

ACIDI NUCLEICI

L'informazione genetica è contenuta nel DNA, in grado di duplicarsi tramite il processo di replicazione. Può essere trascritto producendo una molecola chiamata RNA, la quale può essere tradotta per dare origine alle proteine.

Gli acidi nucleici sono macromolecole di grande importanza per la cellula, per il loro ruolo nell'immagazzinamento, trasmissione ed espressione dell'informazione genetica. Sono POLIMERI LINEARI di nucleotidi, uniti in una sequenza ben determinata, essenziale per la loro funzione. I due tipi principali di acidi nucleici sono il DNA (acido desossiribonucleico) e l'RNA (acido ribonucleico). Differiscono tra di loro per il tipo di zucchero che contengono e per la loro struttura: il DNA contiene lo zucchero desossiribosio e presenta una struttura a doppia elica, mentre l'RNA contiene il ribosio, uno zucchero a cinque atomi di carbonio ed è formato da un singolo filamento. A causa di queste differenze essi presentano anche una diversa funzione. Mentre il DNA è il depositario dell'informazione genica, l'RNA regola l'espressione genica e la sintesi proteica.

Dogma Centrale

DNA



Trascrizione

RNA



Traduzione

Proteine

DNA

È la molecola depositaria dell'informazione genetica, cosa non scontata. È una macromolecola semplice per essere duplicata con più semplicità. Le caratteristiche richieste a questo composto per svolgere questa funzione sono:

- Essere presente in tutte le cellule
- Avere una struttura che gli consenta di contenere una grande quantità di informazione
- Avere una struttura che gli permetta di essere duplicato con facilità
- Essere una molecola sufficientemente stabile
- Essere presente nelle cellule di un dato organismo in quantità costante, indipendentemente dalle condizioni ambientali, dall'età ecc
- Se introdotto, in opportune condizioni, in una cellula deve essere in grado di modificare le caratteristiche genetiche

I quattro esperimenti che hanno consentito di definire questa molecola come la molecola in grado di contenere l'informazione sono di:

MIESCHER (1871)

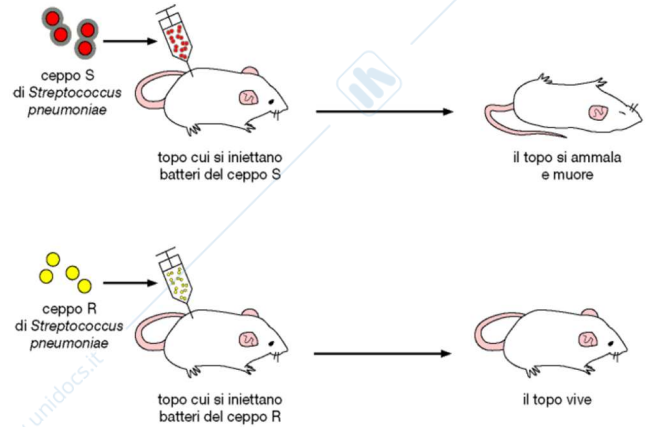
Nei suoi esperimenti iniziali, nell'intento di studiare la natura chimica del nucleo cellulare, isolò i nuclei parziali dai globuli bianchi (leucociti) del sangue, presenti nel pus di bende chirurgiche (era un medico di guerra). In seguito al trattamento dei nuclei con alcali, scoprì una sostanza anomala ricca di fosfato, che chiamò NUCLEINA

ESPERIMENTI DI GRIFFITH (1928)

L'errata interpretazione di alcuni esperimenti di colorazione del DNA portò alla conclusione che la quantità di DNA poteva cambiare drasticamente all'interno delle cellule. Come risultato, molti scienziati furono indotti a credere che il materiale genetico fosse rappresentato dalle proteine, in quanto più complesse, costituite da 20 amminoacidi diversi in grado di assemblarsi in un gran numero di combinazioni, generando la variabilità di sequenza. Al contrario si vedeva la molecola di DNA come un polimero troppo semplice, costituito dalla stessa ripetizione monotona di quattro basi. Era quindi considerato un supporto strutturale dei geni.

Frederick Griffith, grazie allo studio un ceppo patogeno di un batterio che causava negli animali una polmonite con esito fatale, successivamente denominato *Streptococcus Pneumoniae*, scoprì che questo batterio esiste in due forme, identificate come CEPPO S e CEPPO R.

Il ceppo S cresciuto in un terreno di agar solido produce colonie lisce e lucide a causa di una capsula polisaccaridica mucosa secreta da ogni cellula. Al contrario il ceppo R non possiede questa caratteristica e quindi produce colonie che hanno aspetto rugoso. Quando iniettato nei topi, il ceppo S (senza il ceppo R) induce una polmonite mortale. La capacità di indurre la malattia è direttamente correlata alla presenza nel ceppo S della capsula polisaccaridica, che protegge la cellula batterica dall'attacco da parte del sistema immunitario del topo. Quando invece si inietta il ceppo R, il topo non si ammala e vive.

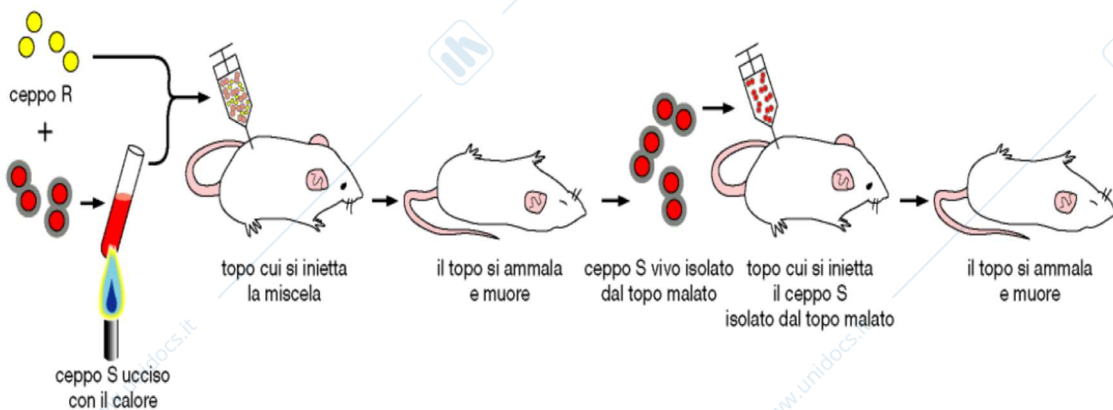


Successivamente Griffith inattiva il ceppo S virulento utilizzando il CALORE, e lo inietta in un topo: il topo non si ammala e vive.



