

3 DNA → RNA → Proteina

- ✚ Il DNA è una **molecola informativa**. L'informazione è immagazzinata **nell'ordine in cui sono disposte le sue quattro basi differenti**.
- ✚ Questo ordine è trasferito alle molecole di RNA, che sono usate per dirigere l'ordine degli amminoacidi delle proteine.

3 Acidi Nucleici : Il RNA può essere catalitico

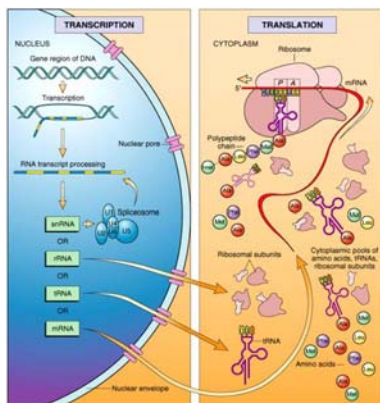
- ✚ Alcune molecole di RNA dette **ribozimi** possono fungere da catalizzatori.
- ✚ La scoperta dei ribozimi ha fornito una soluzione per la questione su chi è comparso prima quando la vita è iniziata, le proteine o gli acidi nucleici?
- ✚ Dato che il RNA può essere sia **informativo** che **catalitico**, esso potrebbe avere funzionato come catalizzatore sia per la sua stessa replicazione che per quella delle proteine.

- ⚡ Le cellule contengono istruzioni che:
 - Specificano **STRUTTURA**
 - Dettano **FUNZIONE**
 - Regolano **ATTIVITA'**
- ⚡ Le istruzioni vengono trasmesse fedelmente alle cellule figlie
- ⚡ L'informazione ereditaria è trasmessa sotto forma di unità distinte, i **GENI** costituiti da **DNA**.
- ⚡ L'informazione del DNA passa:
 - fra generazioni di cellule: **REPLICAZIONE DEL DNA**
 - all'interno di ogni cellula: **TRASCRIZIONE + TRADUZIONE**

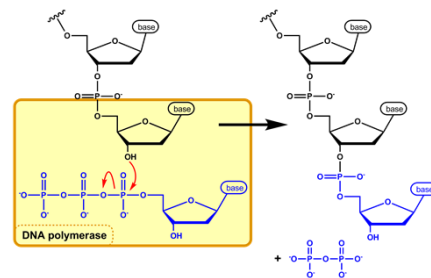
Nucleotidi (4)

- ⚡ Sia il DNA che l'RNA vengono **sintetizzati** a partire da **nucleosidi trifosfati**:
- ⚡ Per il **DNA**: dATP, dCTP, dGTP e dTTP
- ⚡ Per il **RNA**: ATP, CTP, GTP e UTP.
- ⚡ In entrambi i casi, dal momento in cui ogni nucleoside viene legato alla catena in crescita, **il secondo e il terzo gruppi fosfato vengono rimossi** (idrolizzati).

Trascrizione & Traduzione



- ⚡ I **5'-trifosfati** sono i precursori per la sintesi degli acidi nucleici.



- ⚡ L'estremità 5' di un nucleotide trifosfato reagisce con il gruppo 3'-OH che si trova alla fine della catena polinucleotidica in crescita.
- ⚡ Si forma un **legame fra il fosfato α con il gruppo 3'-OH dello zucchero all'estremità della catena** e i due gruppi fosfato terminali (β e γ) del trifosfato sono rilasciati (sotto forma di una singola molecola detta **pirofosfato**).

DNA (1)

- In una molecola di DNA, migliaia a milioni di nucleotidi si susseguono in una catena mediante **collegamento del gruppo fosfato collegato al carbonio 5' di una molecola di desossiribosio e al carbonio 3' di una seconda molecola di desossiribosio** (in questo processo viene rilasciata una molecola di acqua).
- Poichè i nucleotidi sono collegati da legami fra le loro componenti zucchero e fosfato, si dice che **il DNA ha una impalcatura («backbone») di zucchero-fosfato**.
- Il **legame** (covalente) si chiama **fosfodiesterico**

