°, formato il legame le dita si aprono e il DNA scorre, si passa al successivo nucleotide

Per processività si intende il numero di nucleotidi polimerizzati dalla polimerasi ogni volta che si lega ad una giunzione innesco stampo, la polimerasi ha un'alta processività (1000 paia basi al secondo) ma è limitata dal fatto che il tempo per formare il legame enzima stampo è di un secondo

La polimerasi può sbagliare ad esempio perché le basi azotate possono avere tautomeria cheto enolica, quindi l'enzima cerca di correggere gli errori grazie al fatto che presenta attività esonucleasica (rompe il legame fosfodiesterico), quando riconosce la base errata taglia il nucleotide e lo rimuove

La sintesi del DNA avviene in direzione 5'-3' e è semidiscontinua perché la polimerasi lavora in una sola direzione di propagazione e i filamenti del DNA vanno in senso opposto, il DNA viene aperto dalle elicasi, si crea una forca di replicazione che si muove in una direzione, in questa possiamo riconoscere un filamento veloce che viene sintetizzato secondo la direzione di apertura della forca e la polimerasi non distacca mai, poi ce il filamento ritardato sul quale la sintesi avviene in direzione opposta, la sua sintesi avviene tramite frammenti di Okazaki

L'elicasi è una proteina che denatura l'elica e separa i due filamenti del DNA, è una proteina esamerica, dei 6 domini, due legano ATP, due ADP e due non legano niente, questa conformazione permette all'elicasi di muoversi, durante l'idrolisi cambia la conformazione donando movimento, il DNA tenderebbe spontaneamente a riformare l'elica, questo non succede perché intervengono proteine SSB che legano ssDNA e lo mantengono a singolo filamento. Inoltre quando il DNA viene aperto, a valle dell'elicasi si crea un superavvolgimento, intervengono le topoisomerasi che tagliano il doppio filamento, sciolgono il nodo e lo riuniscono.

La primasi sintetizza il primer a RNA perché la polimerasi è incapace di iniziare la sintesi ex novo, quando la sintesi si è conclusa il primer deve essere rimosso e sostituito con il DNA, la RNasi taglia i ribonucleotidi, questa taglia solo i legami tra ribonucleotidi adiacenti quindi l'ultimo viene lasciato, una esonucleasi lo taglia, il primer è stato rimosso ma a questo punto ci ritroviamo con un pezzo di DNA a singola elica, interviene la DNA polimerasi che sintetizza i nucleotidi mancanti, infine una ligasi salda gli ultimi nucleotidi alla catena

Nei procarioti esistono almeno 5 tipi di polimerasi, la più coinvolta è l'oloenzima della polimerasi III. Negli eucarioti sono state individuate 13 polimerasi, 3 sono quelle di maggiore interesse: polimerasi  $\alpha$  o primasi, agisce da innesco nel processo di replicazione, ha bassa processività, polimerasi  $\delta$  coinvolta nella polimerizzazione del filamento discontinuo e polimerasi  $\epsilon$  che catalizza la sintesi del filamento continuo. Una volta che il primer si è attaccato si attacca la polimerasi  $\alpha$  che comincia a sintetizzare i primi nucleotidi, dato che la processività è bassa si stacca poco dopo per dare lo switching, si attaccano le altre due. La polimerasi si assembla con una proteina detta sliding clamp o pinza che ne aumenta la processività, questa forma un canale 35 Å, il diametro della doppia elica è invece di 20 Å si crea quindi uno spazio sufficiente tra la proteina e il DNA per accogliere due molecole di acqua, quando la polimerasi incontra le sequenze terminatrici si stacca. La sliding clamp è una proteina ad anello che viene caricata sul DNA da un caricatore, questo è una proteina formata da 5 subunità che lega ATP, nella forma con ATP carica la pinza, la inserisce aperta sul DNA e il legame favorisce l'idrolisi di ATP, questo induce la chiusura della pinza e il distacco del caricatore