TRASFORMAZIONE

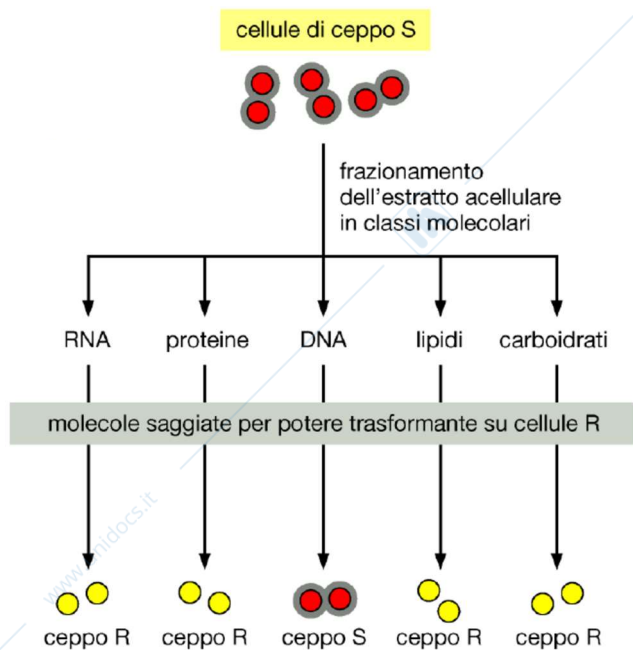
Una delle più importanti osservazioni fatte dallo scienziato fu che la polmonite poteva anche essere indotta iniettando una miscela di batteri di ceppo R vivi e di ceppo S morti. Questa scoperta fu sorprendente, considerando che né il ceppo R vivo e né il ceppo S morto, iniettati da soli, erano in grado di far ammalare il topo. Grazie ad un'autopsia, Griffith trovò gli animali brulicanti di ceppi S vivi: egli concluse che i batteri non patogeni di ceppo R erano stati convertiti in batteri patogeni di ceppo S da qualche sostanza presente nei batteri morti di ceppo S coiniettati. Chiamò questo fenomeno TRASFORMAZIONE GENETICA.



ESPERIMENTO DI AVERY, MacLEOD E McCARTY (1944)

Le scoperte di Griffith rappresentarono il punto di partenza per 14 anni di lavoro per questi scienziati, i quali continuarono la ricerca sulla trasformazione batterica e domandandosi quale fosse la componente dei batteri di ceppo S, uccisi con il calore, realmente responsabile dell'attività trasformante.

Il frazionamento dell'estratto acellulare in classi molecolari delle cellule di ceppo S, permise di dimostrare che solo la frazione degli acidi nucleici era in grado di causare la trasformazione: iniettando le singole classi molecolari in cellule batteriche di ceppo R, solo il DNA era stato in grado di trasformarle in cellule batteriche di ceppo S. Inoltre, l'attività era specificamente eliminabile mediante trattamento con la desossiribonucleasi, un enzima che degrada il DNA.



Conclusione: la sostanza trasformante dello pneumococco è il DNA, nonché la classe di molecole che porta l'informazione ereditabile.

--- L'RNA contiene parte dell'informazione genetica necessaria, ma la può acquisire solo per un periodo di tempo limitato, in quanto dopo aver svolto la propria funzione si degrada. Solo il DNA rimane stabile nel tempo (deve essere trasmessa alle cellule figlie). ---

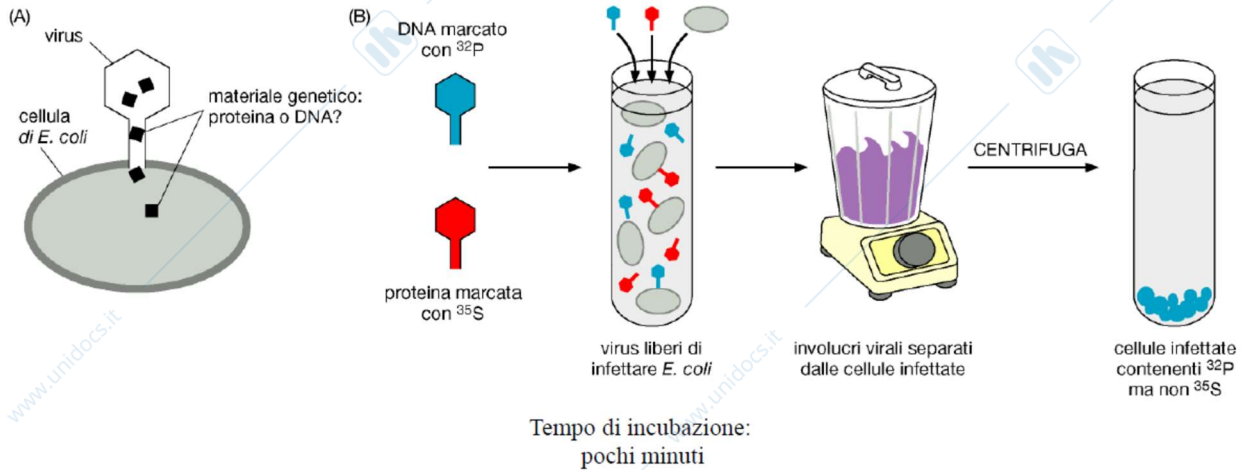
ESPERIMENTO DI HERSHEY E CHASE (1952)

Benché gli esperimenti descritti precedentemente fossero stati rigorosi, il riconoscimento di un ruolo genetico al DNA non fu immediatamente accettato. Otto anni più tardi ogni dubbio fu dissipato quando si dimostrò che il DNA rappresenta il materiale genetico di un virus, il BATTERIOFAGO T2.