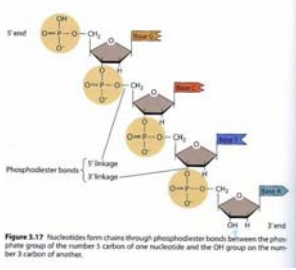
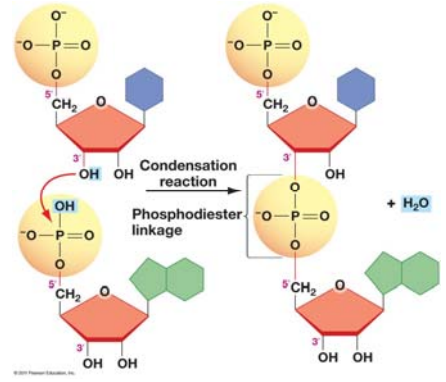


Figure 3.17 Nucleotides form chains through phosphodiester bonds between the phosphate group of the number 5 carbon of one nucleotide and the OH group on the number 3 carbon of another.

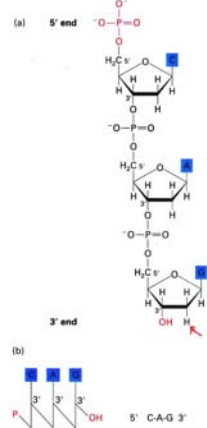
Kreuzer & Massey, Biology and Biotechnology



Condensation reaction
Phosphodiester linkage
+ H₂O

<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectures/dna.htm>

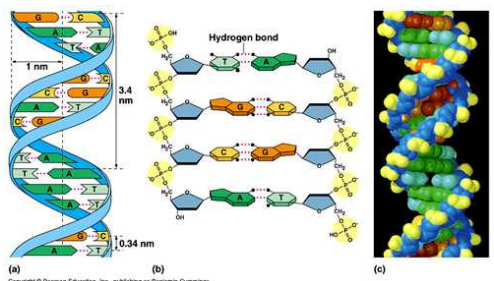
DNA



(a) 5' end
3' end
C-A-G 3'

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21514/figure/A8077/report=objectonly>

DNA




(a) 1 nm
(b) 3.4 nm
0.34 nm
Hydrogen bond

<http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4/v/page/molecular%20biology/dna-structure.html>


Acidi nucleici

LA SCOPERTA DELLA STRUTTURA DEL DNA


The Race for the Double Helix




Francis Crick & James Watson



Linus Pauling





Maurice Wilkins



Rosalind Franklin


Regole di Chargaff






A

=




T



G

=



C

Purines
Pyrimidines

DNA Base Composition: A = T G = C

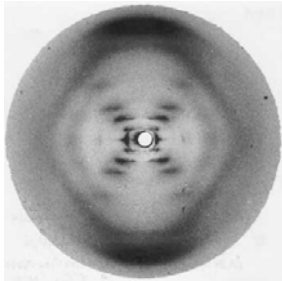
Regole di Chargaff

TABLE 5.1 Base compositions experimentally determined for a variety of organisms

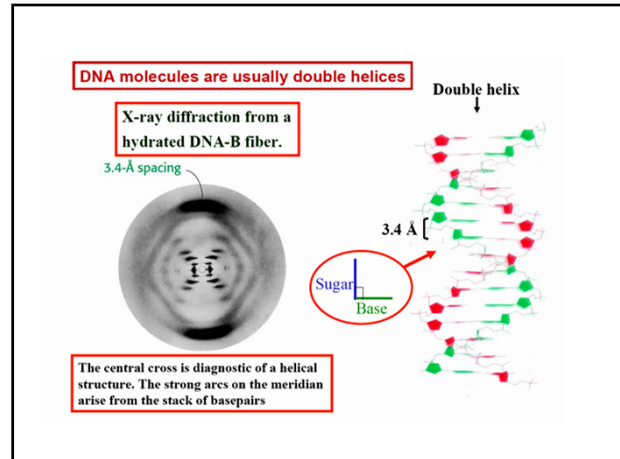
Species	<u>A:T = 1</u>	<u>G:C = 1</u>	<u>A:G</u>	<u>% GC</u>
Human being	1.00	1.00	1.56	Low ↓ High
Salmon	1.02	1.02	1.43	
Wheat	1.00	0.97	1.22	
Yeast	1.03	1.02	1.67	
<i>Escherichia coli</i>	1.09	0.99	1.05	
<i>Serratia marcescens</i>	0.95	0.86	0.70	

A = T

G = C



La fotografia di diffrazione (di raggi X) della forma B del DNA fatta da **Rosalind Franklin** nel Maggio del 1952 é stata di lungo la migliore fotografia di questo tipo. Dati ricavati da questa foto furono decisivi per permettere a James Watson e Francis Crick di costruire il modello del DNA che ha fatto vincere ad essi il premio Nobel. (Norman Collection on the History of Molecular Biology in Novato, Calif.)