Inizio della replicazione, è un processo finemente controllato, la sequenza di DNA che controlla l'inizio della replicazione è il replicone che è formato da replicatore dove prende inizio la replicazione e iniziatore che lega il replicatore che da inizio alla replicazione, nel momento in cui deve iniziare la replicazione, la proteina iniziatrice, DNAa si lega a sequenze apposite, in questo momento tende a polimerizzare e per far sì che polimerizzi è necessario che il DNA si pieghi, si forma un ammasso di interazione tra le proteine che induce l'apertura della doppia elica, a questo punto il caricatore carica sull'apertura l'elicasi

La replicazione è finemente controllata, la cellula deve essere sicura che la replicazione venga attivata una sola volta per mantenere il corretto numero di cromosomi, questo è permesso da vari fattori: -il DNA presenta nello stato basale dei siti di metilazione in particolare su specifiche sequenze GATC è metilato sull'Adenina, quando avviene la replicazione il DNA stampo è mutilato mentre quello di nuova sintesi non lo è, lo stato di emimetilazione è un segnale che impedisce al sito di origine di essere riattivato, questo per il momento quando il DNA è in questo stato si lega una proteina SeqA che inibisce l'attacco delle metilasi; - quando il DNA si lega al sito di origine della replicazione l'ATP viene idrolizzato questo è ciò che innesca il movimento della polimerasi ma allo stesso tempo rappresenta un segnale per far sì che il sito di origine non si riattivi. La differenza sostanziale nel controllo dei siti di origine di procarioti e eucarioti è che nei procarioti il segnale che dà inizio è il legame con DNAa e quindi dell'attacco dell'elicasi mentre nella cellula eucariotica il controllo è più fine, il caricamento dell'elicasi (fase G1) e la sua attivazione (fase S) avvengono in due fasi diverse. La telomerasi è un enzima che copia le parti terminali del DNA, i telomeri, la sequenza di questi è TTAGGG e si ripete più volte, formano delle estremità a singolo filamento. La polimerasi è un complesso ribonucleoproteico, proteina legata a RNA, usa se stessa come stampo e copia la sua sequenza a RNA in DNA allungando l'estremità, le proteine Rif e Rap fanno terminare l'allungamento dei telomeri. Ogni cellula ha un limite di Hayflick che indica il limite del potenziale replicativo della cellula che è fissato intrinsecamente (circa 50 divisioni).

La cellula deve avere mutazioni per garantire biodiversità ma devono essere controllate per evitare l'insorgenza di patologie, le mutazioni possono essere causate da elementi trasponibili, errori di duplicazione, danni ambientali, elementi trasponibili. Vediamo dei tipi di mutazioni: -transizione: sostituzione di una prima con pirimidina o viceversa, -trasversione scambio crociato purina pirimidina o viceversa -mutazioni puntiformi - inserzioni inserimento di una base -delezioni rimozione. Le mutazioni spontanee del DNA avvengono solitamente su siti preferenziali detti regioni calde del DNA o Hot Spot.

Supponiamo che in un filamento sia stata commessa un errore, la velocità rallenta e la polimerasi si accorge di averlo commesso, cerca di correggere, se la riparazione non avviene si andrà avanti e in un secondo ciclo di replicazione si parlerà di mutazione.

Danni di tipo chimico: deaminazione, alchilazione, ossidazione, radiazioni UV, raggi X e gamma, radiazioni ionizzanti, mutazioni da analoghi delle basi, agenti intercalanti

Meccanismi di riparazione:

I meccanismi possono essere di riparazione diretta, si ha la riparazione del danno, e si distinguono fotoriattivazione, i raggi solari attivano fotolisi che degrada dimero di timina causato dagli stessi raggi, demetilazione, attiva metiltransferasi che leva metile da guanina e la riporta normale