I BATTERIOFAGI o FAGI sono virus che infettano i batteri. La *testa* del fago è rappresentata da una capsula proteica, modellata come un icosaedro cavo con all'interno il DNA. La testa è attaccata a una *coda* proteica utilizzata per ancorarsi a un batterio e iniettarvi il proprio DNA. Il ciclo replicativo di un fago inizia quando una particella del fago viene assorbita sulla superficie di una cellula batterica e inietta il suo DNA nella cellula. Il DNA del fago di replica nella cellula ospite e codifica per la sintesi delle proteine virali. Questi componenti si assemblano per formare nuove particelle fagiche. Alla fine la cellula si lisa (si rompe) rilasciando le nuove particelle virali che possono infettare altri batteri.

Tra i fagi che infettano E. Coli è il batteriofago T2. Nel 1952 Hershey e Chase allestirono un esperimento per stabilire quale tipo di molecola trasporta l'informazione genetica che innesca la produzione di nuove particelle fagiche. Esistevano solo due possibilità in quanto questo virus era costituito solo da due tipi di molecole: DNA e proteine. Siccome le proteine del virus T2 contengono zolfo (negli amminoacidi di metionina e cisteina) ma non il fosforo, mentre il DNA contiene il fosforo (nello scheletro zucchero-fosfato) ma non lo zolfo, i due scienziati preparano due aliquote di particelle virali T2 (batteriofagi integri) con differenti tipi di marcatura radioattiva (si mettono nello stesso brodo di coltura i batteriofagi e nucleotidi marcati). In un'aliquota le proteine fagiche vengono marcate con l'isotopo radioattivo ^{35}S , mentre nell'altra aliquota il DNA fagico viene marcato con l'isotopo radioattivo ^{32}P . Successivamente mescolarono i fagi radioattivi con

le cellule batteriche di *E. coli* intatte in una soluzione fredda, permettendo in pochi minuti l'adesione delle particelle fagiche alla superficie dei batteri e l'iniezione del loro materiale genetico all'interno delle cellule. A questo punto scoprirono che era possibile rimuovere facilmente, mediante agitazione della sospensione in un normale frullatore, gli involucri proteici vuoti dei fagi (detti "fantasmi" dei fagi) e recuperare mediante centrifugazione le cellule batteriche.



Misurando la radioattività nel liquido e nel sedimento di cellule batteriche sul fondo della provetta, dimostrarono come nella maggior parte dei casi solo quando il batterio era stato infettato da un fago marcato con ^{32}P veniva rilevata la radioattività, mentre la quasi totalità dello ^{35}S era rilasciato nel mezzo circostante. Questo esperimento mostra che il materiale iniettato dal fago è il DNA e non le proteine, rappresentando così il materiale genetico di T2.

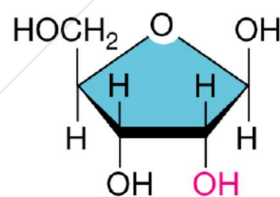
--- sebbene il DNA a doppia elica sia il vettore predominante delle informazioni genetiche, alcuni virus violano questa regola generale. Alcuni tipi di batteriofagi portano il loro materiale genetico nel DNA a singolo filamento e un gruppo molto più ampio di virus trasporta il loro materiale genetico nell'RNA. Un esempio può essere il *virus del mosaico del tabacco* (TMV). Un altro gruppo di virus contenenti RNA, importanti per la salute umana, sono i retrovirus. In questo caso l'RNA serve come stampo per produrre DNA complementare all'interno delle cellule infette utilizzando uno speciale enzima, la trascrittasi inversa. Un esempio di retrovirus può essere il virus dell'immunodeficienza umana (HIV). ---

COMPOSIZIONE CHIMICA DEL DNA

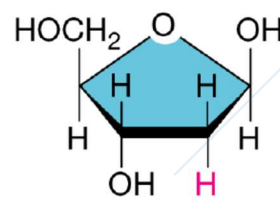
Gli acidi nucleici sono macromolecole informazionali che contengono unità monomeriche non identiche in una sequenza specifica, detti NUCLEOTIDI.

Un nucleotide è il monomero degli acidi nucleici che consiste in tre parti principali: uno zucchero pentoso, a cinque atomi di carbonio, a cui sono legati un gruppo fosfato al carbonio 5 mediante un legame fosfoestere, e una base azotata legata al carbonio 1.