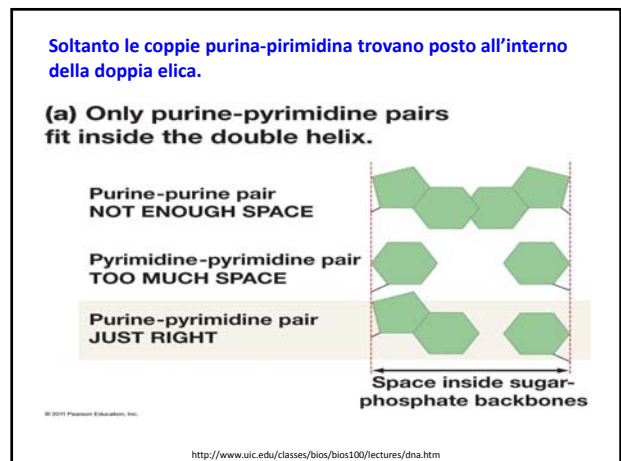
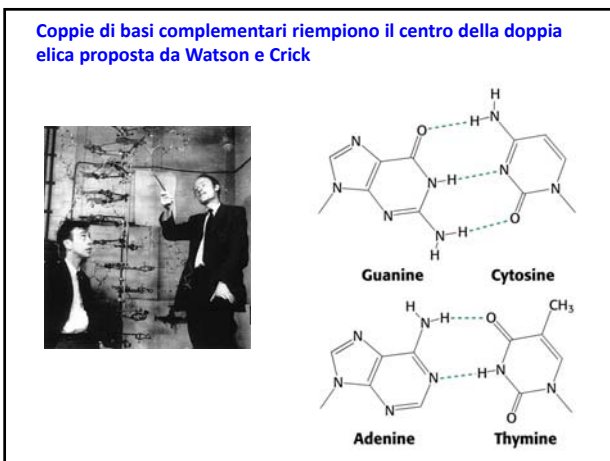
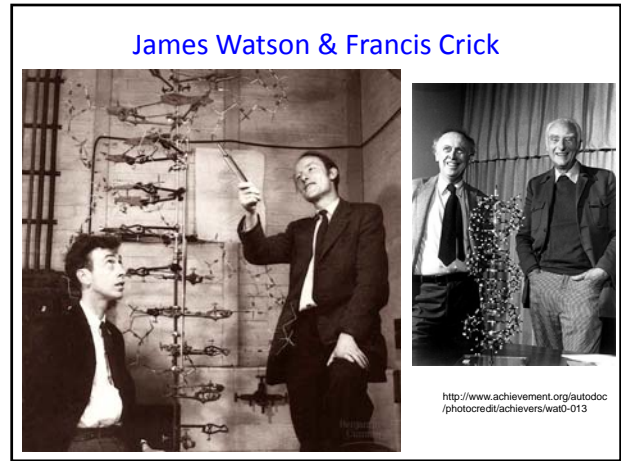
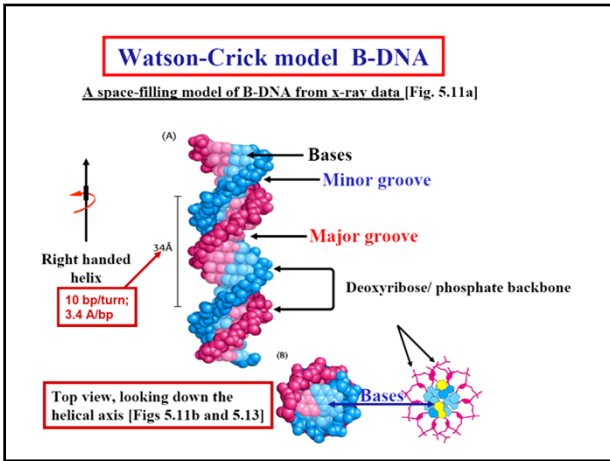
Dati ottenuti da Rosalind Franklin e coll. (1)