Oppure possono essere per escissione: il nucleotide danneggiato viene rimosso, il filamento corretto fa da stampo per il reinserimento, riparazione associata alla trascrizione, la polimerasi scorre e copia, se trova una regione deformata si ferma e permette alle proteine di correggere l'errore poi riparte, ricombinazione omologa, recupera le informazioni per sistemare il danno dal cromosoma fratello, si ha quando si ha un doppio filamento con doppia rottura, sintesi di transelezioni, pur avendo una situazione di rottura la polimerasi prosegue nella copiatura e attiva l'ultimo meccanismo, quello di riparazione per transelezioni, attivando polimerasi di transelezioni che replicano il DNA anche se danneggiato, nei procarioti queste polimerasi si chiamano polIV e polo, negli eucarioti polY

Ricombinazione omologa, riarrangiamento tra cromosomi omologhi, permette la variabilità genetica, il recupero di copie di DNA danneggiate, far ripartire forche danneggiate e regolare l'espressione dei geni.

Ricombinazione secondo Holliday: la ricombinazione omologa è un processo sia ripartivo che fisiologico, il punto di partenza è un taglio del DNA, può essere tagliato un filamento di entrambi i cromosomi o entrambi i filamenti di un cromosoma, si forma il filamento invasore (con estremità 3' libera) (il filamento invasore viene creato dal sistema RecBCD, le proteine recD e B sono elicasi e nucleasi, la C prende contatto con entrambi) che invaderà il cromosoma omologo e darà ricombinazione, se il taglio è su un filamento di ogni cromosoma ottengo un chiasma se è doppio ne ottengo due, avvenuto l'incrocio il chiasma migra e questo fa aumentare le regioni di ricombinazione, il chiasma deve poi essere risolto con un taglio se avviene sui filamenti non coinvolti nello scambio ottengo un prodotto di crossing over se avviene su quelli che hanno preso parte allo scambio, si ha un prodotto di patch

Ricombinazione sito specifica, due piccole sequenze di DNA si ricombinano, è catalizzata da ricombinasi, queste sono serina-tirosina ricombinasi e entrambe hanno un OH che catalizza la reazione, che agiscono nelle regioni fiancheggianti il sito di ricombinazione, le sequenze A e B si invertono e il prodotto darà lo stesso DNA con sequenze invertite, si parla di inserzione quando si hanno due sequenze dirette in due molecole di DNA, una circolare e una lineare, si ricombinano e il DNA circolare viene integrato, si parla di d'elezione se si ha ricombinazione di due sequenze dirette sulla stessa molecola di DNA, il DNA si ripiega per avvicinare le due sequenze, si chiama d'elezione perché il prodotto è una molecola di DNA lineare e una circolare, si parla di inversione quando due sequenze su una stessa molecola si invertono

La trasposizione è lo spostamento di segmenti genici da una parte all'altra del cromosoma, è conservativa o duplicativa, i trasposti possono essere a DNA o a RNA.

Vediamo la trasposizione con trasposti a DNA, sono sequenze trasponibili dove si identificano varie regioni: sequenze ripetute invertite, sequenze di duplicazione del sito bersaglio, il pezzo da trasportare, un gene che codifica per la

trasposasi, dato che presentano questo pezzo i trasposti a DNA sono autonomi, il bersaglio può essere casuale, può avvenire in punti caldi del genoma o in sequenze specifiche.

Vediamo il meccanismo taglia incolla, la trasposasi si lega a sequenze ripetute invertite e induce il piegamento del DNA, taglia il DNA creando delle estremità 3' OH libere che fungono da nucleoli per attaccare il bersaglio, un OH attacca un filamento, l'altro attacca l'altro filamento da sotto, il taglio è sfalsato di 2-5 basi si crea un'incisione sfalsata e sul bersaglio si formeranno delle estremità OH 3' libere, il taglio produce una porzione costituita da nucleotidi non appaiati che è il sito di attacco per la polimerasi che copia la porzione non accoppiata, si ha la duplicazione del sito bersaglio. Vediamo ora la trasposizione replicativa, anche qui si ottengono estremità 3' OH libere che attaccano DNA bersaglio, il trasposto nel 5' rimane legato al DNA questo crea due molecole circolari attaccate assieme, si ha la formazione di forche replicate e la polimerasi copia tutto il trasposone, ottengo un prodotto di integrazione che contiene due copie del trasposone, a questo punto il trasposone viene tagliato e trasferito.