Zucchero (aldo) pentoso →

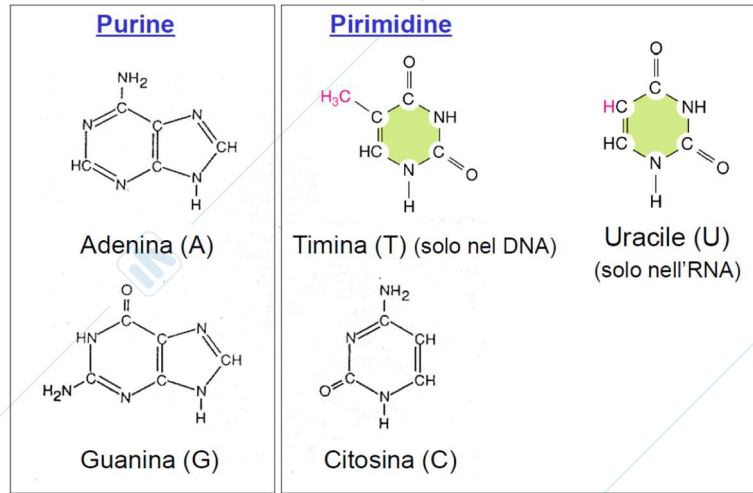


ribosio
si trova nell'acido
ribonucleico (RNA)



deossiribosio
si trova nell'acido
deossiribonucleico (DNA)

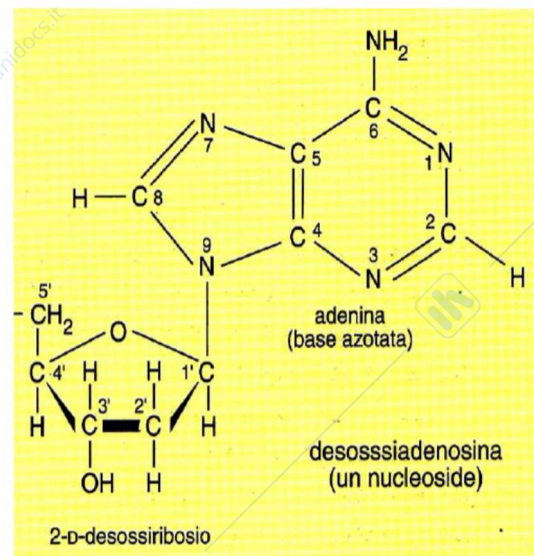
Le basi azotate →



Se da un nucleotide viene rimosso il fosfato, l'unità base-zucchero che ne deriva è detta NUCLEOSIDE: può essere desossiribonucleoside o ribonucleoside.

DNA: adenosina, guanosina, citidina, timidina

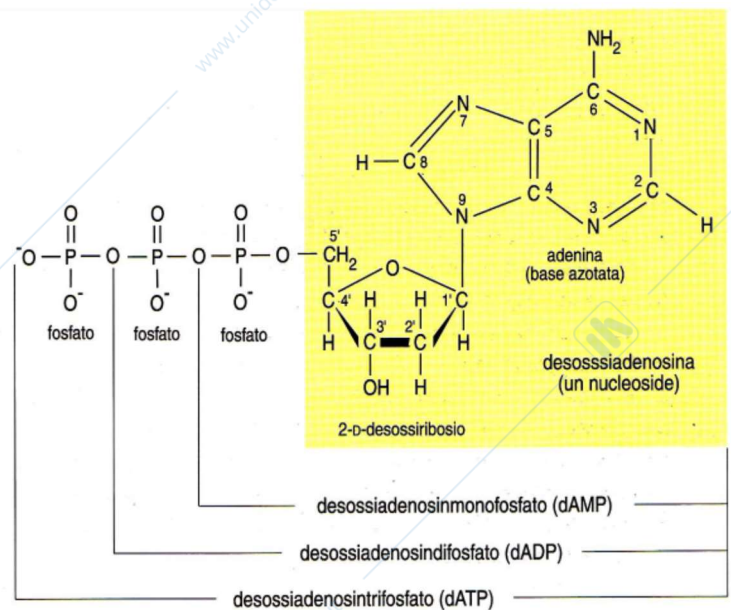
RNA: adenosina, guanosina, citidina, uridina



NUCLEOTIDE (DNA) base azotata+zucchero+PO₄

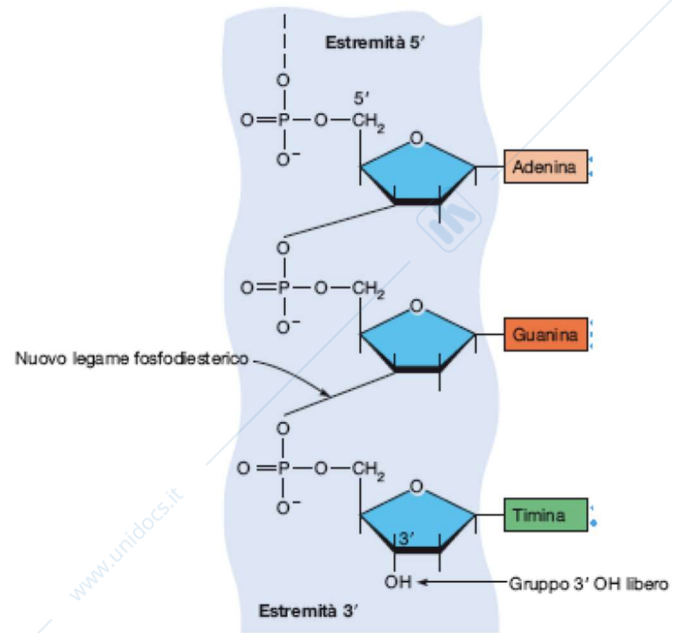
Desossiadenosinatrifosfato	dATP
Desossitimidina trifosfato	dTTP
Desossiguanosinatrifosfato	dGTP
Desossicitidinatrifosfato	dCTP

I nucleotidi e i nucleosidi che contengono desossiribosio sono indicati con una lettera "d" che precede la lettera che identifica la base



LEGAME FOSFODIESTERICO

È un legame covalente, generato dalla DNA polimerasi o RNA polimerasi. Può essere scisso enzimaticamente da enzimi quali Dnasi o Rnasi. Si forma in una catena polinucleotidica (come il DNA o l'RNA) tra il fosfato associato al carbonio in posizione 5 dello zucchero di un nucleotide e il carbonio in posizione 3 dello zucchero del nucleotide successivo. Il polinucleotide che si forma grazie a questi legami ha una direzionalità intrinseca: ad una estremità della catena il primo nucleotide presenta un ossidrilico libero (-OH) al carbonio in posizione 3 dello zucchero, mentre all'altra estremità l'ultimo nucleotide presenta un gruppo fosforico (-PO₄) al carbonio in posizione 5 dello zucchero. Le due diverse estremità vengono dette estremità 3' (-OH) e 5' (-PO₄).