- ⚡ I quadri di diffrazione dei raggi X attraverso un cristallo di DNA indicavano una **molecola elicoidale**.
- ⚡ I quadri fornivano la **larghezza dell'elica** e la **spaziatura fra le basi azotate** lungo di essa.
- ⚡ La elica è costituita da due filamenti (contrariamente al modello proposto da Linus Pauling di tre filamenti, simili alla molecola di collagene).
- ⚡ Lavori non pubblicati da Franklin ma letti da Watson & Crick: **le impalcature di di zucchero-fosfato erano rivolte verso l'esterno della molecola di DNA** (contrariamente a quanto da loro postulato).

Campbell, Biology.

Dati ottenuti da Rosalind Franklin e coll. (2)

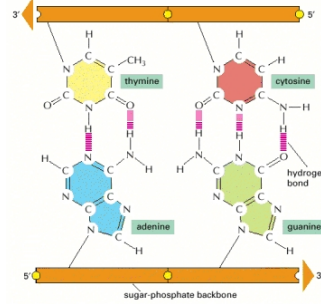
- ⚡ La disposizione suggerita dalla Franklin era stimolante in quanto poneva le **basi azotate reattivamente idrofobiche all'interno della molecola**, allontanandole dalla soluzione acquosa circostante.
- ⚡ Inoltre, i gruppi carichi negativamente dei fosfati non erano costretti a stare vicino all'interno.



Conclusioni di Watson & Crick sulla struttura del DNA (1953)

• Tratte dai dati cristallografici di Rosalind Franklin e Maurice Wilkins

- Due catene polinucleotidiche elicoidali si avvolgono attorno ad un asse centrale con un diametro di 20 angstroms (10^{-10} m).
- Le due catene sono antiparallele (scorrono in direzioni opposte).
- Le impalcature di zucchero-fosfato rimangono all'esterno della struttura.
- Le basi azotate sono perpendicolari all'asse dell'elica e separate da 3.4 angstroms.
- La struttura elicoidale si ripete ogni 34 angstroms, e quindi ci sono 10 basi per giro dell'elica.

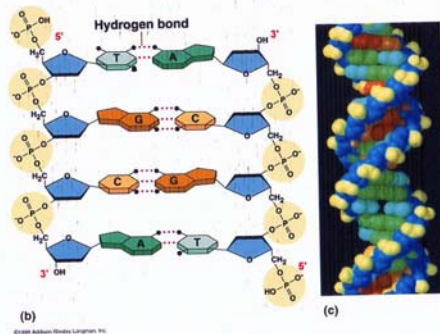


Coppie di basi complementari nella doppia elica del DNA

La forma e la struttura chimica delle basi permettono che si formino legami di idrogeno efficacemente soltanto fra A e T e fra G e C, dove gli atomi in grado di formare legami di idrogeno possono essere portati sufficientemente vicini senza distorcere la doppia elica. Come indicato, **fra A e T si formano due ponti di idrogeno** mentre **fra G e C se ne formano tre**. Le basi si possono appaiare in questo modo soltanto se le catene polinucleotidiche che le contengono sono antiparallele una all'altra.

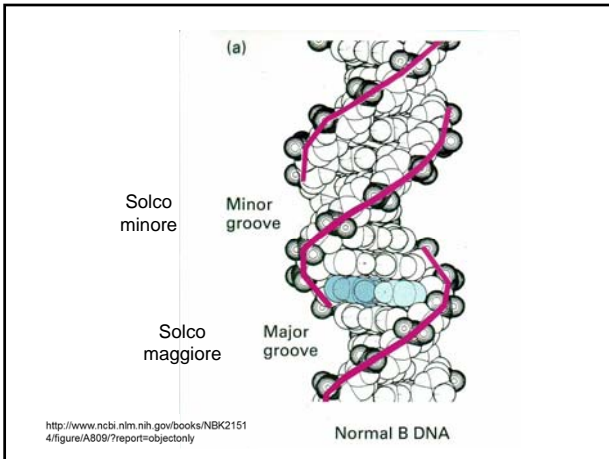
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26821/figure/A599/>

