

The background features a large, faded circular logo on the left side. The logo contains a red cross with four smaller red crosses at its ends, and the text "ORDINE NAZIONALE" is visible around the perimeter. To the right, the text "Ordine Nazionale Biologi" is also visible in a light blue, semi-transparent font.

GIORNATE DI ORIENTAMENTO PROFESSIONALE

Prof. Marina Piscopo

Dipartimento di Biologia (stanza 2F17(studio)-
2F21(laboratorio))

3 piano-Dipartimento di Biologia

marina.piscopo@unina.it

081-679081 (studio) 081-679094 (laboratorio)

BIOLOGIA MOLECOLARE E LABORATORIO

DIFFERENZE TRA PROCARIOTI ED EUCARIOTI

ORGANIZZAZIONE DEL GENOMA PROCARIOTICO ED EUCARIOTICO

DUPLICAZIONE DEL DNA

DIFFERENZE TRA PROCARIOTI ED EUCARIOTI

Ordine
Nazio
Biológ

MAZIONALE

- Ogni cellula presente sulla Terra può appartenere a due grandi categorie:

- **CELLULE PROCARIOTE**
(archea, batteri)

- **CELLULE EUCARIOTE**
(protisti unicellulari, organismi pluricellulari)

- **Procariota** : pro (primitivo)+ carion (nucleo)

- **Eucariota**: eu (evoluto) + carion (nucleo)



Le cellule possono essere divise in due classi principali, in base alla presenza o meno del nucleo

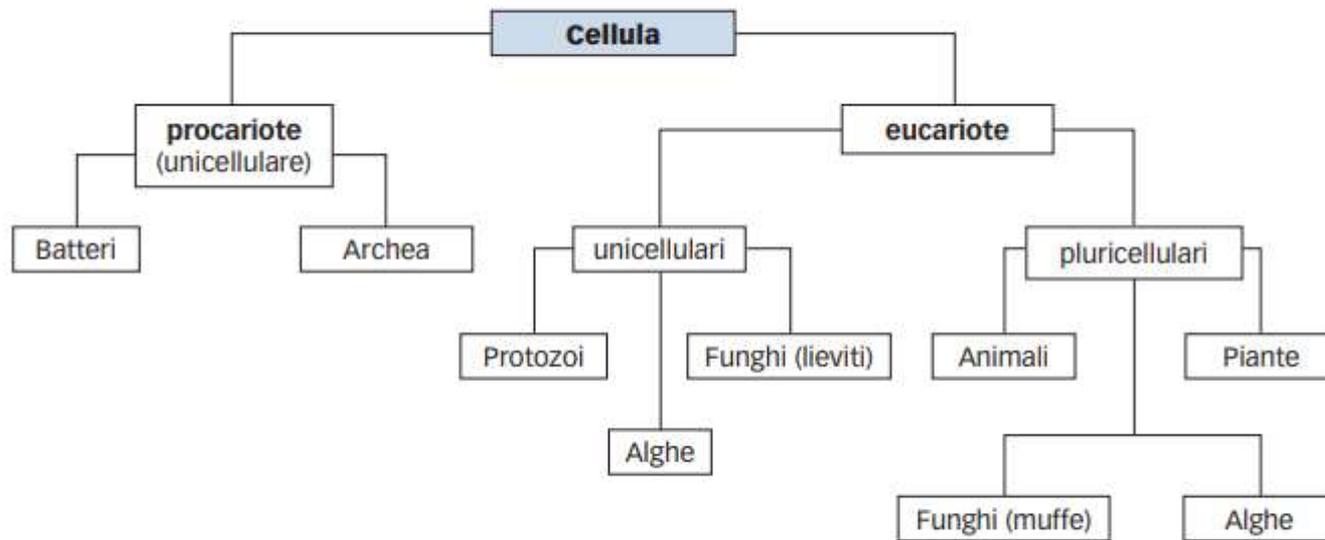
Le CELLULE PROCARIOTICHE

mancano di un involucro nucleare ed il loro materiale genetico (compattato nel nucleotide) è immerso nel citoplasma

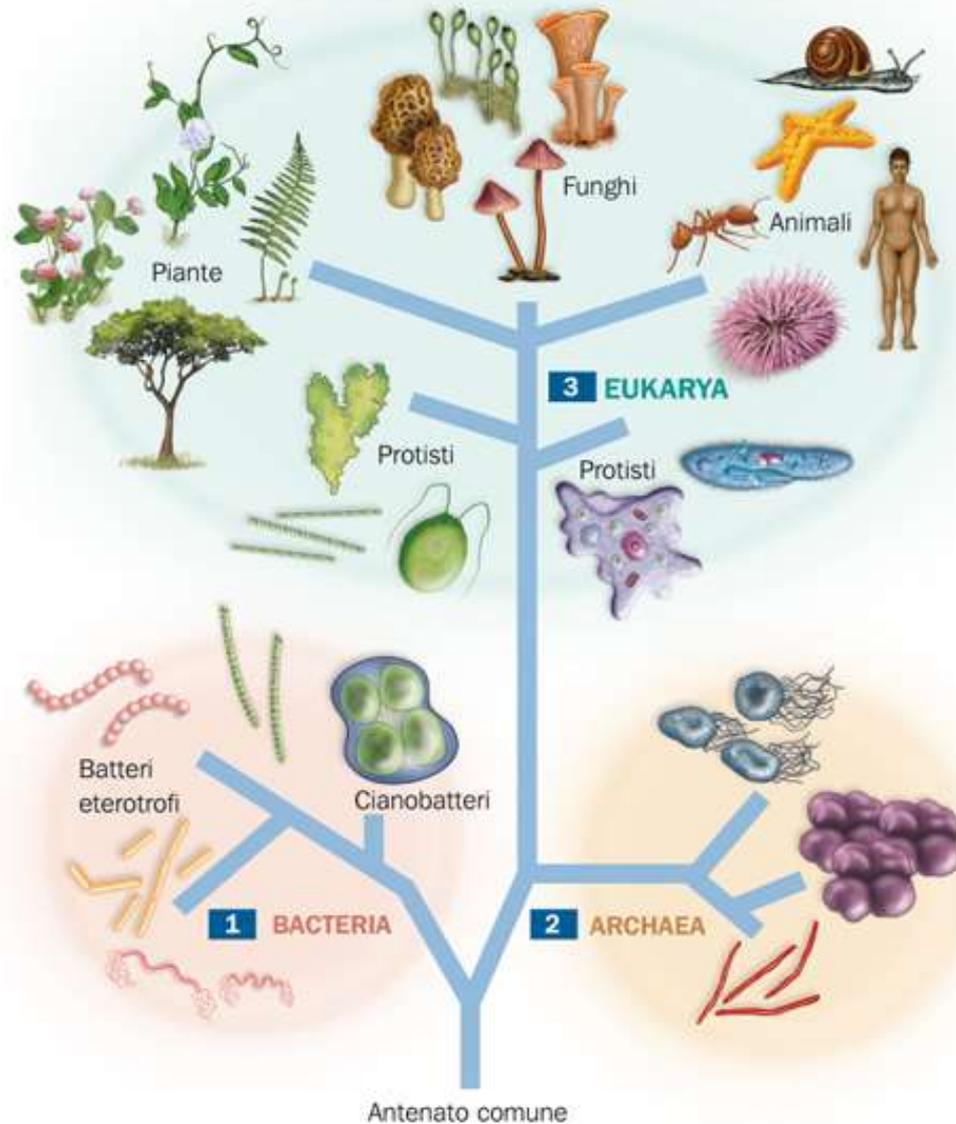
Le CELLULE EUCARIOTICHE

possiedono invece un nucleo che racchiude il materiale genetico all'interno

Nell'ambito della biologia cellulare si possono distinguere due tipi di organismi di base: le cellule procariote e le cellule eucariote



Gli Archea, per quanto procarioti, presentano molte caratteristiche diverse dai Batteri, soprattutto nella struttura della parete, priva di peptidoglicani, e della membrana cellulare. Si caratterizzano per la loro capacità di colonizzare ambienti estremi, quali quelli con elevate concentrazioni saline o con temperature molto alte.



- Il dominio *Bacteria* – i batteri rappresentano un gruppo di procarioti assai diversificato e abbondante. Essi si trovano praticamente ovunque sulla Terra;

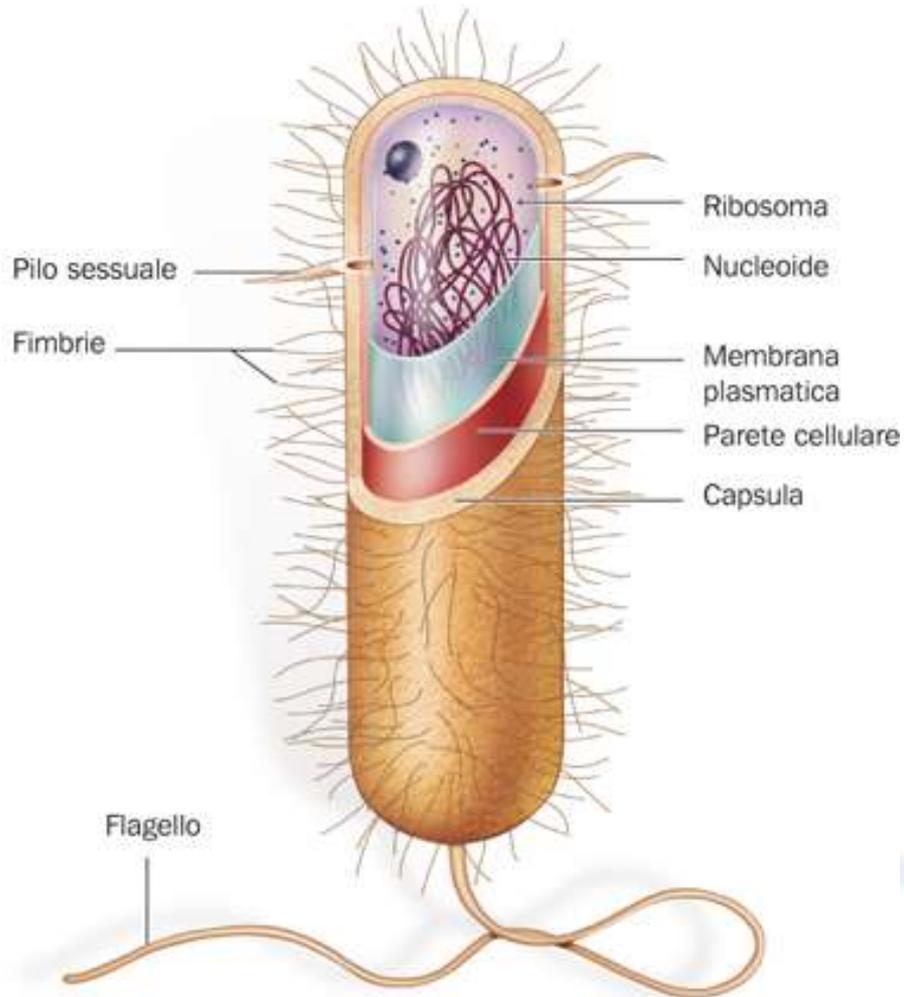
- il dominio *Archaea* – anche gli archei sono procarioti, ma dal punto di vista biochimico sono più affini agli eucarioti che ai batteri. Essi vivono in ambienti estremi;

- il dominio *Eukarya* – gli eucarioti comprendono sia forme unicellulari sia organismi pluricellulari, tutte con cellule dotate di un nucleo racchiuso da una membrana.

I PROCARIOTI

- I **procarioti** sono organismi unicellulari e si dividono in **archebatteri** (batteri antichi) ed **eubatteri** (batteri). I procarioti sono gli organismi che hanno avuto il maggiore successo sulla Terra, se il successo si misura dal numero di individui; infatti, i membri dei due domini procarioti si sono diffusi in tutti gli habitat immaginabili del pianeta, dai più freddi ai più caldi, dai più acidi ai più alcalini, ai più salati.