Vediamo ora i retrotrasposoni, la struttura presenta sequenze che inducono la replicazione, elemento trasponibile, sequenze ripetute invertite, funzionano come i retrovirus perché trasportano attraverso un intermedio a RNA, per passare da una parte all'altra del genoma viene trascritto in RNA, poi viene retrotrascritto a cDNA a doppio filamento, questo viene digerito per circa 2-3 nucleotidi per formare estremità 3' OH libere che sono estremità appiccicose, queste attaccheranno il sito bersaglio nello stesso modo visto per i trasposoni a DNA.

Retrotrasposoni poli A, hanno una coda poliA ad un'estremità e due geni che codificano per le proteine ORF1 e ORF2, il retrotrasposone viene trascritto in mRNA, va nel citosol, produce ORF1 e ORF2 che vi si legano e lo riportano nel nucleo, ORF2 media l'attacco al sito bersaglio, copia mRNA in cDNA usando il primo filamento di questo sintetizza anche il secondo e si ottiene un DNA copia a doppio filamento che si integra nel sito bersaglio.

La TRASCRIZIONE è la copiatura del DNA in mRNA, la trascrizione è regolata da RNA polimerasi. Vediamo le differenze tra RNA polimerasi e DNA polimerasi: RNA polimerasi non ha bisogno di un primer, l'RNA prodotto non rimane legato allo stampo, la RNA polimerasi è molto meno precisa della DNA polimerasi, la trascrizione copia solo regioni del genoma specifiche e produce un alto numero di copie, il DNA è a doppio filamento e si distinguono un filamento codificante e uno stampo, l'RNA polimerasi copia e sintetizza in direzione 5'-3' e copia il filamento stampo creando una copia di quello codificante.

Esistono varie RNA polimerasi, la RNAPolyl è quella che si occupa della trascrizione genica, la polyl trascrive grandi RNA, la polylIII trascrive tRNA, rRNA5S e RNA nucleari. l'RNA polimerasi ha una struttura a chela di granchio, ha due subunità alpha, due beta e una omega, beta e beta' sono il centro catalitico, le altre permettono l'assemblaggio della polimerasi al DNA e il riconoscimento del promotore.

Vediamo le fasi della trascrizione: - inizio: la polimerasi si attacca al promotore, si forma un complesso chiuso, perché la trascrizione si avvia deve trasformarsi in complesso aperto, si deve formare la bolla di trascrizione, questo si ha quando la polimerasi ha completato l'attacco, la prima fase è detta abortiva, la polimerasi rimane ferma sul promotore e sintetizza 10 nucleotidi, - allungamento: la polimerasi comincia a correre sul DNA, - terminazione: la polimerasi arriva a una sequenza di terminazione e si stacca dal DNA.

I promotori possono essere forti o deboli, la forza di un promotore dipende dalla forza con cui la polimerasi riesce ad attaccarsi e la capacità che ha di evadere dal promotore, viene anche espressa come numero di trascritti in unità di tempo, se il promotore è forte la polimerasi si attaccherà più volte e trascriverà il gene più volte.

Fattore  $\sigma$  è una proteina che interagisce con la polimerasi e ne consente l'attacco sul promotore, si attiva quando si lega alla polimerasi, quando non è legato assume una conformazione ripiegata che nasconde i siti di legame al promotore, è formata da molte subunità,  $\sigma 4$  e  $\sigma 2$  agiscono sul promotore (a -35 e a -10)  $\sigma 3$  agisce sull'apertura dell'elica,  $\sigma 1$  permette di dare l'avvio all'allungamento dell'elica.

La polimerasi può fare una correzione delle bozze con due meccanismi: meccanismo pirofosforolitico, quando si ha un errore viene indotta la modificazione conformazionale dell'enzima che rallenta e invece di inserire un nucleotide inserisce pirofosfato e scinde il legame oppure meccanismo idrolitico: intervengono dei fattori che idrolizzano il nucleotide errato reclutati e attivati dal rallentamento della polimerasi.