LEGAMI DI IDROGENO NEL DNA



Solco minore

Solco maggiore



- ✚ I solchi maggiore e minore si trovano in posizioni opposte uno rispetto all'altro e ciascuno scorre in modo continuo lungo la molecola di DNA.
- ✚ Derivano dalla disposizione antiparallela dei due filamenti.
- ✚ Sono importanti per il collegamento di "DNA Binding Proteins" coinvolte nella replicazione e trascrizione.

http://www.mun.ca/biology/scarr/MGA2_02-07.html

FIGURE 1. Getting into the groove

From the following article:
Structural biology: DNA binding shapes up
 Tom Tullius
Nature **461**, 1225-1226 (29 October 2009)

Seminario

http://www.nature.com/nature/journal/v461/n7268/fig_tab/461225a_f1.html

STRUCTURAL BIOLOGY

DNA binding shapes up

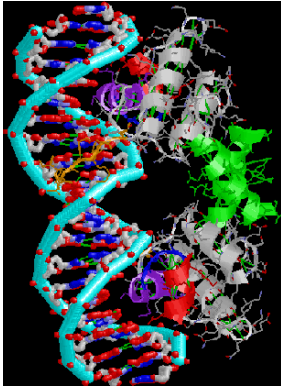
Tom Tullius

DNA-binding proteins have the daunting task of finding their binding sites among the 3 billion base pairs of the human genome. The shape of DNA, and not just its sequence, may offer proteins much-needed direction.

Le proteine che si legano al DNA hanno il compito estremamente impegnativo di trovare i loro siti di legame fra 3 miliardi di coppie di basi del genoma umano. La morfologia del DNA e non soltanto la sua sequenza possono offrire a queste proteine molte delle informazioni necessarie.

Seminario

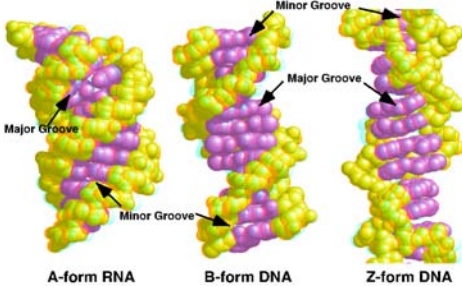
Seminario



Esempio di legame di fattore di trascrizione con DNA

http://www.biochem.umd.edu/biochem/kahn/teach_res/prtn_DNA_tut/

3 tipi di struttura del DNA, dipendenti dal grado di idratazione e concentrazione salina (1)



A-form RNA B-form DNA Z-form DNA

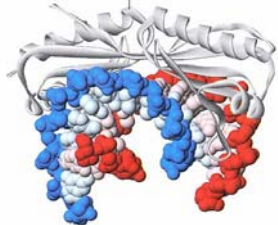
<http://www.tulane.edu/~biochem/nolan/lectures/ma/DNAstruc2001.htm>

Seminario

- ✦ Importanti **modificazioni nella struttura** della forma standard B del DNA risultano da **legame di proteine con sequenze specifiche di DNA**.
- ✦ Nonostante l'elevato numero di legami di idrogeno e idrofobici fra le basi fornisca stabilità al DNA, **la doppia elica è flessibile lungo il suo asse longitudinale**.
- ✦ Al contrario dell' α -elica delle proteine, non esistono legami di idrogeno paralleli all'asse dell'elica del DNA.
- ✦ Questa caratteristica permette al DNA di piegarsi quando complessato con una proteina legante il DNA.
- ✦ Il ripiegamento del DNA è di fondamentale importanza per l'impacchettamento stretto del DNA nella **chromatina**, il complesso DNA-proteina in cui si trova il DNA nucleare degli eucarioti.

Lodish, 7^a ed.