Le cellule procariotiche sono comparse per prime

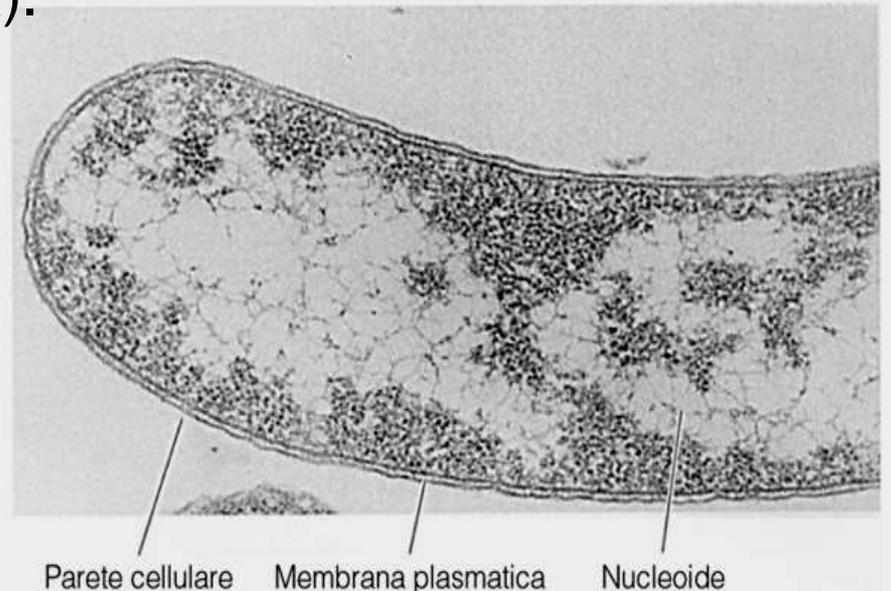
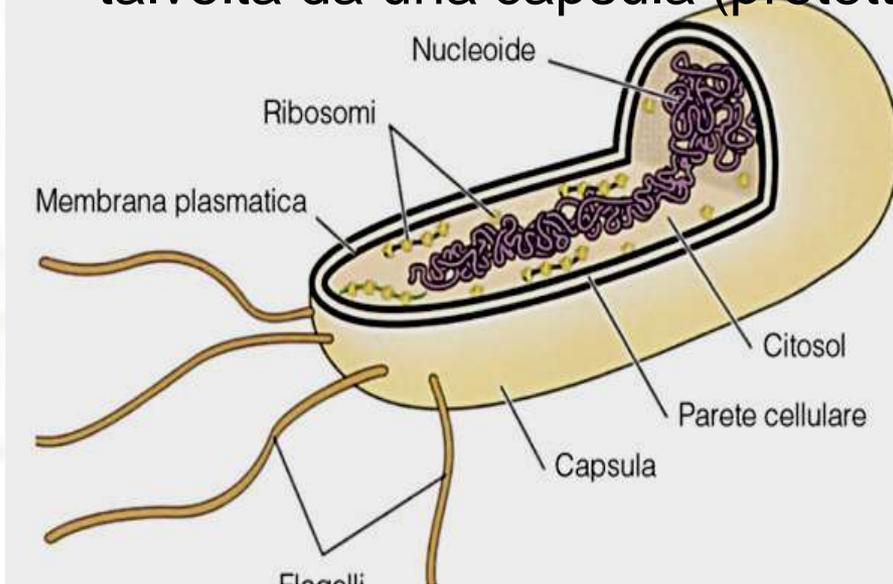


Le cellule procariotiche sono prive di un nucleo

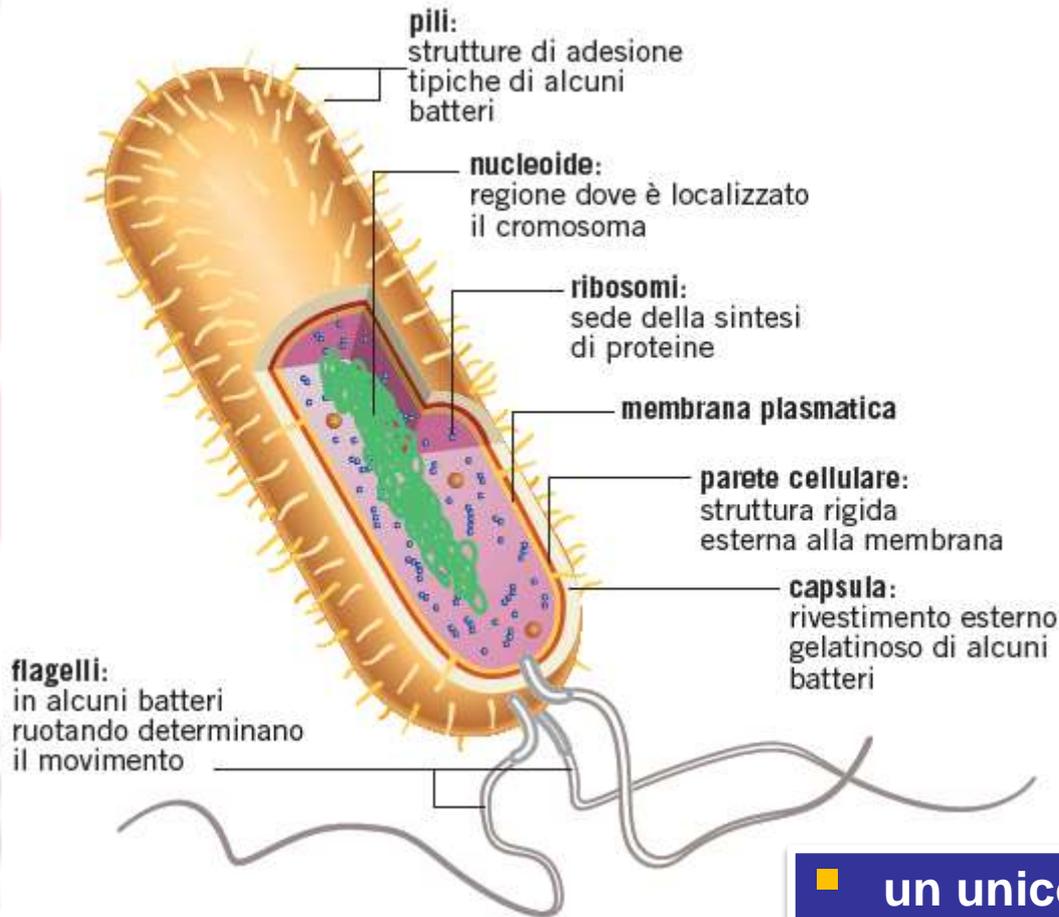
Le cellule procariotiche sono tipiche solo dei batteri ed archeobatteri

Cellula procariote

- I procarioti si identificano con i batteri, gli organismi più semplici e anche i più diffusi sulla Terra.
- Cellule più primitive, semplici, sono prive di nucleo e di organuli
- Le dimensioni sono ridotte ($1 \div 10 \mu\text{m}$)
- La membrana cellulare è circondata da una parete cellulare, talvolta da una capsula (protettiva).



Schema della struttura interna di una cellula procariote



■ un unico cromosoma circolare

Le cellule procariotiche hanno una struttura semplice

LE QUATTRO STRUTTURE FONDAMENTALI DEI PROCARIOTI

MEMBRANA PLASMATICA

Racchiude le componenti fondamentali della cellula: il DNA, i ribosomi e il citoplasma.

CITOPLASMA

Fluido viscoso all'interno della cellula.

RIBOSOMI

DNA

Uno o più filamenti circolari contenenti l'informazione genetica.

STRUTTURE AGGIUNTIVE

PARETE CELLULARE

Protegge la cellula e le conferisce una forma caratteristica (usata per la classificazione dei batteri). Solo i micoplasmi ne sono privi.

CAPSULA

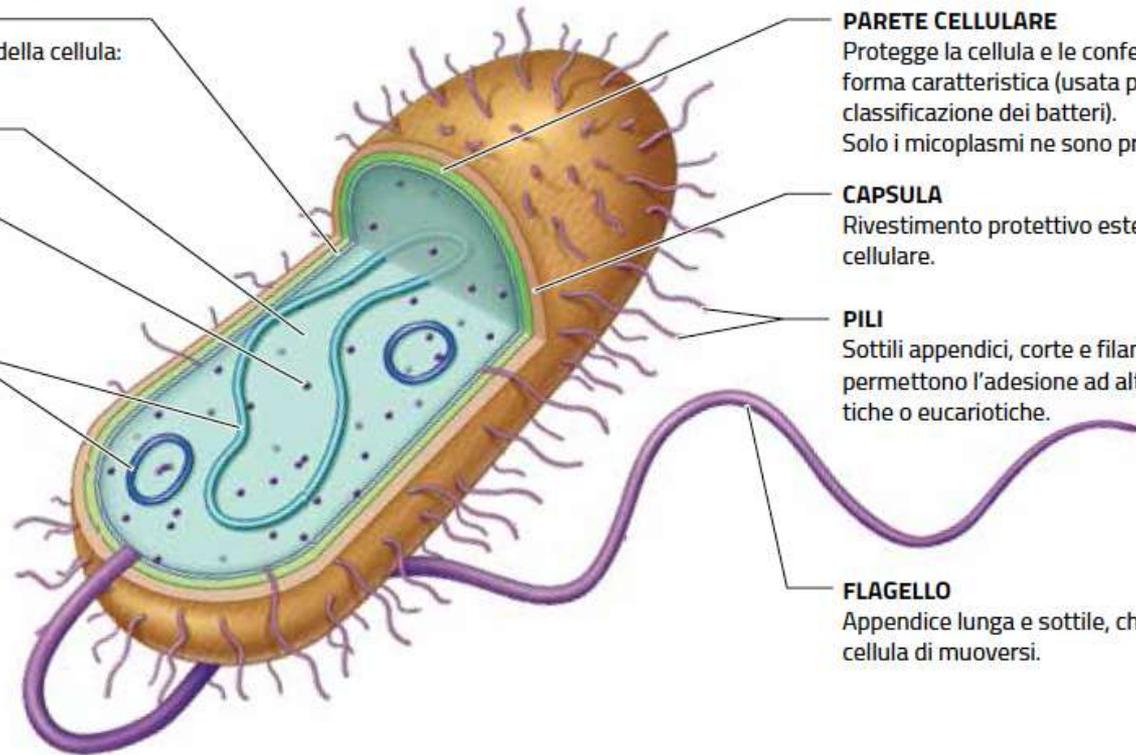
Rivestimento protettivo esterno alla parete cellulare.

PILI

Sottili appendici, corte e filamentose, che permettono l'adesione ad altre cellule procariotiche o eucariotiche.

FLAGELLO

Appendice lunga e sottile, che consente alla cellula di muoversi.



La cellula procariotica

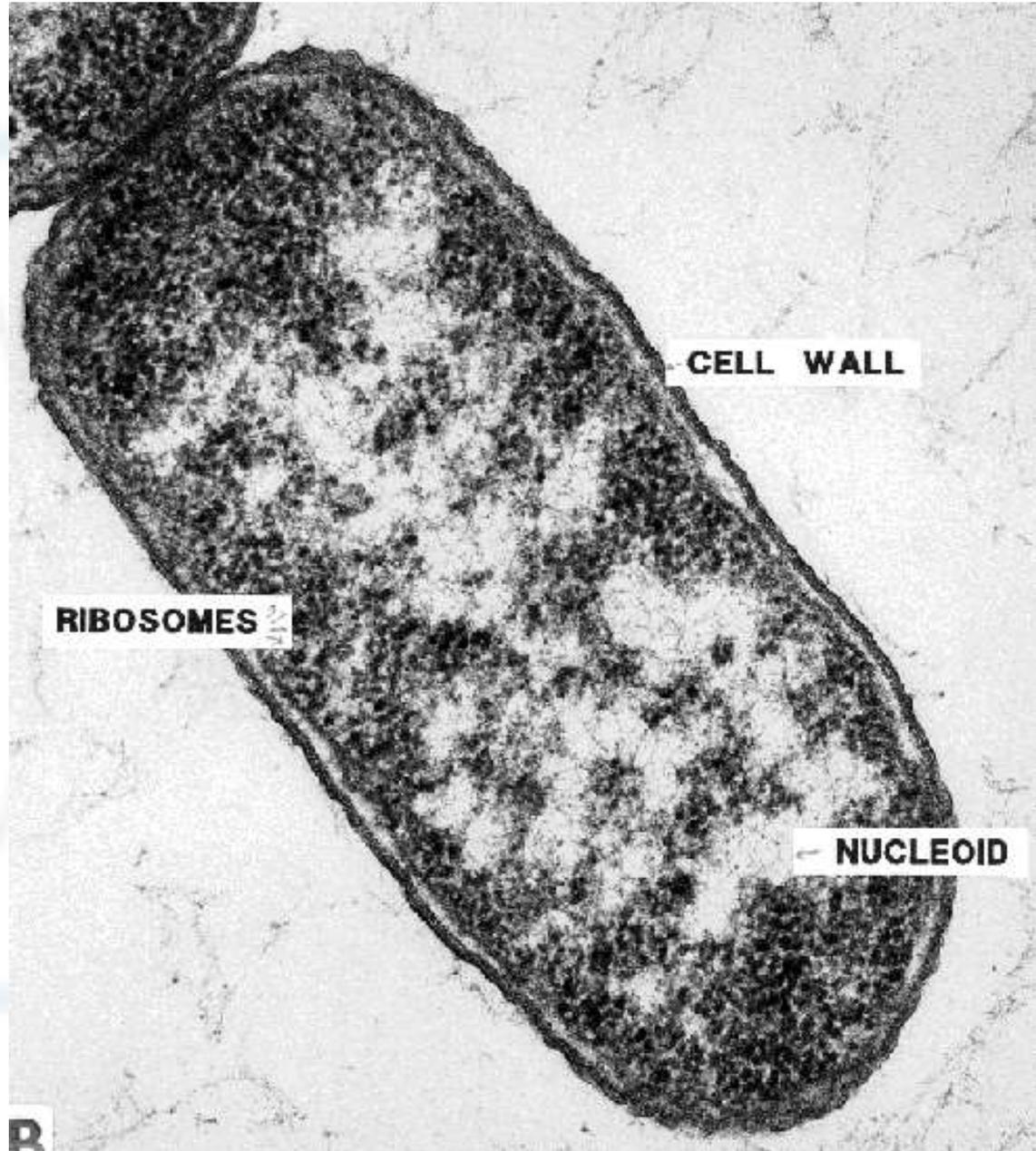
Le cellule procariotiche rappresentano il tipo cellulare più semplice e primitivo, tipico dei batteri.