La terminazione della trascrizione si ha quando si incontrano sequenze sterminatrici, nei procarioti la terminazione può essere - Rho indipendente: necessita di sequenze ripetute invertite, quando il DNA le copia si forma una struttura a forcina nel trascritto che rallenta la polimerasi, l'ansa è stabile e questo destabilizza il legame con la polimerasi, si stacca e il DNA si richiude o -Rho dipendente: la proteina Rho è una proteina esamerica, riconosce sequenze rut che sono ricche di citosine, determina il blocco della trascrizione su tre nucleotidi a valle di questa sequenza (CUU), questa proteina si lega a RNA sin dall'inizio, scorre e si muove insieme alla polimerasi fino a quando non trova una sequenza rut, si assembla a questa e determina la terminazione della trascrizione.

LA TRASCRIZIONE NEGLI EUCARIOTI, la polimerasi più implicata è la polylII, i fattori di trascrizione giocano un ruolo molto importante, permettono l'ancoraggio della polimerasi al DNA stampo e riconoscono le sequenze iniziatrici, la loro sola attivazione non è sufficiente per l'attivazione della trascrizione, intervengono anche altre proteine, attivatori e repressori, queste legano rispettivamente sequenze enhancer e silencer. I promotori possono trovarsi sia a valle che a monte della trascrizione, si riconoscono diversi tipi: -BRE, riconosciuta da fattore di trascrizione TFIIIB, -tata box, riconosciuta da un dominio del TFIID detto TBP (tata binding protein), -INR, anch'esso riconosciuto da TFIID, -DCE e DPE, a questi fattori di trascrizione si legano proteine regolatrici (vanno a costituire il complesso mediatore) e poi intervengono altre proteine che modificano la cromatina che deve essere rimodellata perché altrimenti il complesso trascrittivo non può attaccare il DNA. Il primo fattore che influisce nella trascrizione eucariotica è TFIID che lega il promotore, ha un dominio TBP che lega la tata box, questo richiama altri due fattori TFIIA e TFIIIB che si assemblano con il primo, la formazione di questo complesso richiama la polimerasi, poi TFIIIF si assembla agli altri e si forma il

complesso chiuso, questo richiama altri due fattori TFIIIE e TFIIH e si passa a complesso aperto, si forma la bolla di trascrizione a questo punto si ha la fosforilazione della coda carbossiterminale della polimerasi (da parte di TFIIH che è una chinasi) e questa comincia a muoversi, nel momento in cui questa scorre via dal promotore si perde il legame con tutti i TF perché servono all'assemblaggio sul promotore, vengono rilasciati e sostituiti da fattori di allungamento. I repressori possono agire a vari livelli: possono inibire il complesso di rimodernamento della cromatina oppure competere per il legame dell'attivatore al complesso del mediatore, oppure ancora competere con il legame degli attivatori al DNA. La fosforilazione permette l'evasione della polimerasi dal promotore ma recluta anche altre proteine per la maturazione dell'mRNA, la maturazione dell'mRNA infatti non avviene a trascrizione completata ma avviene durante il processo di allungamento, se la fosforilazione avviene sulla serina in 5' recluta le proteine per la formazione del cappuccio di metil-guanina, se avviene sulla serina in 2' recluta proteine per lo splicing. Vediamo quali sono le fasi della maturazione dell'mRNA: -Capping: è l'introduzione della metil-guanina in 5', permette l'assemblaggio del messaggero sul ribosoma, una trifosfatasi elimina un fosfato e poi una guaniltransferasi introduce una guanina, una metiltransferasi metila la guanina; -Poliadenilazione: è l'inserimento in 3' di una coda poli A che permette la purificazione dell'mRNA, questa è catalizzata da due proteine CSTF (taglia RNA) e CPSF (fattore di taglio e stimolatori). La terminazione della trascrizione come avviene? Per staccarsi dal DNA sono stati proposti vari modelli: -Modello a siluro: intervengono proteine Rat, la polimerasi scorre, quando trova una sequenza segnale taglia RNA e lo poliadenila ma continua la trascrizione, questo pezzetto in più sarà privo del cappuccio di metile guanina in 5', le proteine Rat lo riconoscono lo tagliano e degradano e fanno staccare la polimerasi; -Modello allosterico con l'inserimento della coda Poli A si ha un cambiamento conformazione della polimerasi che si stacca.