TATA box-binding protein

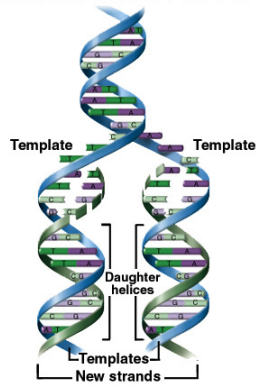


Le interazioni proteiche possono piegare il DNA. Il dominio C-terminale conservato della «TATA-box binding protein» (TBP) si lega al solco minore di una sequenza specifica di DNA ricca in A e T, svolgendo e fortemente ripiegando la doppia elica. La trascrizione della maggior parte dei geni eucariotici richiede la partecipazione di TBP.

Lodish, 7^a ed.

DNA replication: an overview

1. Original double helix
2. Strands separate
3. Complementary bases align opposite templates
4. Enzymes link sugar-phosphate elements of aligned nucleotides into a continuous new strand



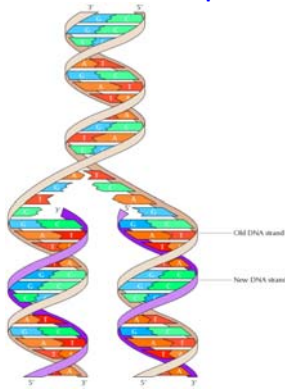
... una modesta proposta...

It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material."

-Watson & Crick, "A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid," *Nature* 1953.

"Non è sfuggito alla nostra attenzione che l'appaiamento specifico che abbiamo postulato suggerisce immediatamente un possibile meccanismo di copiatura per il materiale genetico"

Replicazione semiconservativa del DNA.



I due filamenti parentali del DNA si separano e ognuno serve come stampo per la sintesi di un nuovo filamento "figlio" mediante accoppiamento di basi complementari.

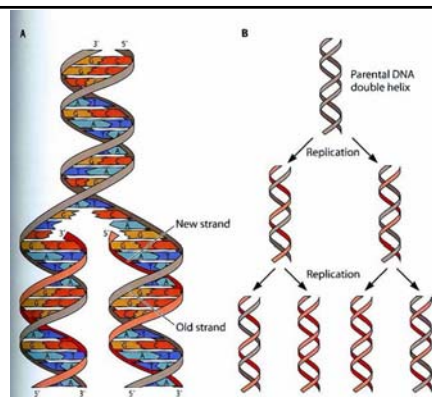


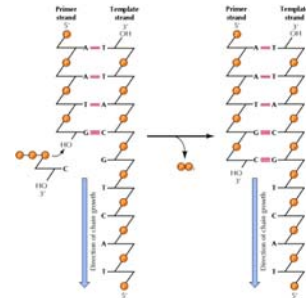
Figure 3.20 DNA replication. (A) An existing strand of DNA is unzipped, and the exposed bases on each strand serve as a pattern, or template, to guide the synthesis of a new strand. (B) DNA replication results in two identical daughter molecules, each with one new and one old strand of nucleotides.

Seminario

Argomento Corso Genetica
Seminario

REPLICAZIONE DEL DNA

Reazione catalizzata dalle DNA polimerasi



Tutte le **DNA polimerasi** aggiungono un desossiribonucleotide 5'-trifosfato al gruppo 3'-idrossilico (-OH) di una catena in crescita del DNA (filamento guida).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9940/figure/A775/?report=objectonly>

Seminario

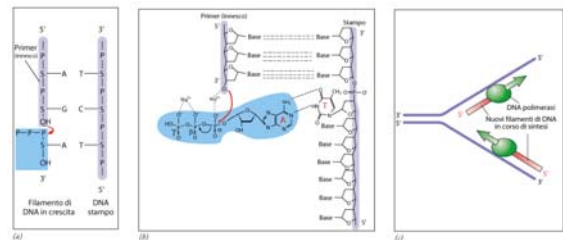
DNA polimerasi

- ⚡ Tutti le DNA polimerasi note condividono due proprietà fondamentali che hanno implicazioni critiche per la replicazione del DNA:
 - ⚡ Tutte le polimerasi **sintetizzano il DNA soltanto nella direzione 5' a 3'**, aggiungendo un dNTP al gruppo idrossilico della catena in crescita.
 - ⚡ Le DNA polimerasi **possono aggiungere un nuovo desossiribonucleotide soltanto ad un "primer" (innesco) preformato che è legato mediante ponti di idrogeno al filamento stampo**; **non** sono in grado di iniziare la sintesi del DNA *de novo* catalizzando la polimerizzazione di dNTPs liberi.
 - Da questo punto di vista, **le DNA polimerasi differiscono dalle RNA polimerasi**, che possono iniziare la sintesi di un nuovo filamento di RNA in assenza di un primer.