- Il materiale genetico è rappresentato da una molecola di DNA CIRCOLARE, sebbene non sia presente una membrana nucleare, il DNA che si localizza in una zona detta NUCLEOIDE.

- Non ci sono organelli nel citoplasma, che pertanto rappresenta un unico compartimento.

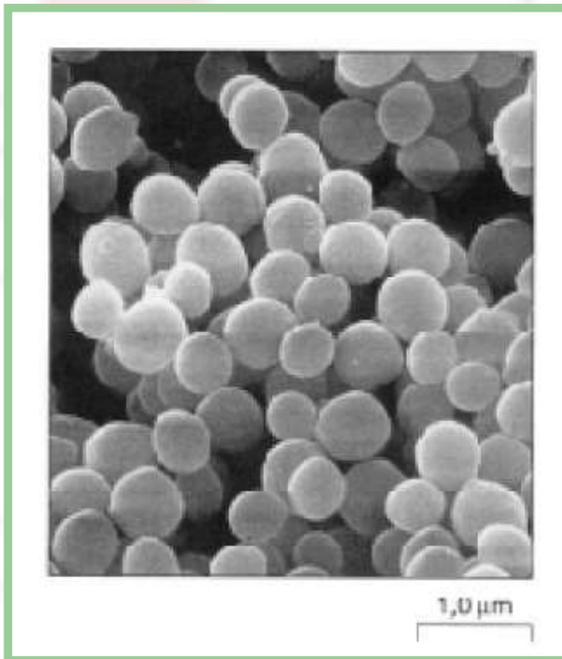
- La membrana cellulare è rivestita spesso da una struttura di protezione detta PARETE, costituita da zuccheri e proteine. Sulla superficie batterica possono emergere strutture proteiche per l'adesione (i PILI) o per la locomozione (i FLAGELLI)

All'interno del
citoplasma
non ci sono
organuli ma
solo piccoli
ribosomi che
servono per la
sintesi delle
proteine

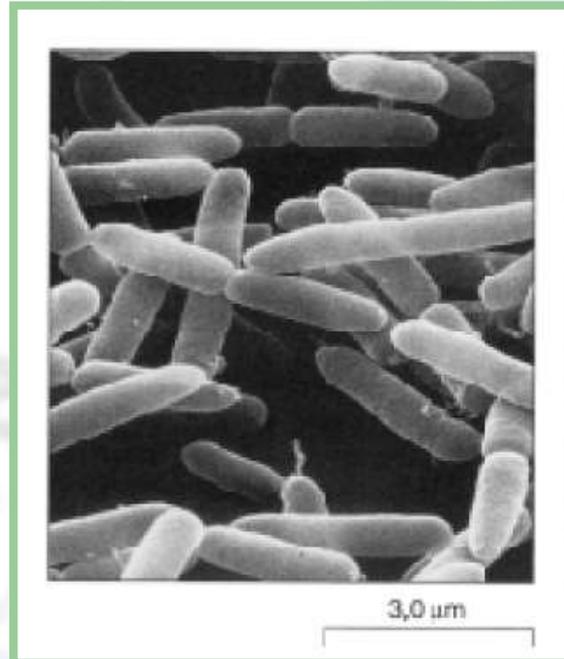


Alcune forme di batteri

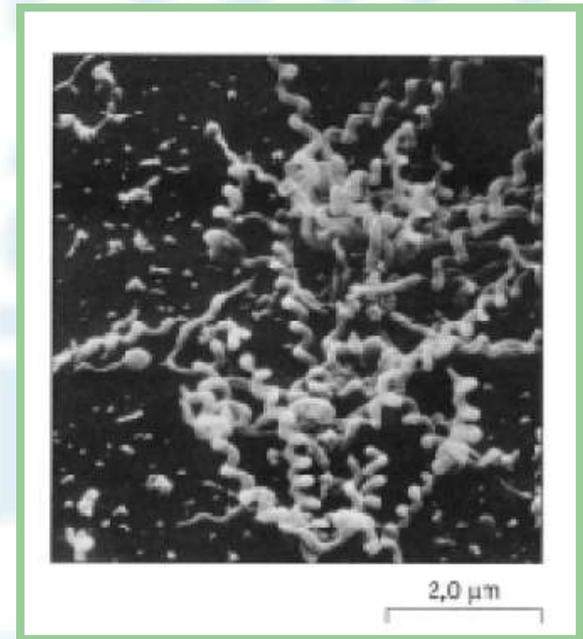
Alcuni vivono dove l'ossigeno è abbondante, altri dove è assente. Essi assumono forme diverse: sferica (cocco), a bastoncino (bacillo) e a spirale. Si formano in seguito a scissione binaria, quando da una cellula si originano due cellule che rimangono unite.



Cocchi
(sferica)



Bacilli
(a bastoncino)



Spirilli
(a spirale)

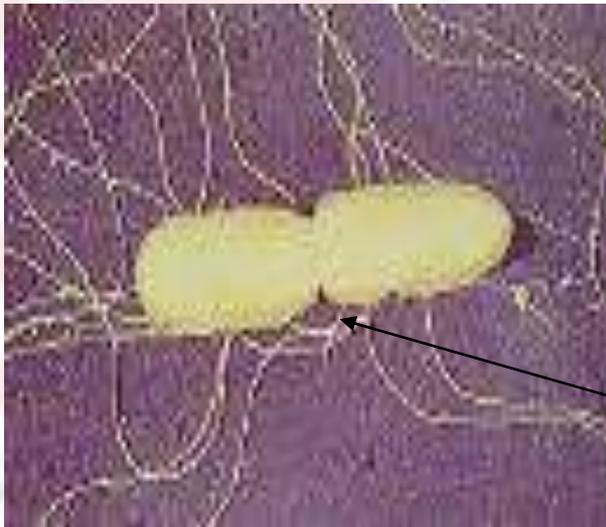
RIPRODUZIONE

I batteri si riproducono asexualmente mediante il processo di scissione binaria

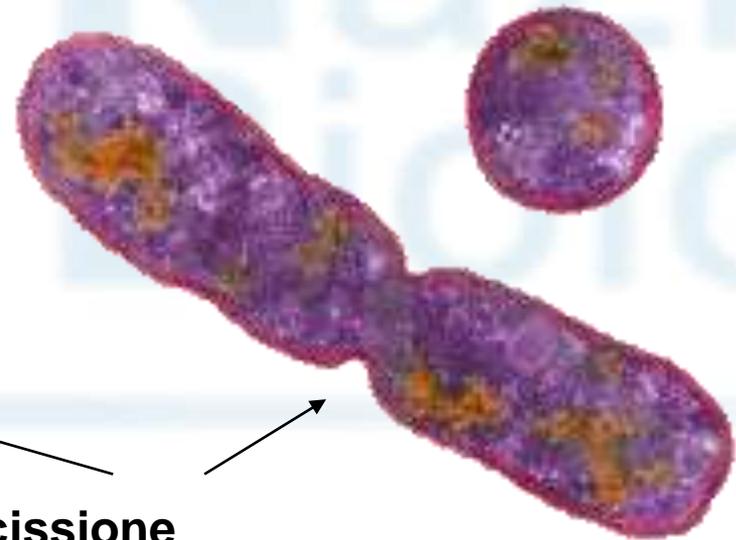
- Questa avviene mediante crescita verso l'interno della membrana cellulare formando una membrana trasversale che divide il citoplasma in due parti uguali**
- Due strati di parete cellulare continui con la parete esterna sono poi sintetizzati tra i due strati di membrana**

MOLTIPLICAZIONE BATTERICA

Le cellule batteriche si moltiplicano per **SCISSIONE binaria**: il materiale genetico si duplica e si distribuisce ai due poli della cellula batterica, la quale si allunga e alla fine si divide in due cellule figlie identiche alla cellula madre.



Salmonella

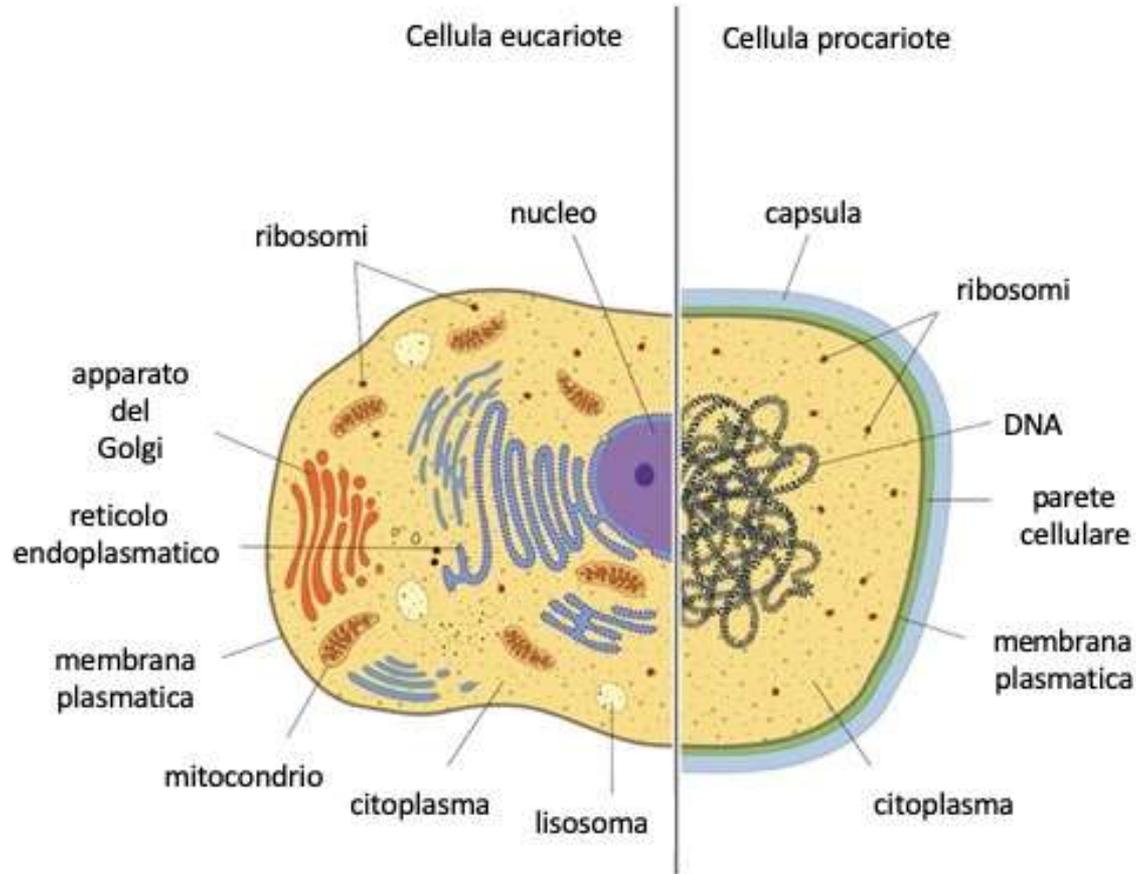


**Scissione
binaria**

Cosa hanno in comune procarioti ed eucarioti?