Il DNA genomico è costituito da esoni intervallati da introni, la polimerasi copia entrambi e nel pre mRNA si hanno entrambi, gli introni devono essere eliminati tramite reazione di SPLICING, di queste ne esistono vari tipi: - splicing catalizzato da spliceosoma, splicing autocatalitico, splicing alternativo, trans-splicing, editing dell'RNA. Nell'introne si hanno specifiche sequenze che guidano lo splicing, in 5' si ha un sito donatore con sequenze GU, in 3' un sito accettore con sequenze AG, poi si ha un sito costituito da poli uridina e uno centrale detto punto di ramificazione, dal quale parte lo splicing, costituito da Adenina, questa usa l'OH in 2' del ribosio per attaccare il legame fosfodiesterico che unisce esone e introne, attacca il sito di splicing in 5' quindi il legame tra l'ultima base dell'esone e la prima dell'introne, l'esone viene liberato e il 5' dell'introne si lega all'Adenina formando una struttura a cappio, l'esone avrà un OH libero in 3' e lo userà per legare la prima base dell'esone successivo, affinché queste reazioni avvengano sere che sui siti di splicing si vadano a legare le proteine dello spliceosoma. Lo spliceosoma è un complesso di proteine e RNA nucleari, ssRNA indicati con U1,U2,U4,U5,U6, nella attivazione dello splicing si assemblano formando ssRNP (proteine associate a ribonucleotidi), lo splicing è fortemente direzionale, i primi due elementi che si legano sono U1 che si lega al sito donatore in 5' e BBP che lega il sito di ramificazione, questa è caricata con U2AF che tramite due subunità si attacca al sito poliuridinico e al sito 3' di splicing, quando U2 si lega la BBP viene spiazzata, l'Adenina viene estroflessa e spinta verso l'esterno, si attacca il complesso formato da U4 e U5 che si assemblano su U2 e portano la sostituzione di U1 con U6, la molecola si inizierà a piegare perché U2 e U6 sono complementari e interagiscono, si otterrà il taglio in 5' e il distacco del complesso, una volta rimossi gli introni vengono degradati rapidamente. Si possono avere degli errori da parte dello spliceosoma, come il salto di un esone o la selezione di un pseudo sito di splicing, con perdita di una parte di un esone. Lo splicing è un sistema definito mutualmente esclusivo la cellula sceglie un meccanismo di splicing rispetto all'altro, la scelta si basa su due fattori, il primo è ingombro storico che può determinare l'incapacità delle componenti dello spliceosoma di posizionarsi, l'altro è la combinazione dei siti di taglio primario e secondario, all'interno del gene si possono trovare siti di splicing minori e maggiori lo spliceosoma può riconoscere l'uno o l'altro ma non si può avere un mescolamento. Vediamo gli altri tipi di splicing, il trans splicing avviene tra due RNA distinti, lo splicing minore riconosce diverse sequenze che si trovano con minore frequenza, le ribonucleoproteine che intervengono sono U11 e U12. Poi abbiamo lo splicing alternativo che può dare diversi risultati, partendo da un trascritto primario con tre esoni possiamo avere: un trascritto normale, il salto di un esone, un esone esteso, un introne mantenuto o esoni alternativi (viene alternativamente eliminato un esone o l'altro). Lo splicing alternativo è in alcuni casi necessario per la variabilità genetica ma in altri può interferire con lo stato della cellula, vediamo ad esempio il fenomeno della pluripotenza, ciò che permette a una cellula di mantenere o meno la pluripotenza è l'espressione di geni che controllano lo stato staminale, Oct4 e NANOG, FOXP1 è un fattore di trascrizione che controlla la produzione di questi geni e favorisce il mantenimento della pluripotenza, è formato da 4 esoni e 3 introni, quando viene trascritto può subire due splicing alternativi, si può avere la perdita dell'esone 18a, con il mantenimento della staminalità oppure posso perdere il 18b, in questo caso la cellula va in contro a differenziazione.