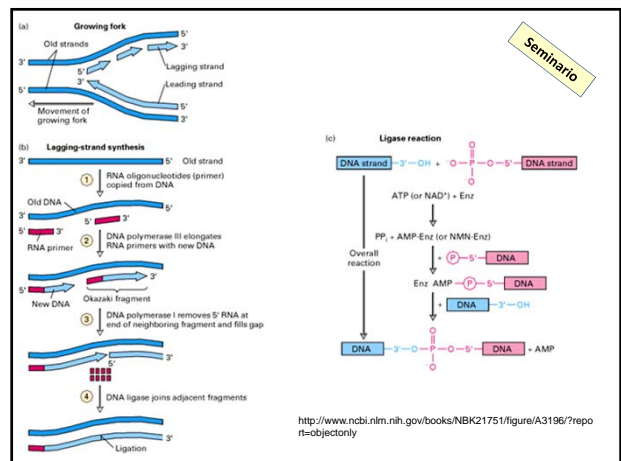
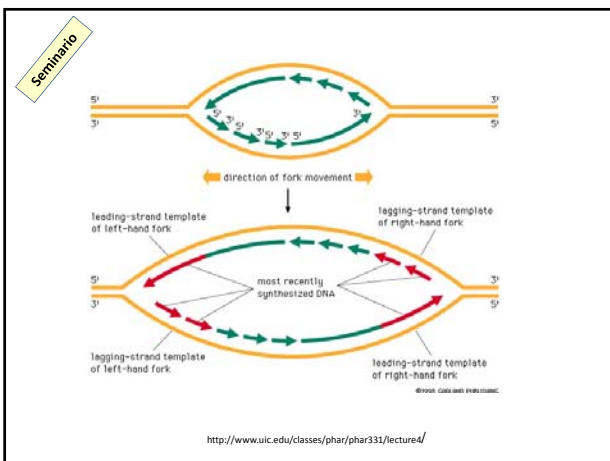
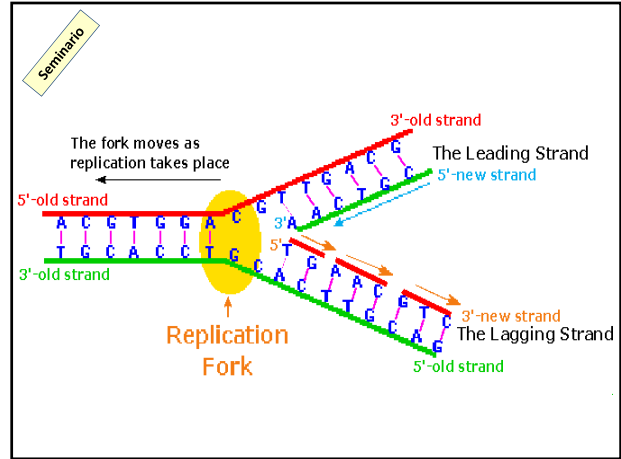
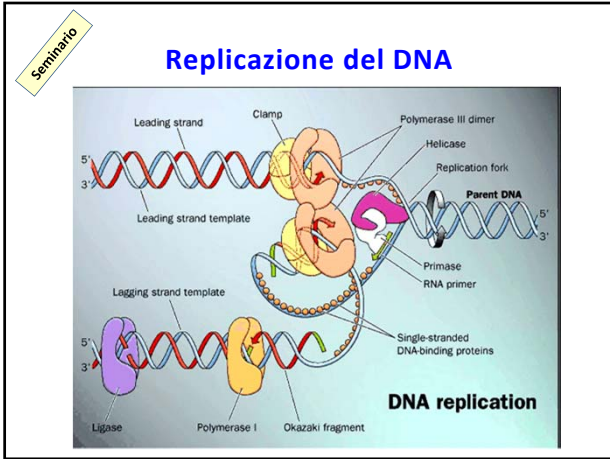
Seminario

DNA polimerasi

- ⚡ Enzimi responsabili della costruzione di nuovi filamenti di DNA durante la replicazione e il riparo del DNA.



a., Polimerizzazione di un nucleotide all'estremità 3' di un filamento primer. L'enzima seleziona i nucleotidi in base alla loro abilità di appai con i nucleotidi presenti sul filamento stampo.