- Sebbene differenti, i due tipi di cellule hanno molto in comune e contengono molti degli stessi componenti:
- **Membrana plasmatica:** tutte le cellule possiedono una barriera di permeabilità che separa l'interno della cellula, costituito dal citoplasma, dall'ambiente esterno;
- **Citoplasma:** miscela acquosa di macromolecole come proteine, lipidi, acidi nucleici e polisaccaridi;
- **Ribosomi:** organelli coinvolti nella sintesi delle proteine. Sebbene i ribosomi delle cellule eucariote siano più grandi, più complessi e legati da una membrana, in entrambi i tipi di cellule sono composti da due subunità: una più grande e una più piccola (chiamate 60S e 40S negli eucarioti e 50S e 30S nei procarioti);
- **Parete cellulare:** posizionata all'esterno della membrana cellulare, costituisce uno strato molto più forte di quest'ultima conferendo resistenza strutturale alla cellula. La parete si trova in tutte le cellule delle piante e in molti microrganismi, mentre è raro trovarla nelle cellule animali.

Differenze tra procarioti ed eucarioti



In che cosa differiscono procarioti ed eucarioti?

- **Nucleo/DNA**

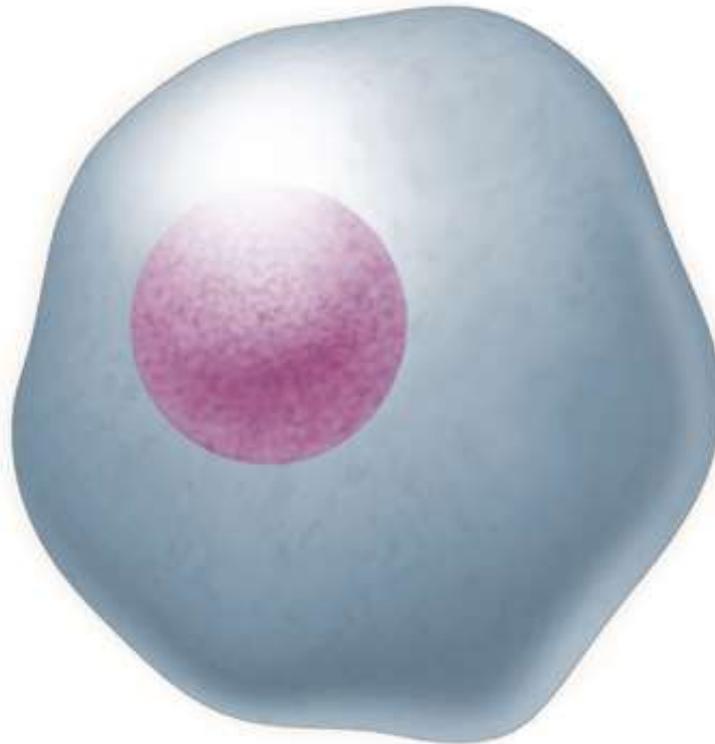
- Le differenze tra procarioti ed eucarioti sono molteplici, ma la più importante riguarda il nucleo. Gli eucarioti possiedono un **nucleo delimitato da una doppia membrana** interrotta da pori che permettono sia il passaggio di ioni e macromolecole, sia l'interazione fra il nucleo e il citoplasma. La parte più attiva del nucleo, nella quale si trovano grandi quantità di enzimi e acidi nucleici, necessari a “leggere” il codice genetico, è chiamata **nucleolo**.

Le cellule procariote, invece, non hanno un nucleo ma una regione chiamata **nucleoide**.

- Negli eucarioti, il DNA è organizzato in **coppie di cromosomi**, mentre il DNA che forma il nucleoide nei procarioti è presente in **singola copia e circolare**. Inoltre, molti procarioti contengono oltre al DNA genomico anche DNA circolari, chiamati plasmidi.
- Infine, il genoma dell'organismo procariote per eccellenza, *Escherichia coli*, contiene 4288 geni; un numero 7 volte inferiore al numero di geni contenuti in una cellula eucariota umana.

Le cellule eucariotiche contengono organuli specializzati

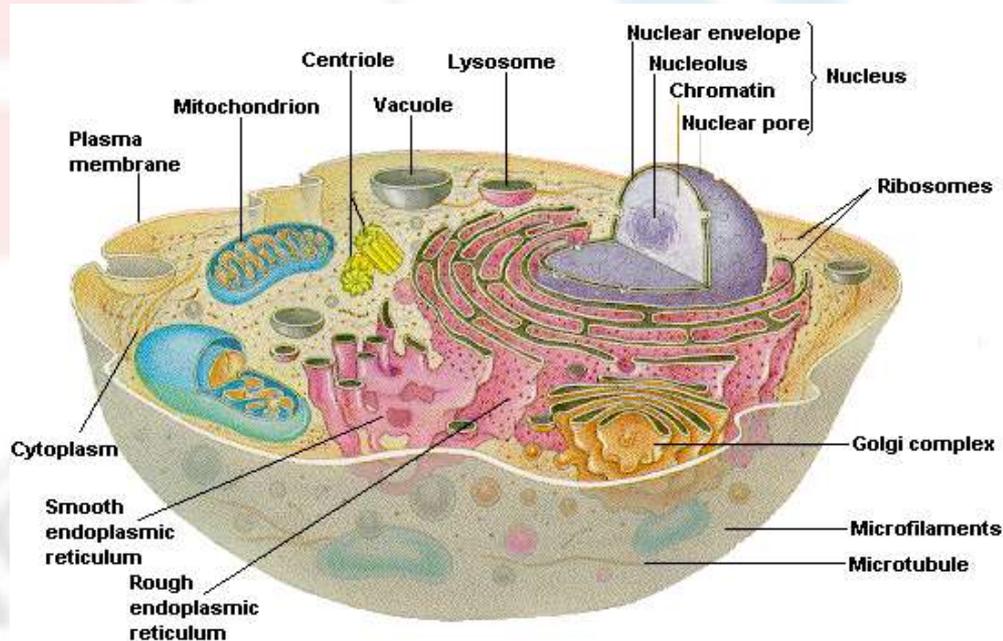
Le cellule eucariotiche hanno un nucleo delimitato da una membrana ben distinta, che racchiude il DNA.



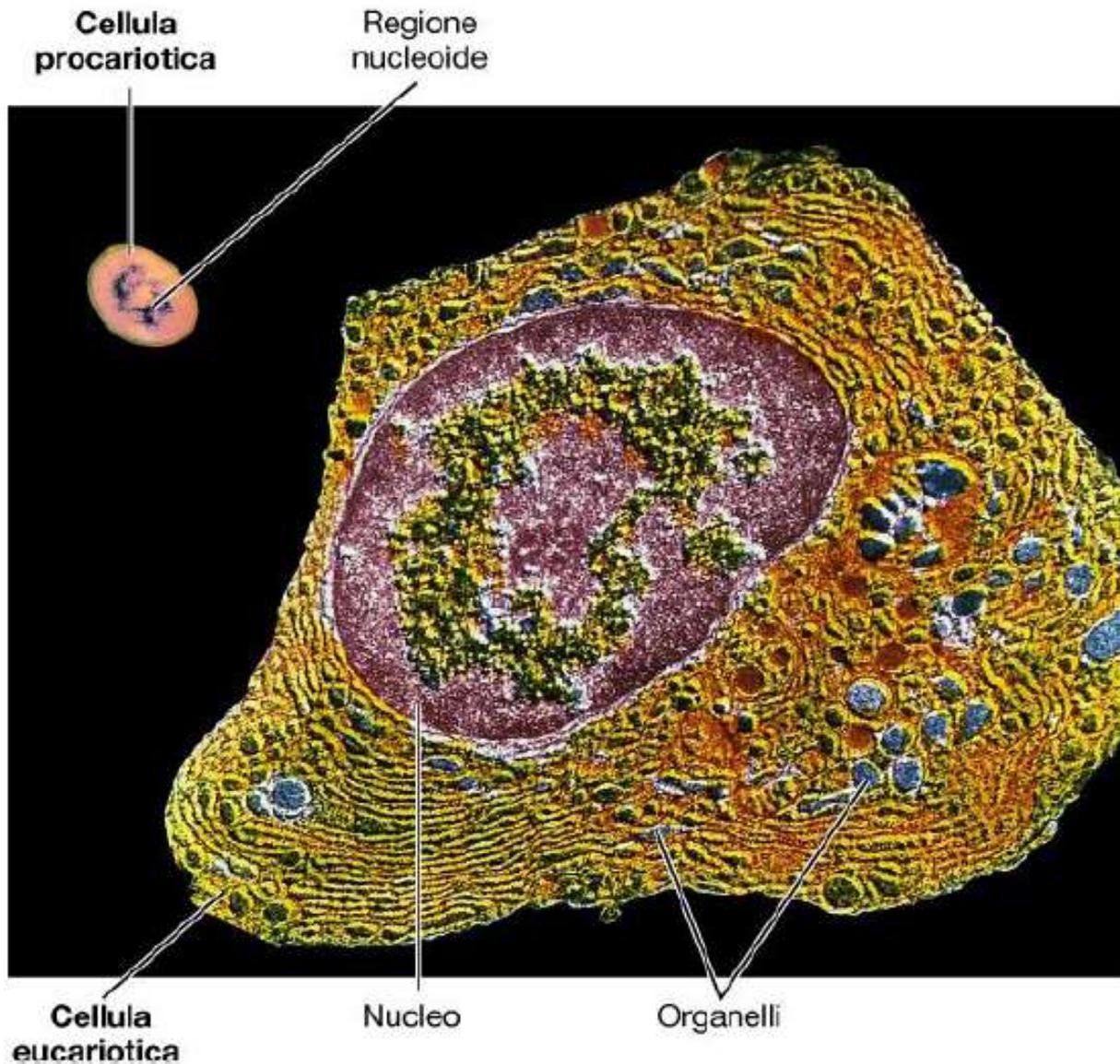
Gli organismi eucariotici, ossia protisti, funghi, piante e animali, fanno tutti parte del dominio degli eucarioti

La compartimentazione

- La cellula eucariote ha una struttura interna molto più complessa: l'interno è più “compartimentato”: ciascun compartimento costituisce un organulo, specializzato per svolgere una funzione specifica.
- Le cellule eucariote sono specializzate internamente e su ciò si basa la loro capacità di specializzarsi anche come cellule.

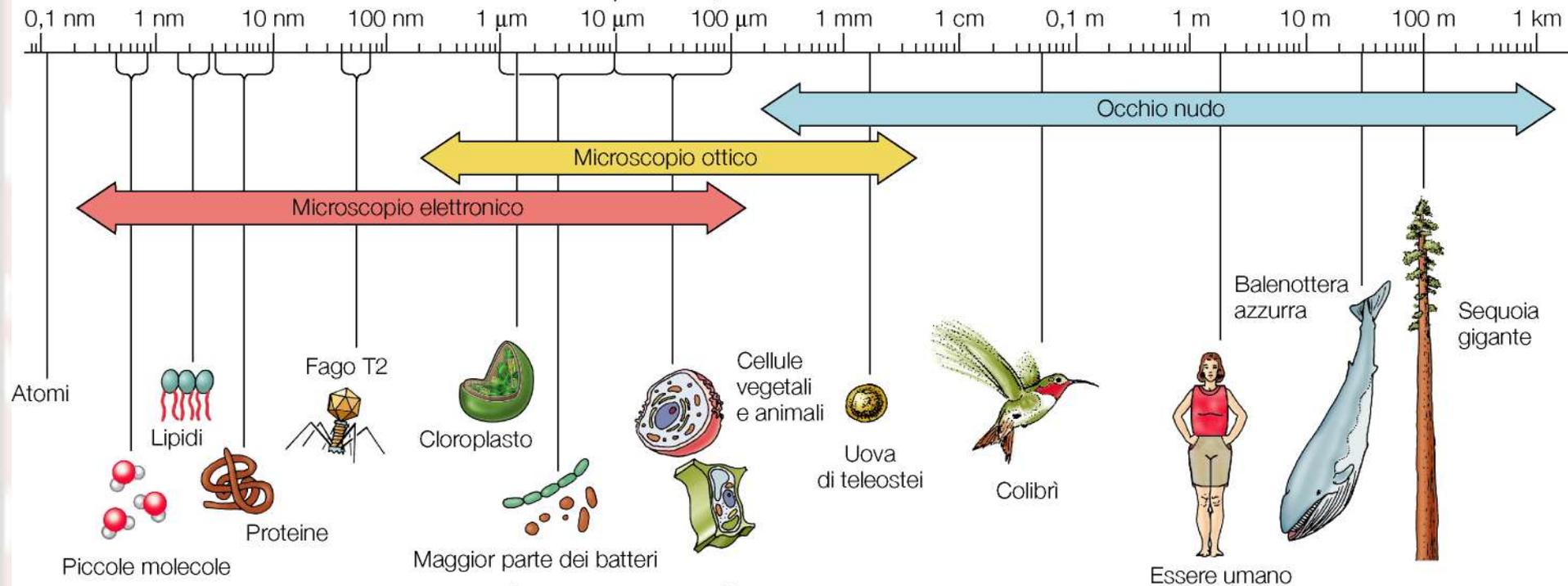


Le cellule procariotiche sono molto *più piccole* di quelle eucariotiche e hanno una struttura di base *più semplice*.