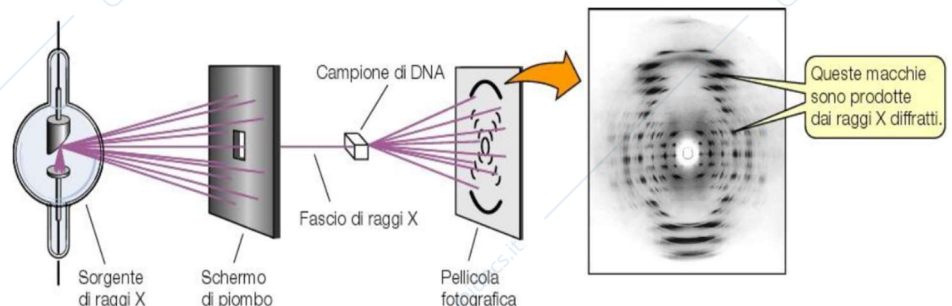
Nel momento in cui si ha la formazione di un nuovo legame (grazie all'enzima DNA polimerasi), i tre fosfati vengono scissi: il fosfato alfa è quello che rimane nella catena nascente di DNA mentre gli altri vengono idrolizzati.

La DNA polimerasi, per decidere quale base azotata aggiungere, ha bisogno di un filamento di stampo e di identificare la base alla quale dovrà appaiarsi successivamente. Il filamento stampo ha orientamento opposto (sono antiparalleli). L'appaiamento tra basi dipende strettamente dalle caratteristiche chimiche delle basi stesse: contengono gruppi carbonilici e atomi di azoto che, in opportuna condizioni, sono in grado di formare legami idrogeno.

LA STRUTTURA DEL DNA

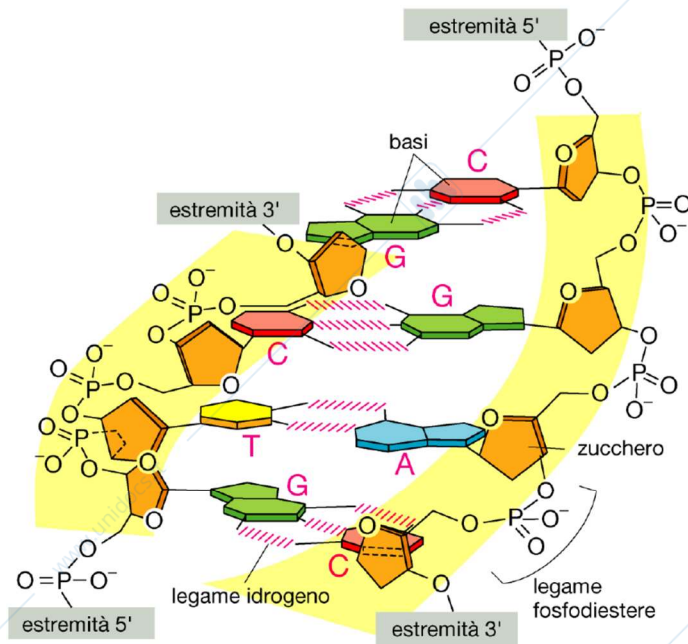
Tra il 1944 e il 1952 Erwin Chargaff utilizzò metodi cromatografici per separare la molecola di DNA nelle sue basi costituenti, in modo tale da determinare la loro PERCENTUALE di ABBONDANZA RELATIVA e quantificare le quantità relative delle quattro basi azotate: dimostrò che il DNA isolato da cellule diverse di una data specie mostra la stessa percentuale di ognuna delle quattro basi, e questa percentuale non varia in individui e tessuti diversi, o al variare dell'età, dello stato nutrizionale o dell'ambiente (cellule devono contenere la stessa informazione genetica). Notò inoltre che la composizione in basi del DNA varia da specie a specie, ma la più importante osservazione fu la scoperta che, per ogni campione di DNA esaminato, il numero delle adenine è uguale al numero delle timine (A=T), e il numero delle guanine è uguale al numero delle citosine (G=C). Ciò significa che il numero delle purine è uguale al numero delle pirimidine (A+G=C+T): queste equivalenze sono conosciute come REGOLE DI CHARGAFF.

Successivamente Rosalind Franklin e Maurice Wilkins lavorarono per produrre dati di cristallografia sul DNA. Dal quadro di diffrazione ai raggi X veniva indicata la struttura elicoidale del DNA, con un motivo strutturale ripetuto ogni 0,34 nm e un altro ripetuto ogni 3,4 nm.