**REGOLAZIONE della trascrizione nei PROCARIOTI** è regolata da attivatori e repressori, in assenza di regolatori ogni gene ha una trascrizione basale, i regolatori si legano a una regione nel promotore detta operone, un operone è un gruppo di geni che vengono trascritti in un singolo RNA sotto il controllo di un solo promotore, l'RNA prende il nome di policistronico. L'operone lac contiene tre geni LacZ (sintetizza beta galattosidasi) LacY (codifica per una permeasi) e LacA (sintetizza proteina che elimina i prodotti metabolici tossici), se la cellula ha alti livelli di lattosio viene liberato l'induttore che lega il repressore e lo inattiva e quindi la trascrizione può avvenire, se la cellula ha bassi livelli di lattosio viene sintetizzato il repressore Lac, se i livelli di lattosio e glucosio sono equimolari si ha la trascrizione basale.

**REGOLAZIONE della trascrizione negli EUCARIOTI** hanno meccanismi di regolazione più fini, ogni gene è controllato da un promotore, l'attivazione della trascrizione è regolata da attivatori che si raggruppano in regioni enhancer, il DNA si ripiega per avvicinare gli enhancer al promotore tramite proteine accessorie, quando sono lontani dal promotore la cellula fa sì che questi controllino i promotori necessari, lontani, ma non quelli frapposti tra la regione e il promotore, questo grazie a degli isolatori, es proteina CTCF.

Gli attivatori assumono diverse conformazioni nel legare il DNA: - Omeodominio, attivatori che si strutturano a formare tre alpha eliche, una interagisce con legame a idrogeno con solco maggiore, una fa da ponte e una interagisce con solco minore, - Domini contenenti Zinco, questo va a formare legame di coordinazione, fa assumere a una proteina una determinata conformazione che permette di mantenere i domini in posizione ottimale per ancorarsi al DNA, - Motivo a cerniera di leucine, è un dimmelo che si organizza a formare una specie di cerniera, si pone a ponte sul DNA e prende controllo con i lati opposti della doppia elica. Gli attivatori possono agire in maniere diverse: - possono non legare direttamente la polimerasi ma la modula a distanza con il complesso del mediatore con cui prende contatto, - può attivare fattori di trascrizione, - possono agire sul meccanismo di mediazione dei nucleosomi, - possono reclutare l'acetiltransferasi che favorisce l'acetilazione degli istoni che srotolano il nucleosoma e attivano la trascrizione, - possono reclutare il complesso di rimodernamento della cromatina che srotola il nucleosoma, inoltre possono non agire sull'inizio della trascrizione ma reclutare in seguito fattori di allungamento. Gli attivatori non agiscono singolarmente ma solitamente più attivatori agiscono in maniera sinergica, uno può aumentare l'affinità di un'altro, possono aumentare l'affinità vicendevolmente oppure possono aumentare l'affinità di un terzo. I repressori possono legare regioni interne al promotore bloccando l'attacco della polimerasi ma anche agire in modi diversi, possono agire per competizione, spiazzando l'attivatore, oppure possono agire per inibizione oppure per repressione diretta, legando la polimerasi e inattivaandola oppure per repressione indiretta reclutando deacetilasi che deacetilando gli istoni blocca la trascrizione o tramite metilazione che favorisce lo stato della cromatina compattato. Le molecole prodotte durante il metabolismo cellulare attivano la trascrizione attraverso l'innescamento di segnali intracellulari, queste vie di segnale sono numerose, vediamo due esempi: Via di segnale delle STAT, proteine segnale attivate dalle citochine che agiscono su recettori tirosinchinasici che dimerizzano, fosforilano e inducono l'attivazione di STAT che va nel nucleo e lega specifiche sequenze enhancer, oppure la Via della RAS, fattori di crescita che legano recettori tirosinchinasici, il loro legame con il recettore induce dimerizzazione e fosforilazione che attiva la Ras, una G proteina che in forma attiva modula le MAPK, chinasi che vanno nel nucleo e attivano la trascrizione.