LE DIMENSIONI DELLE STRUTTURE DEI VIVENTI

Questa scala è logaritmica; ogni unità è dieci volte maggiore della precedente.

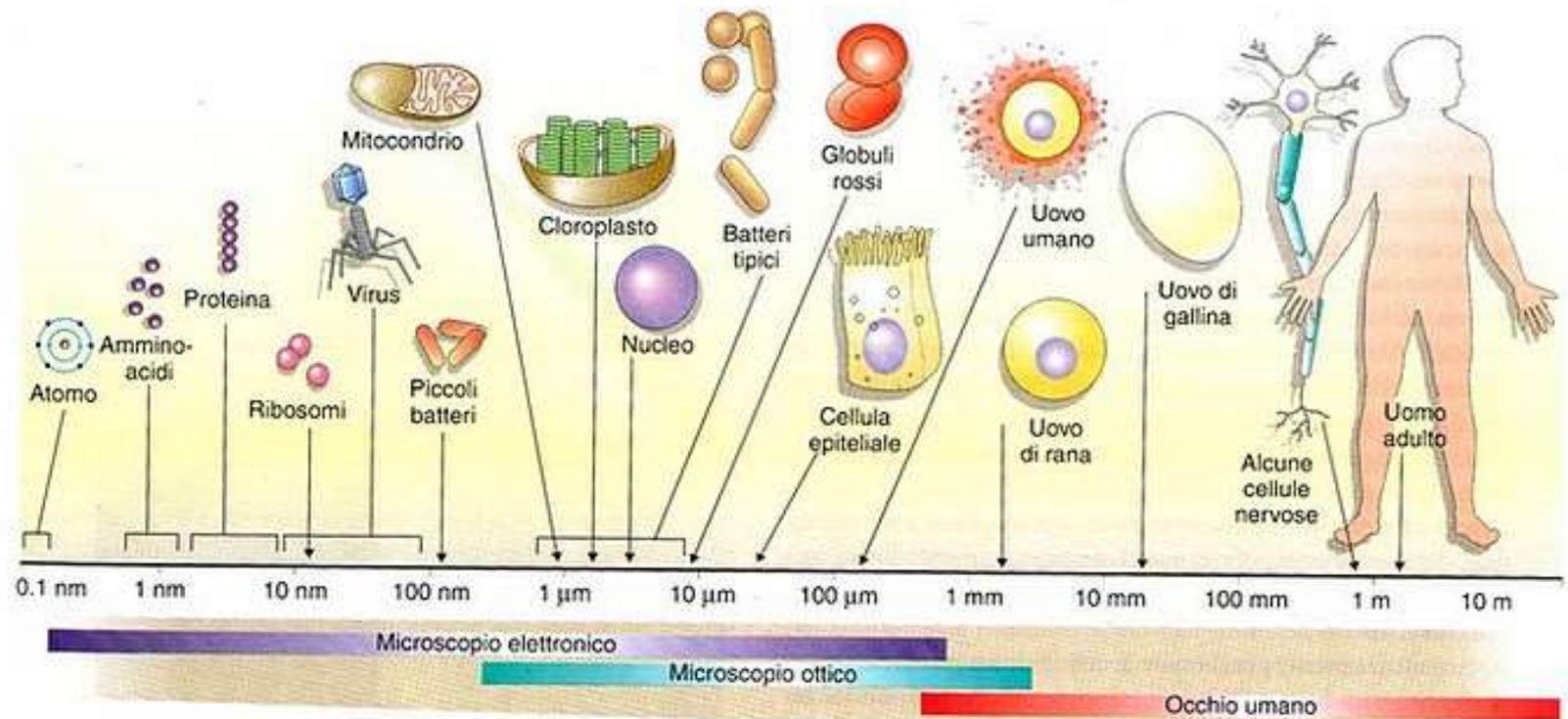


1 millimetro = 10^{-3} metri

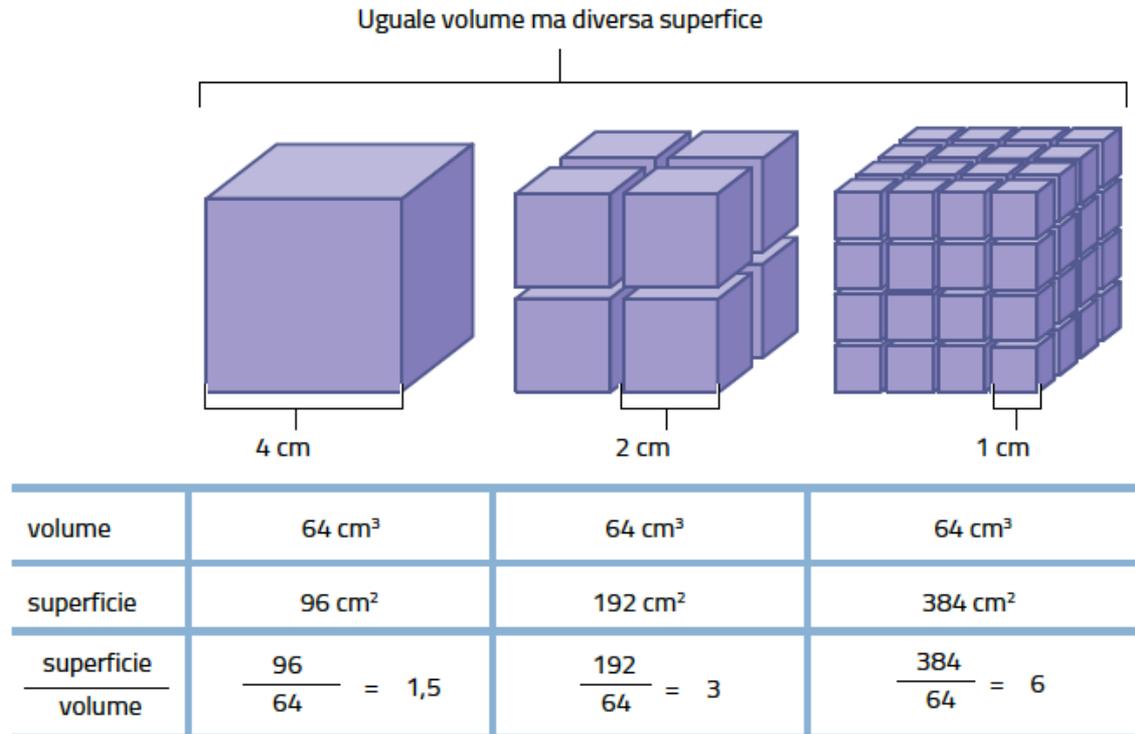
1 micrometro = 10^{-6} metri

1 nanometro = 10^{-9} metri

DIMENSIONI BIOLOGICHE E DIVERSITA' DELLE CELLULE

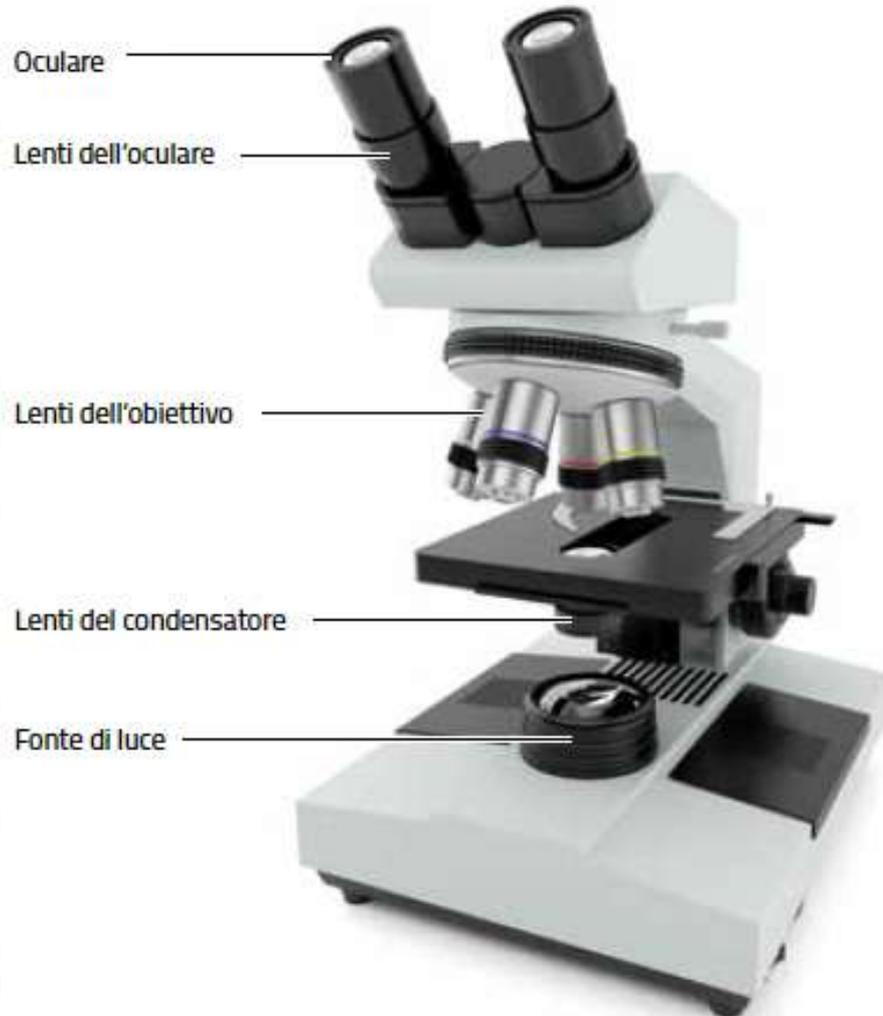


Perché le cellule sono piccole?



Le cellule hanno dimensioni ridotte, in modo da avere una grande superficie rispetto al loro volume. Ciò garantisce scambi efficienti con l'esterno.

Osservare le cellule



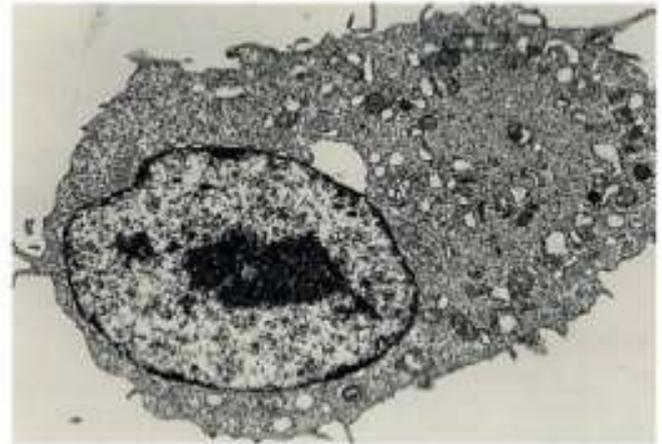
Le cellule si possono osservare bene con un microscopio ottico oppure ancora più in dettaglio con un microscopio elettronico.