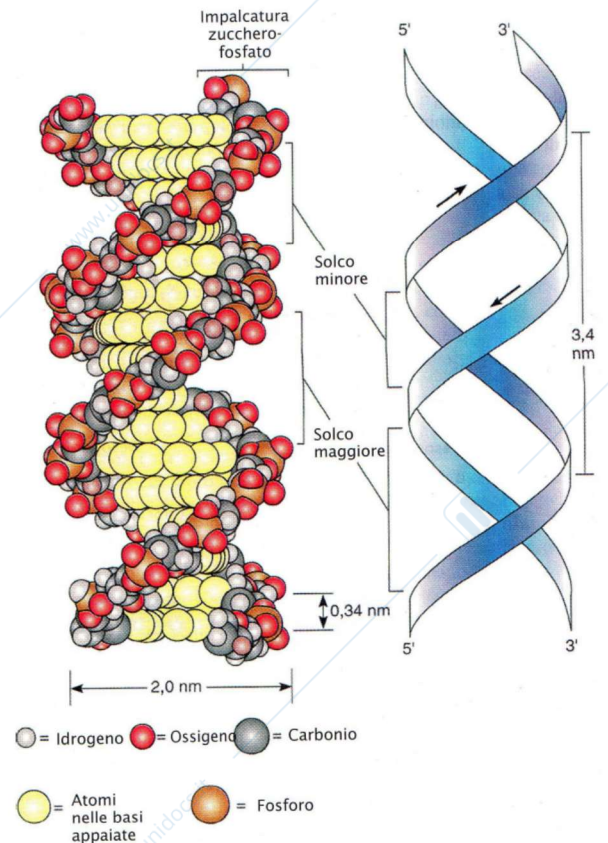
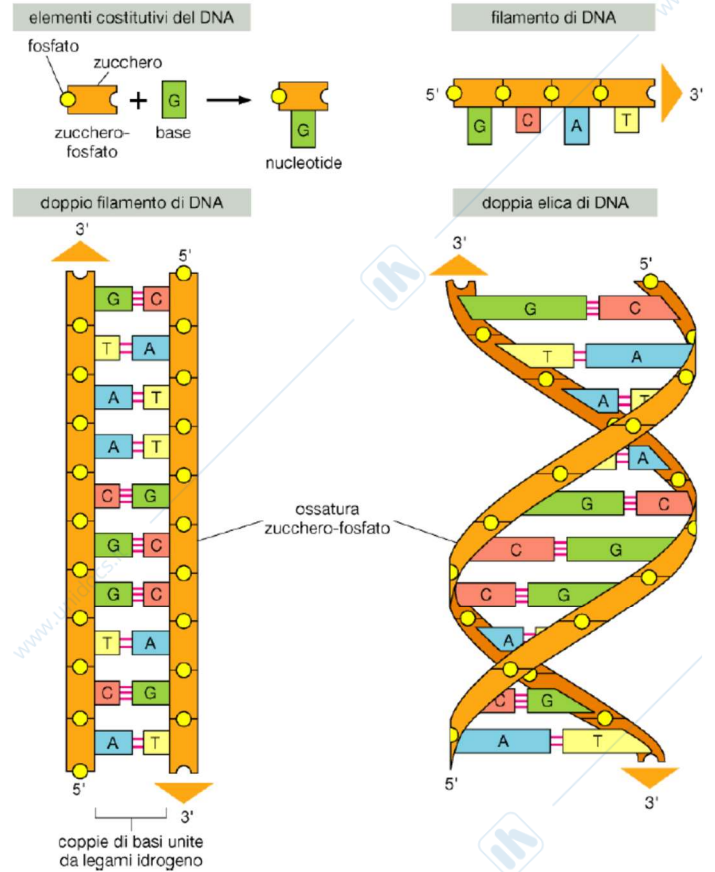


Sulla base delle regole di Chargaff e i dati di diffrazione dei raggi X della Franklin e Wilkins, Watson e Crick nel 1953 produssero un modello del DNA costituito da due filamenti avvolti tra loro (inizialmente si pensava fosse una struttura a tre filamenti): una **DOPPIA ELICA**. Nel loro modello gli scheletri di zucchero-fosfato sono posti all'esterno dell'elica (riducendo al minimo le repulsioni tra i gruppi fosfato carichi), mentre le basi sono all'interno verso il centro dell'elica, parallele tra loro e perpendicolari all'asse. L'elica è destrorsa, ovvero curva in alto verso destra. La struttura contiene dieci coppie di nucleotidi per giro dell'elica e avanza di 0,34 nm per ogni coppia.

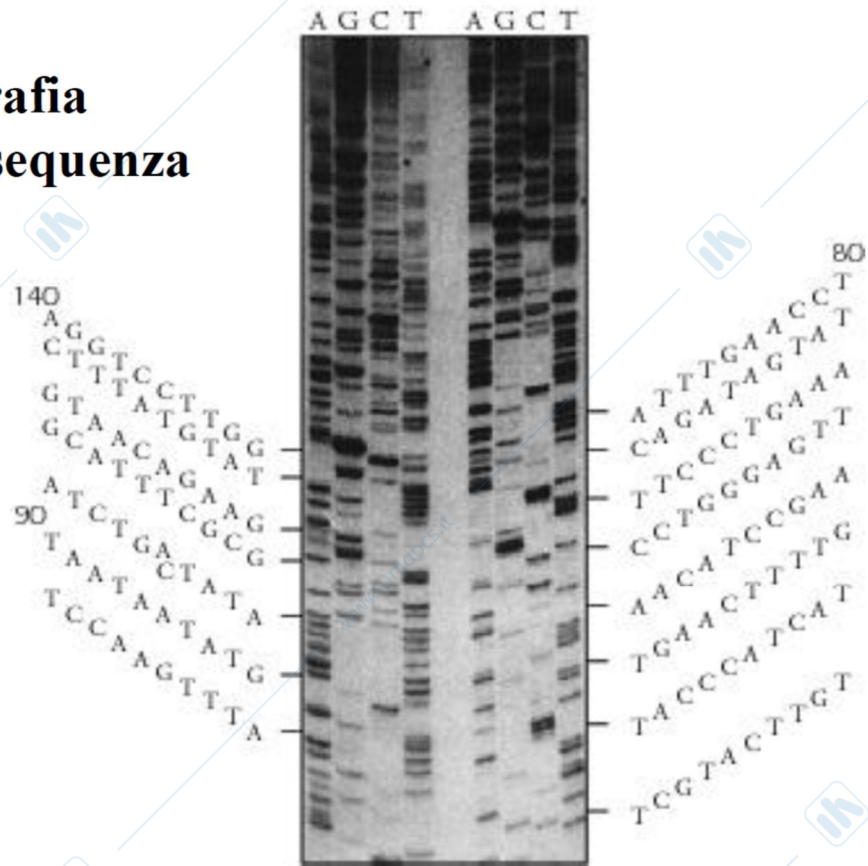
I due filamenti non sono legati da nessun legame covalente: sono invece uniti dai legami idrogeno fra le basi opposte (massimizzati quando A-T e G-C). I due filamenti della doppia elica sono **COMPLEMENTARI** e **ANTIPARALLELI**.