Il sequenziamento del DNA è un processo che serve a mettere in fila le basi che costituiscono il frammento di DNA in analisi, in modo da poterlo leggere propriamente ed analizzare.

Il metodo Sanger è un metodo enzimatico, si basa sull'uso di nucleotidi modificati per interrompere la sintesi in posizioni specifiche, introducendo questi bloccanti in basse quantità si avrà una serie di filamenti di misure diverse in base a dove tali nucleotidi sono stati incorporati, questi vengono marcati per poterli osservare successivamente. I frammenti vengono poi separati con elettroforesi su gel di agarosio, discriminandoli per le loro dimensioni.

Il pirosequenziamento (o 454) è una tecnica più recente ad elevato parallelismo, si basa sull'uso di enzimi che producono luce in presenza di atp quando un nucleotide viene incorporato nel filamento. 1. La sequenza da analizzare, dopo essere stata amplificata con la PCR, viene incubata come singola elica insieme agli enzimi DNA polimerasi, ATP solforilasi, luciferasi e apirasi e ai substrati adenosinolfosfato (ASP) e luciferina; 2. Uno dei quattro nucleotidi è aggiunto alla reazione. La DNA polimerasi catalizza l'aggiunta di tale base solo se è complementare, in tal caso si ha concomitante liberazione di pirofosfato; 3. Il pirofosfato viene trasformato in ATP, ad opera della solforilasi, l'ATP ottenuto consente la conversione della luciferina ad ossiluciferina ad opera della luciferasi con produzione di un segnale luminoso che viene rilevato da un'apposita camera fotosensibile. L'incorporazione nel filamento dei nucleotidi genera una quantità di luce che è proporzionale al numero di basi incorporate in un'unica aggiunta di nucleotidi (ad esempio, nel caso di una sequenza omopolimerica tipo AAA, TTT, GGG o CCC, la quantità di luce liberata è proporzionale al numero di nucleotidi incorporati, in questo caso 3); 4. L'enzima apirasi degrada i nucleotidi che non vengono incorporati a questo punto si aggiunge un secondo nucleotide per far progredire la reazione di polimerizzazione (ritornando allo step 1); 5. Si aggiungono ciclicamente tutti e 4 i nucleotidi fino alla deduzione completa della sequenza. Questo metodo è molto utile perché riesce a sequenziare in poche ore milioni di paia di basi, inoltre non da problemi di radioattività dato che non necessita di marcatori, il problema è il costo molto elevato.

Il Southern blotting è una metodologia usata in biologia molecolare per rilevare la presenza di specifiche sequenze di DNA in una miscela complessa. Questo è possibile tagliando il DNA genomico con appositi enzimi, gli enzimi di restrizione, e facendolo migrare su un gel che permetta la separazione dei vari frammenti per dimensione.

A questo punto si trasferisce il DNA per capillarità su un filtro di nylon, sul quale il DNA aderisce in maniera salda. Infine si mette a contatto questo filtro con una sonda, cioè un frammento di DNA specifico per la sequenza ricercata e marcato radioattivamente. A questo punto si adagia una pellicola fotografica sul filtro, e se nel genoma era presente la sequenza di interesse, questa verrà impressionata in un punto preciso dalla radioattività derivante dalla sonda che si è legata al DNA complementare del campione. Il risultato sarà la presenza di una banda scura sulla pellicola fotografica. Questa tecnica trova moltissime applicazioni sia nella diagnostica molecolare di malattie che nella ricerca di base.