Procarioti ed eucarioti, le differenze

A. Batterio della legionella



B. Cellula eucariote animale

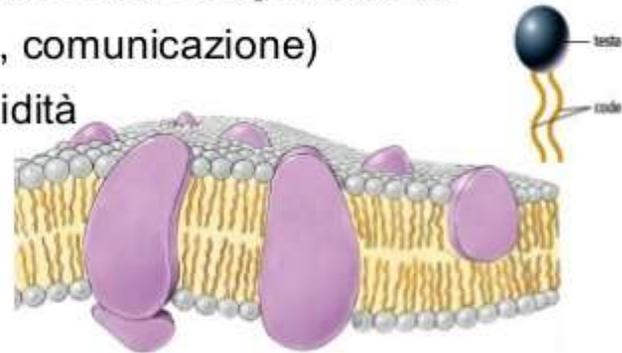


	Procarioti	Eucarioti
Membrana plasmatica	X	X
Membrane intracellulari		X
Compartimentazioni		X

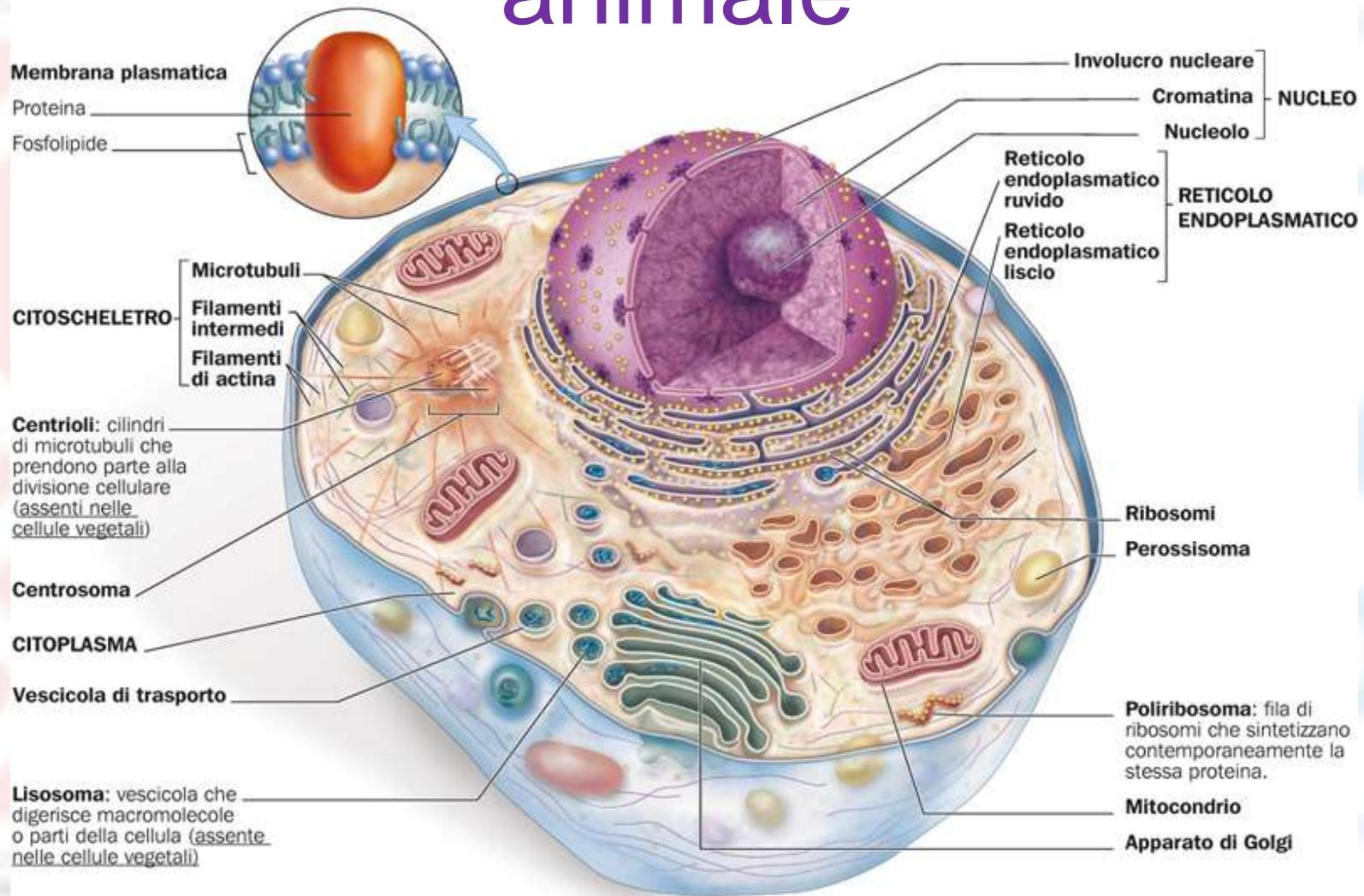
La membrana cellulare

La membrana cellulare (detta anche plasmatica) è una barriera funzionale costituita da tre elementi:

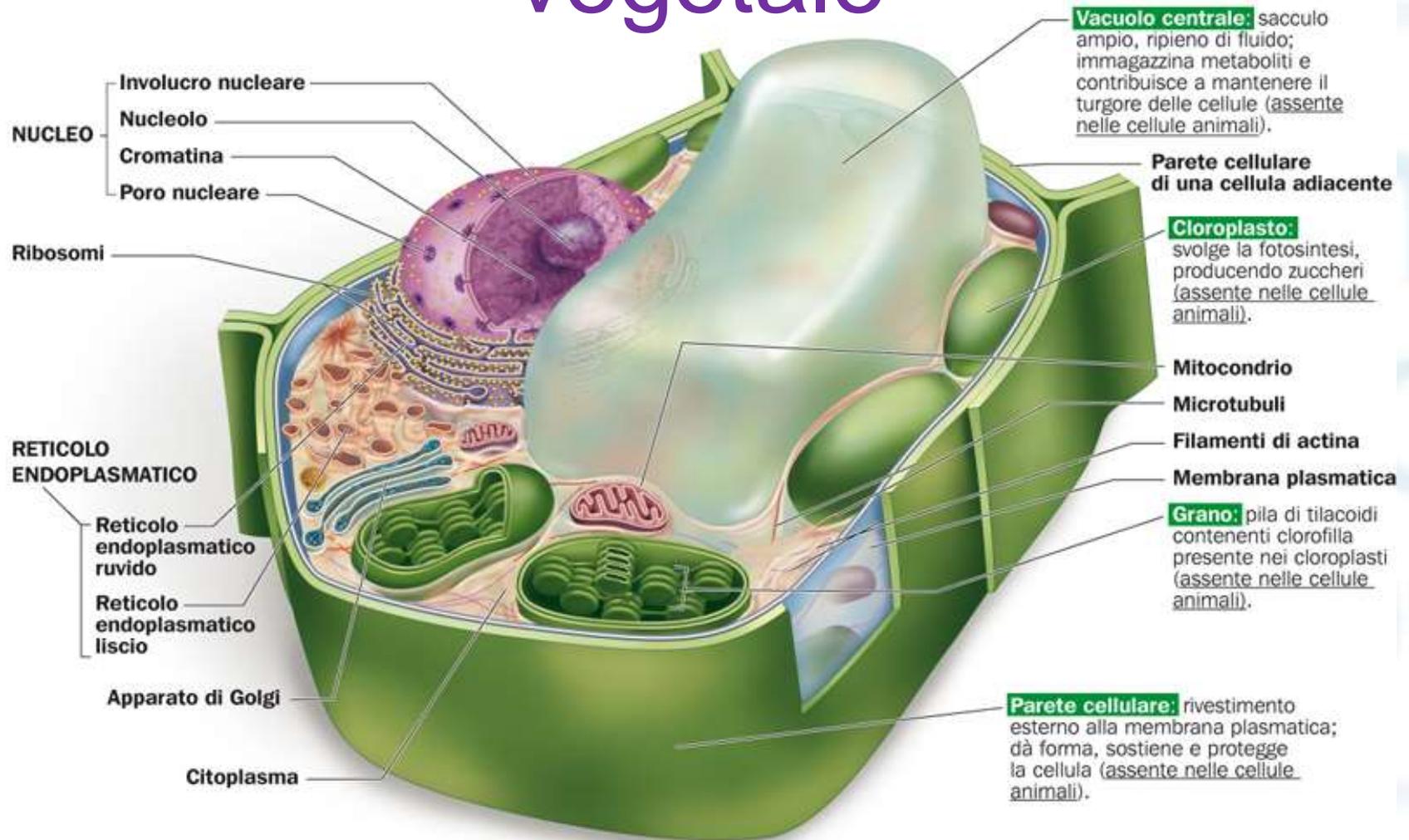
- **FOSFOLIPIDI** disposti in un doppio strato con le code idrofobiche che si fronteggiano e le teste polari idrofiliche rivolte all'esterno ed all'interno della cellula. Tale struttura, per la sua mobilità è descritta come un **mosaico fluido**
- **PROTEINE**: intrinseche o estrinseche, svolgono molte funzioni (trasporto, ancoraggio, comunicazione)
- **COLESTEROLO**: regola la fluidità della membrana limitando i movimenti laterali dei fosfolipidi