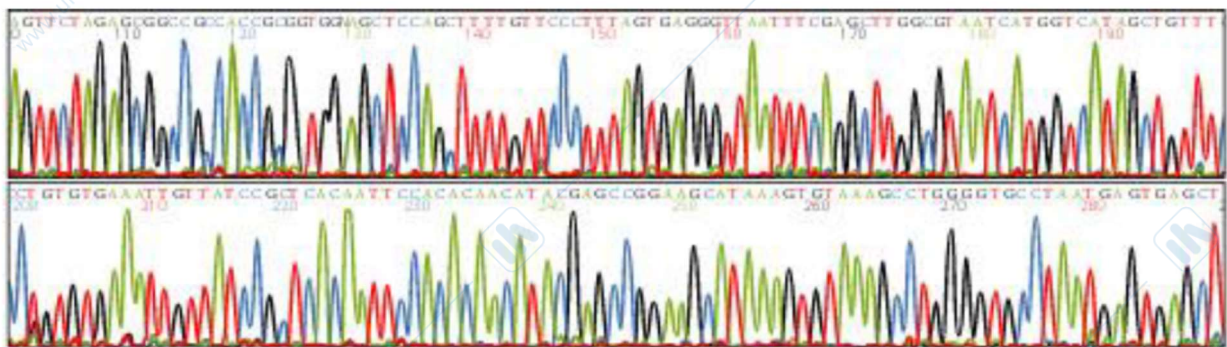
La più importante implicazione di questo modello era che suggeriva un meccanismo con cui le cellule potevano replicare la loro informazione genetica. Prima della divisione cellulare, i due filamenti della doppia elica possono separarsi, in modo tale da fungere entrambi da stampo, dirigendo la sintesi, secondo le regole dell'appaiamento tra basi, di un nuovo filamento complementare. Ora sappiamo che questo processo di separazione è parte attiva della **TRASCRIZIONE** e **TRADUZIONE** del DNA (in laboratorio è possibile denaturare il DNA tramite l'innalzamento della temperatura).



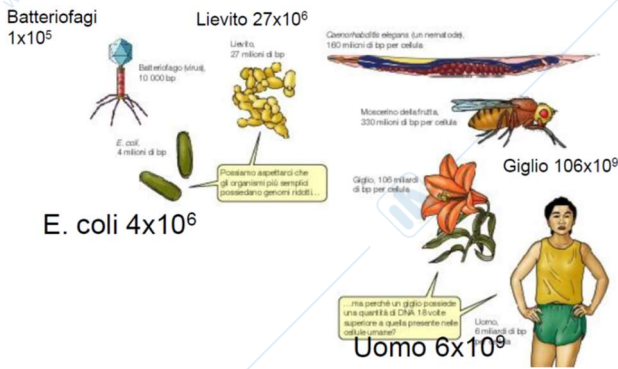
Autoradiografia di un gel di sequenza



Sequenziamento automatico del DNA



QUANTITA' DI DNA NEGLI ORGANISMI



Aumentando la complessità dell'organismo aumenta il numero di basi, ma questo non avviene sempre (giglio).

Il genoma umano diploide contiene 6×10^9 coppie di basi.

Un genoma aploide umano dunque contiene 3×10^9 coppie di basi, e la sua lunghezza calcolata è di ben 94 cm. Dunque ogni nucleo delle nostre cellule contiene quasi due metri di DNA... deve essere compattato.

Il nostro DNA e i nostri cromosomi non hanno sempre la stessa struttura:

- **INTERFASE** (tutta la vita della cellula tranne la fase di mitosi), in cui avviene principalmente l'accrescimento e la duplicazione
- **MITOSI**, durante la quale la struttura del DNA si compatta per andare in seguito a formare i **CROMOSOMI MITOTICI**

Il DNA all'interno delle cellule eucariotiche si organizza e si compatta nella **CROMATINA**, una struttura che può assumere diversi gradi di compattezza:

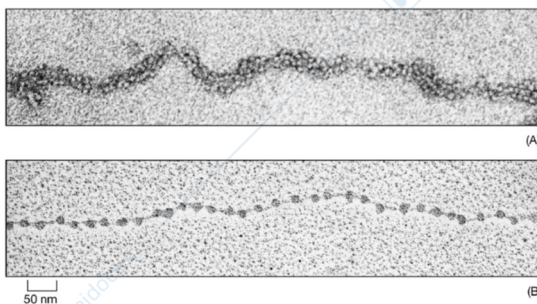
- La **euromatina**, in cui il DNA è meno compatto (regione più chiara)
- L'**eterocromatina**, in cui il DNA è più compatto (regione più scura)

Infine, il grado di compattezza maggiore lo raggiunge nel cromosoma.

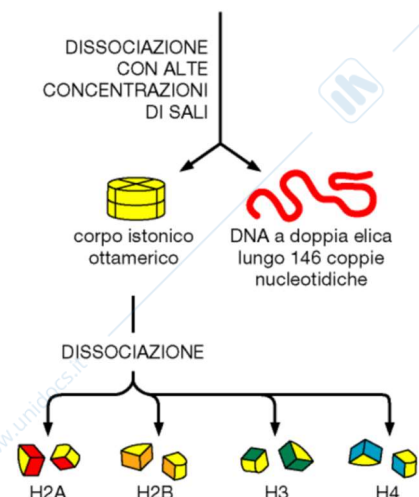
CROMATINA

La cromatina è il DNA associato a proteine istoniche o **ISTONI** (piccole proteine basiche, che tendono ad associarsi facilmente al DNA in quanto acido, e che formano la struttura intorno alla quale si avvolge il DNA) e non istoniche (proteine che formano la struttura di supporto).