Seminario

Ad ogni forcella di replicazione, uno dei due filamenti è sintetizzato mediante più inneschi.

(a) La struttura completa della forcella di replicazione: La sintesi del **filamento guida**, catalizzata dalla **DNA polimerasi III**, si attua per aggiunta sequenziale di deossiribonucleotidi nella stessa direzione di spostamento della forcella di replicazione.

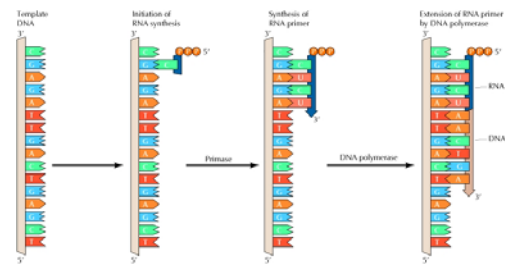
(b) Passaggi della sintesi discontinua del **filamento tardivo**: Questo processo richiede **numerosi inneschi**, **due DNA polimerasi** e una **ligasi**, che unisce l'estremità 3' idrossile di un frammento (**frammento di Okazaki**) con l'estremità 5'-fosfato del frammento adiacente.

(c) Giunzione fra i frammenti di DNA: Durante questa reazione, la ligasi si lega momentaneamente ed in modo covalente all'estremità 5'-fosfato di un filamento di DNA, attivandone così il gruppo fosfato. La DNA ligasi di *E. coli* usa come cofattore il NAD^+ , generando NMN e AMP, mentre la ligasi del batteriofago T4, normalmente usata nel clonaggio del DNA, usa ATP, generando PPi e AMP.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21751/figure/A3196/?report=objectonly>

Seminario

Iniziazione dei frammenti di Okazaki mediante inneschi ("primers") a RNA

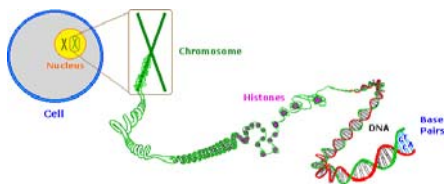


Piccoli frammenti di RNA servono da inneschi che possono essere estesi dalla DNA polimerasi.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9940/figure/A779/?report=objectonly>

Seminario

Replicazione del DNA (a)



Il DNA di una cellula è strettamente impacchettato formando cromosomi. In primo luogo, il DNA si avvolge attorno a piccole proteine chiamate istoni (rosa). Queste strutture a forma di perline sono ulteriormente organizzate e ripiegate in aggregati di cromatina che costituiscono i cromosomi. In questo modo si ottiene un'efficienza complessiva di impacchettamento di circa 7,000 volte o di più. Chiaramente, una sequenza di eventi che portano allo spiegamento deve avere luogo prima che il DNA possa essere trascritto o replicato.

<http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/nuacids.htm>

Seminario

Replicazione del DNA (b)

Una volta che il DNA a doppi filamento è esposto, entra in azione un gruppo di enzimi che procede alla sua replicazione:

- **TOPOISOMERASI**: inizia lo svolgimento della doppia elica tagliando uno dei filamenti.
- **ELICASI**: collabora allo svolgimento. Ricordare che molti legami di idrogeno debbono essere rotti se i filamenti si devono separare.
- **SSB**: una "single-strand binding-protein" (proteina che si lega al filamento singolo) stabilizza i filamenti separate ed impedisce ad essi di ricombinarsi, in modo che la polimerizzazione possa funzionare sui filamenti singoli.
- **DNA POLIMERASI**: famiglia di enzimi che collega monomeri di nucleotidi trifosfato mentre si legano mediante ponti di idrogeno alle basi complementari. Questi enzimi inoltre cercano degli eventuali errori (circa dieci per bilione) e fanno le correzioni.
- **LIGASI**: unisce piccoli segmenti scollegati di DNA su un filamento unico.