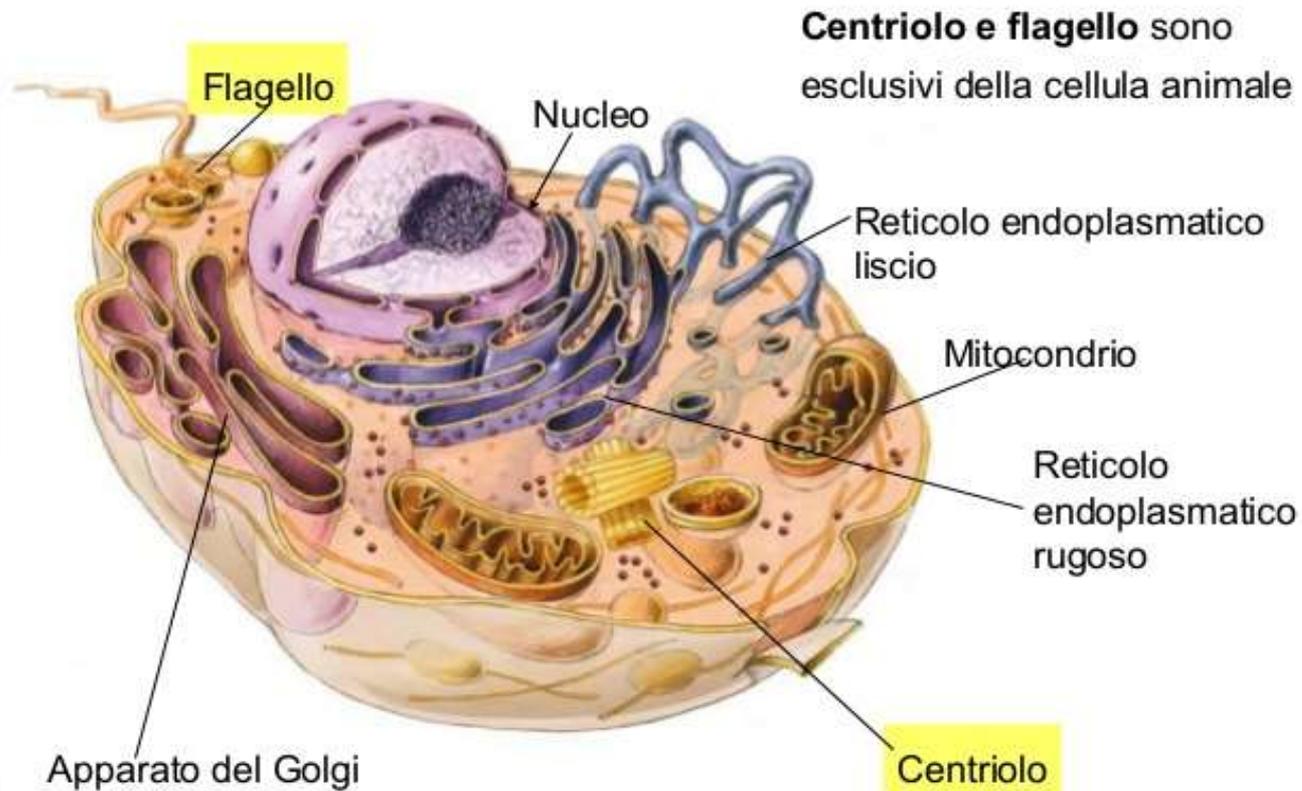
La struttura di una cellula animale



La struttura di una cellula vegetale

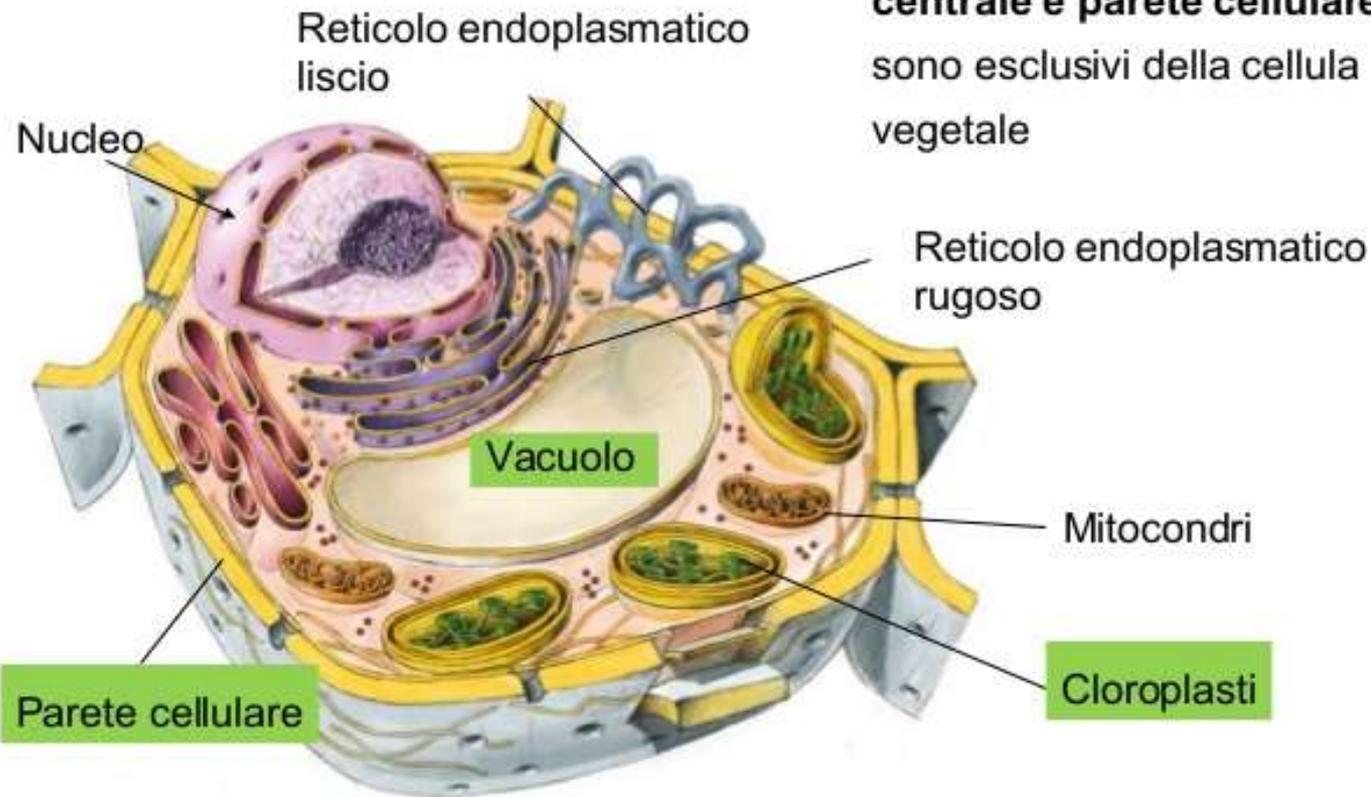


La cellula eucariotica animale



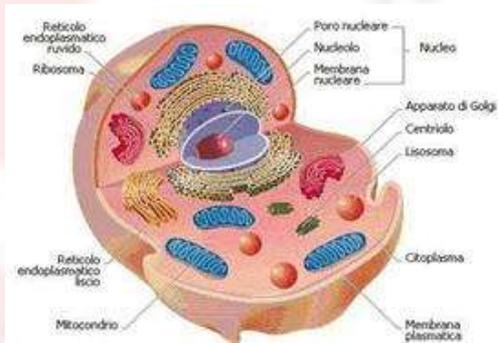
La cellula eucariotica vegetale

Cloroplasto, vacuolo centrale e parete cellulare sono esclusivi della cellula vegetale

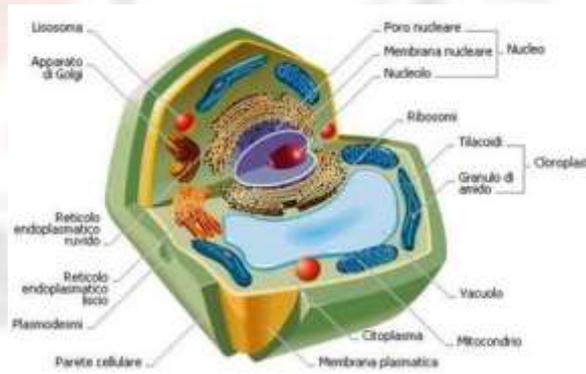


La cellula eucariotica

- Cellula animale ➡ Eterotrofa



- Cellula vegetale ➡ Autotrofa



Organizzazione cellulare

Organelli

Una delle caratteristiche delle cellule eucariote è la presenza di organelli

Le cellule eucariotiche sono suddivise in compartimenti

Le cellule eucariotiche contengono nucleo, reticolo endoplasmatico liscio e granuloso, apparato di Golgi e citoscheletro.

Le cellule vegetali hanno anche parete, vacuolo e cloroplasti; quelle animali invece hanno lisosomi, centrioli e in alcuni casi ciglia e flagelli.

Nucleo, nucleolo e ribosomi



Il nucleo contiene il DNA, sotto forma di cromatina o cromosomi.

Il DNA dirige e controlla la sintesi delle proteine e si duplica quando avviene la divisione cellulare.

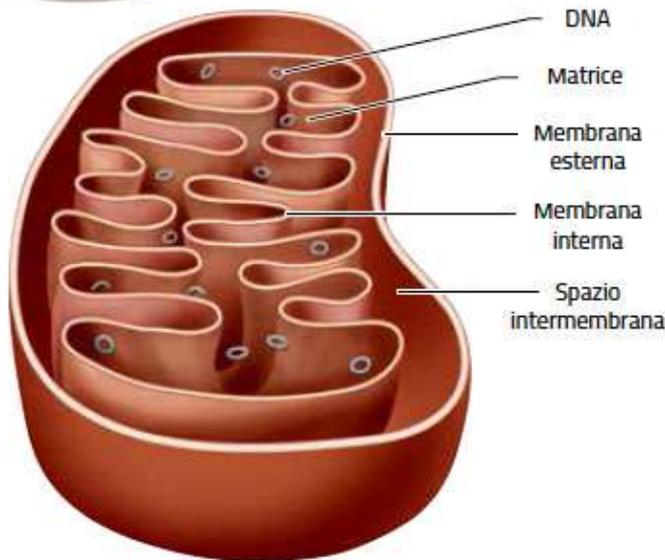
Nel nucleolo vengono costruite le subunità dei ribosomi che sono i siti della sintesi proteica nel citoplasma.

I mitocondri sono i convertitori di energia della cellula



FUNZIONI DEL MITOCONDRIO

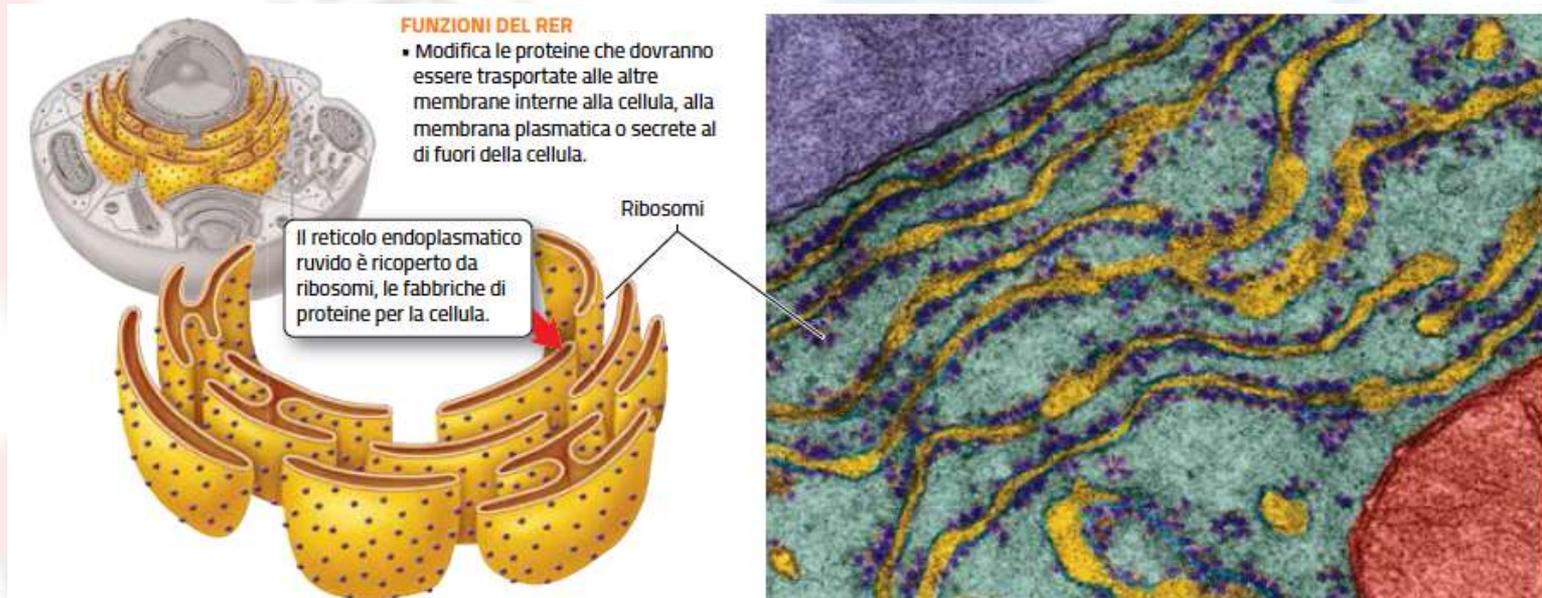
- Sono le centraline energetiche della cellula.
- Producono l'energia necessaria a tutte le funzioni cellulari.



I mitocondri sono gli organuli in cui avviene la respirazione cellulare, un processo durante il quale viene prodotto quasi tutto l'ATP necessario alla cellula come fonte di energia.

Contengono un proprio DNA e ribosomi.

Il reticolo endoplasmatico ruvido

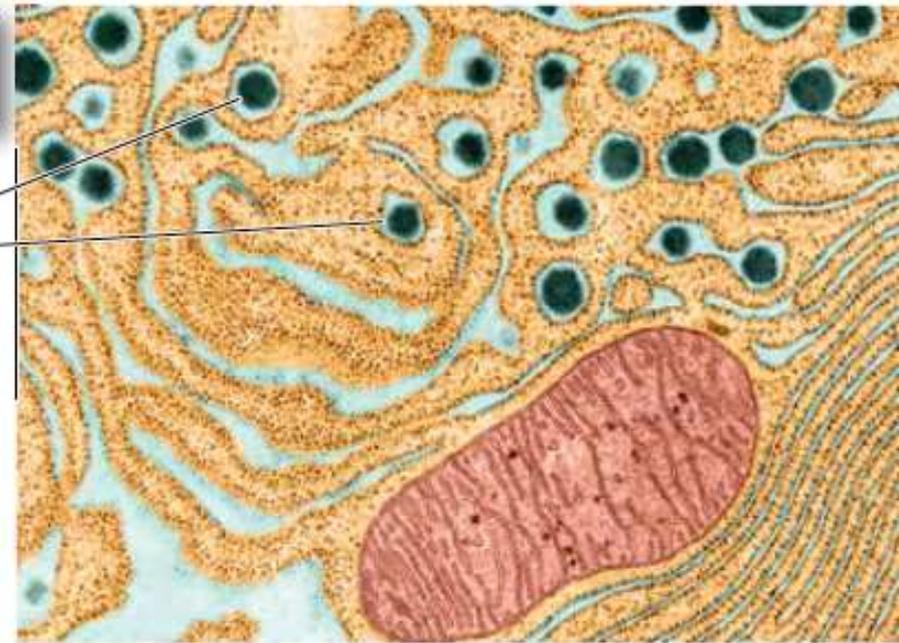
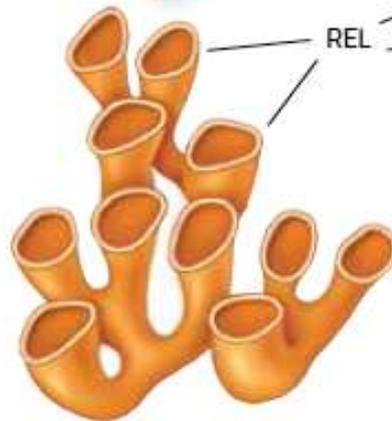


La funzione principale del reticolo endoplasmatico ruvido (RER) è di immagazzinare e modificare le proteine distribuite poi ad altri distretti

Il reticolo endoplasmatico liscio



Il reticolo endoplasmatico liscio deve il proprio nome all'assenza di ribosomi sulla superficie delle membrane.