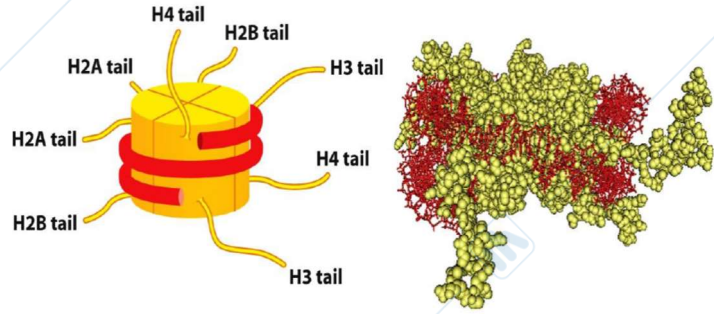
1. Si parte dalla doppia elica (46 filamenti di DNA in una cellula, ovvero 46 cromosomi)
2. Il DNA si avvolge due volte attorno agli **ISTONI**, strutture costituite da 8 proteine istoniche, andando a formare il **NUCLEOSOMA**. Il nucleosoma è una struttura definita anche a collana di perle: è quindi formato da DNA (146 coppie di nucleotidi) e da corpi istonici ottamerici (8 proteine uguali a due a due, con struttura quaternaria molto compressa ma regolare).



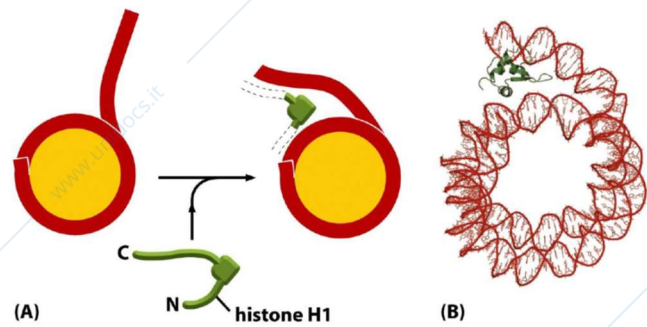
Struttura delle cromatina, isolata da un nucleo, vista al microscopio elettronico.



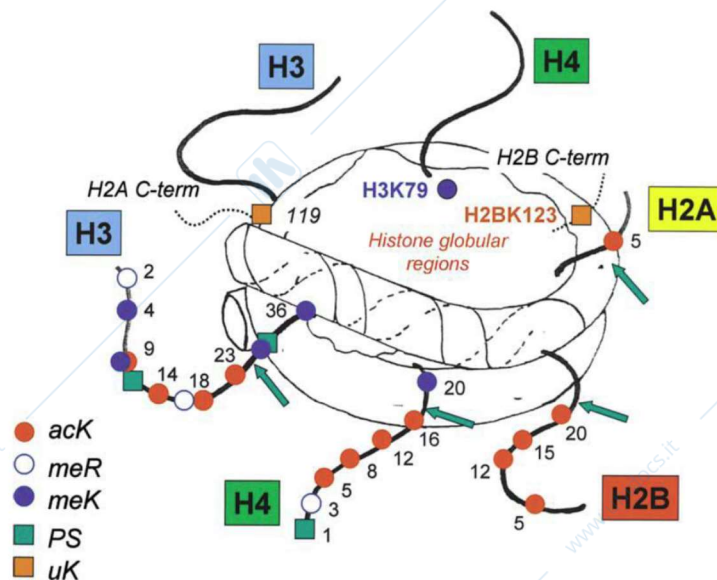
Questo otetto istonico ha una struttura particolare: ogni "spicchio" presenta delle code ammino-terminali che rimangono nella parte esterna della struttura, costituite da circa 60 amminoacidi, mentre le teste carbo-terminali si trovano nel cuore dell'istone. Queste code aiutano l'associazione e la formazione della struttura nello spazio della cromatina (e nel suo livello di compattezza).



Esiste per esempio un particolare istone denominato H1, importante nella formazione del nucleosoma, che si viene a posizionare nel punto in cui il DNA entra ed esce dal nucleosoma, e stabilizza l'interazione tra DNA e il nucleosoma stesso.



Esistono degli enzimi che sono in grado di aggiungere o rimuovere dagli amminoacidi, presenti nelle code istoniche, dei gruppi chimici particolari → Marcando con delle modificazioni chimiche queste code, possiamo definire se la regione nucleosomica presenta particolari modificazioni, determinando così se quella regione sia più o meno accessibile alla trascrizione. Può dunque risultare una regione eterocromatica o eucromatica. Le regioni eucromatiche, sono le regioni in cui la struttura della cromatina è abbastanza aperta per poter essere raggiunta dalla macchina trascrizionale ed essere trascritta; Quando invece in una cellula non servono alcune regioni dei cromosomi (che contengono particolari geni che in quel momento della vita della cellula non servono, e non devono essere quindi trascritti) quelle regioni vengono maggiormente condensate, grazie alla presenza di particolari modificazioni chimiche di queste code istoniche, e relegate nelle parti più periferiche del nucleo. Le regole per le modificazioni della struttura della cromatina sono definite come meccanismi epigenetici (epigenetica non solo studia la metilazione del DNA ma anche l'effetto funzionale di queste modifiche).



3. Questa struttura a filo di perle è capace di organizzarsi, grazie a proteine non istoniche, in una struttura ancora più complessa: viene definita come FIBRA CROMATINICA, in cui i nucleosomi si organizzano in modo regolare uno rispetto all'altro.
4. Si vengono poi a formare delle STRUTTURE AD ANSA, più o meno condensate.
5. Fino al cromosoma mitotico intero a X.