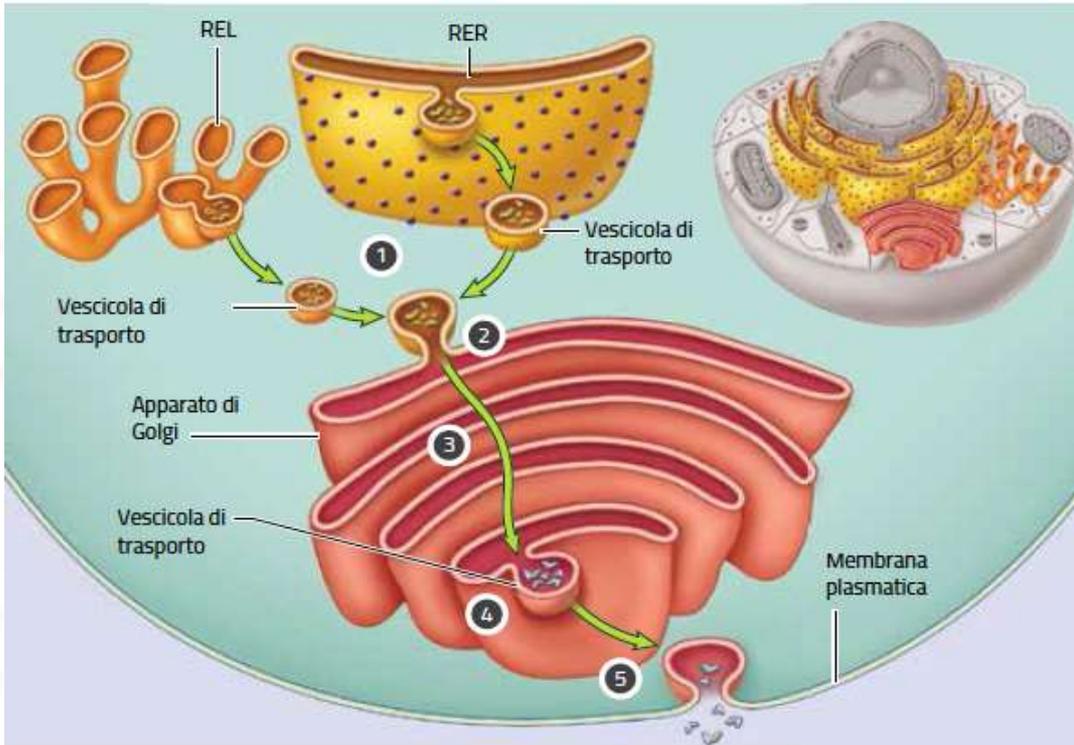


FUNZIONI DEL REL

- Sintetizza lipidi come acidi grassi, fosfolipidi e steroidi.
- Degrada sostanze tossiche, come alcool, farmaci e sostanze di scarto del metabolismo cellulare.

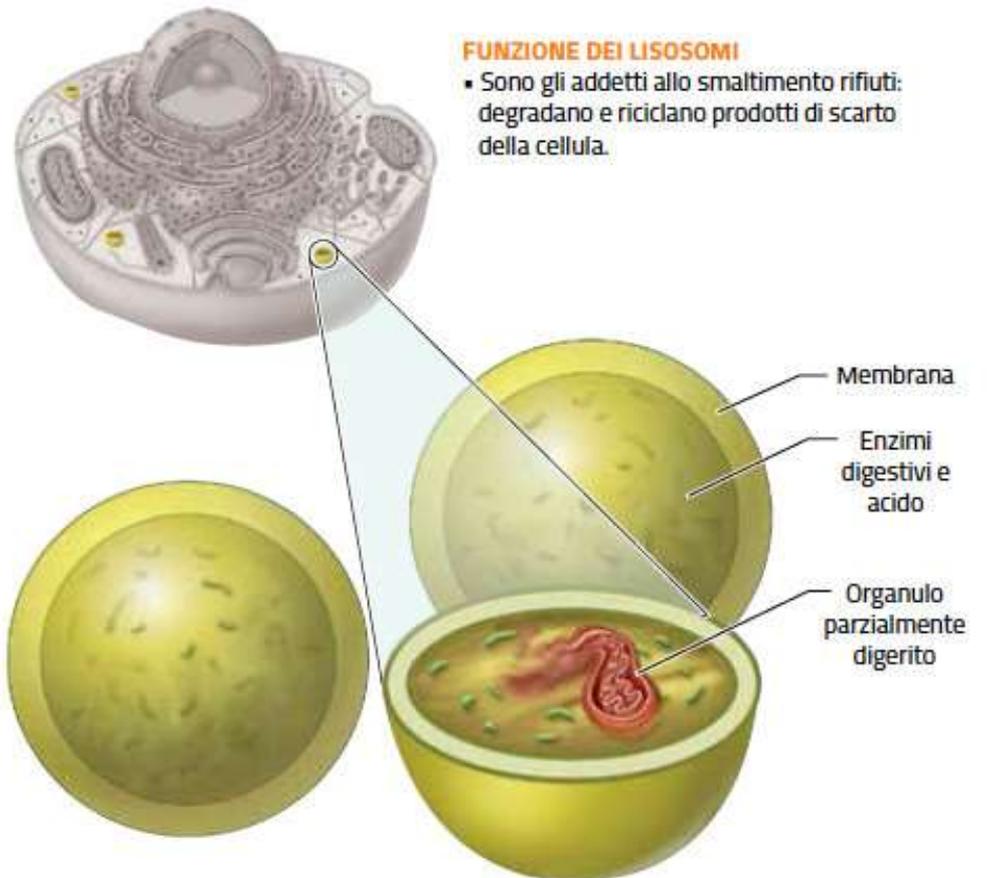
Il reticolo endoplasmatico liscio (REL) sintetizza lipidi e degrada sostanze tossiche come l'alcol, i farmaci e le droghe.

L'apparato di Golgi modifica e organizza molecole complesse



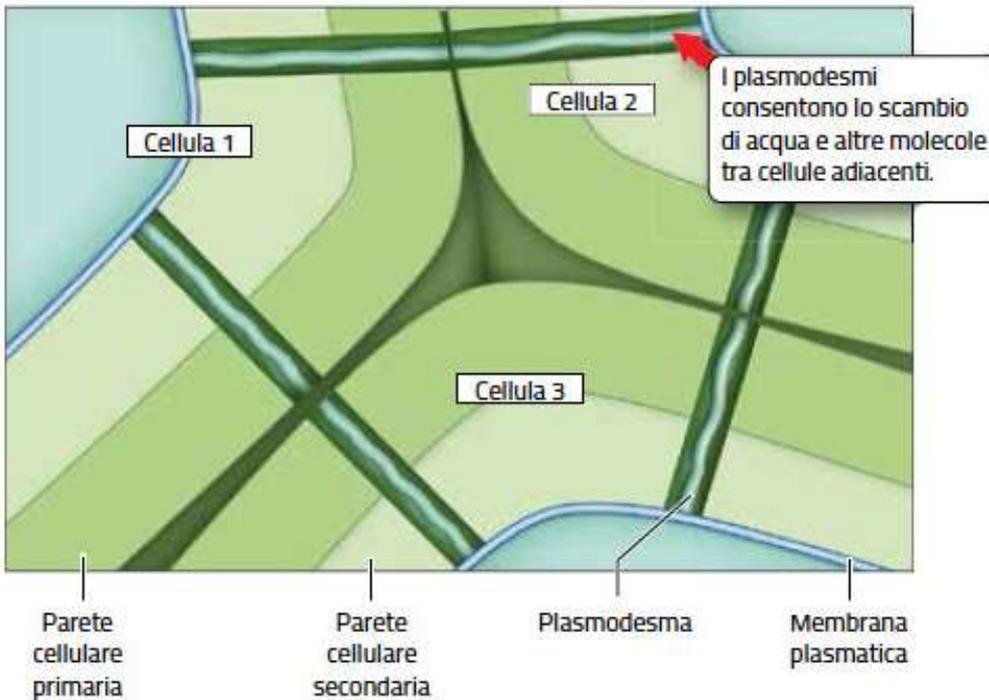
L'apparato di Golgi riceve, per mezzo di vescicole, le molecole sintetizzate nel reticolo endoplasmatico, le modifica e racchiude in vescicole quelle destinate all'utilizzo in altre parti della cellula

I lisosomi sono gli «impianti di smaltimento rifiuti» della cellula



I lisosomi sono vescicole che si formano dall'apparato di Golgi; contengono enzimi digestivi che consentono alla cellula di idrolizzare macromolecole da eliminare o batteri da distruggere

La parete cellulare fornisce protezione e sostegno meccanico

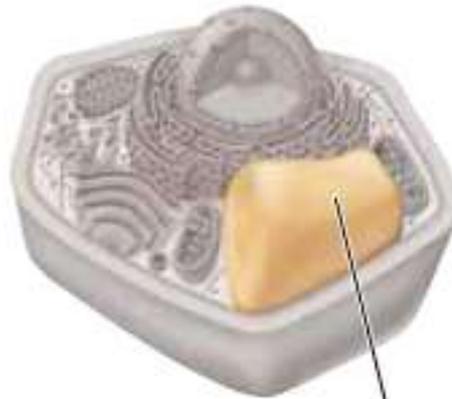


La parete cellulare delle cellule vegetali è composta in prevalenza da cellulosa e circonda la membrana plasmatica della cellula. Sostiene la cellula, consente di ridurre la perdita d'acqua e protegge dagli attacchi di insetti e altri animali.

I vacuoli hanno varie funzioni

FUNZIONI DEL VACUOLO

- Immagazzina nutrienti.
- Elimina i prodotti di scarto.
- Accumula sostanze velenose.
- Contiene pigmenti, che aiutano ad attirare uccelli e insetti impollinatori.
- Mantiene il turgore della cellula.

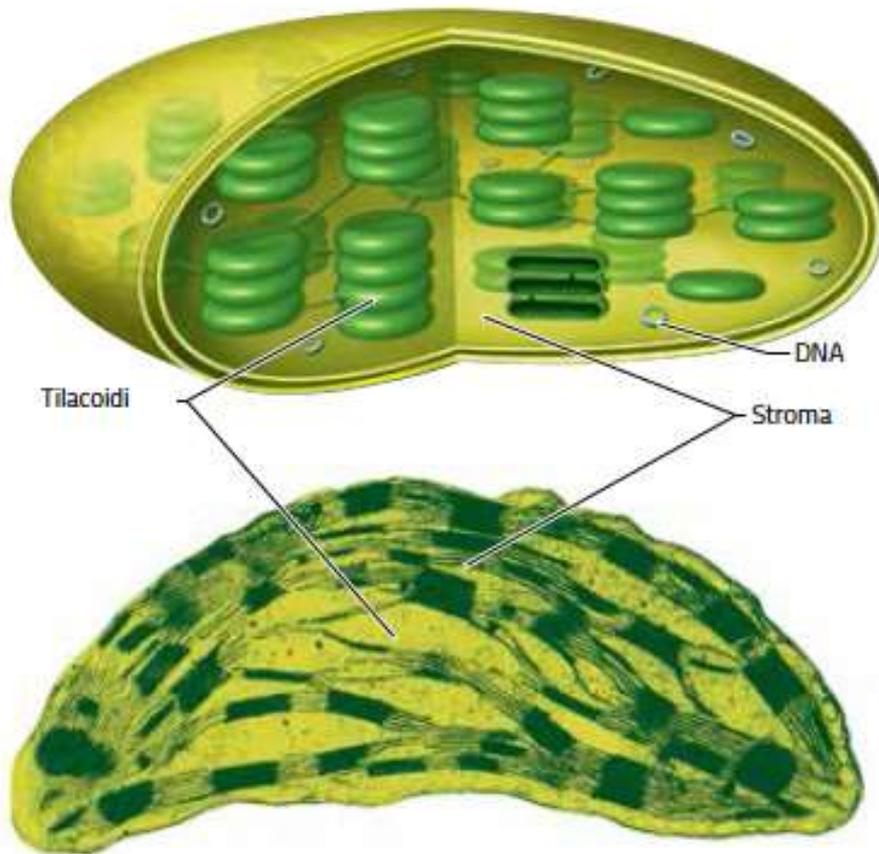


Vacuolo



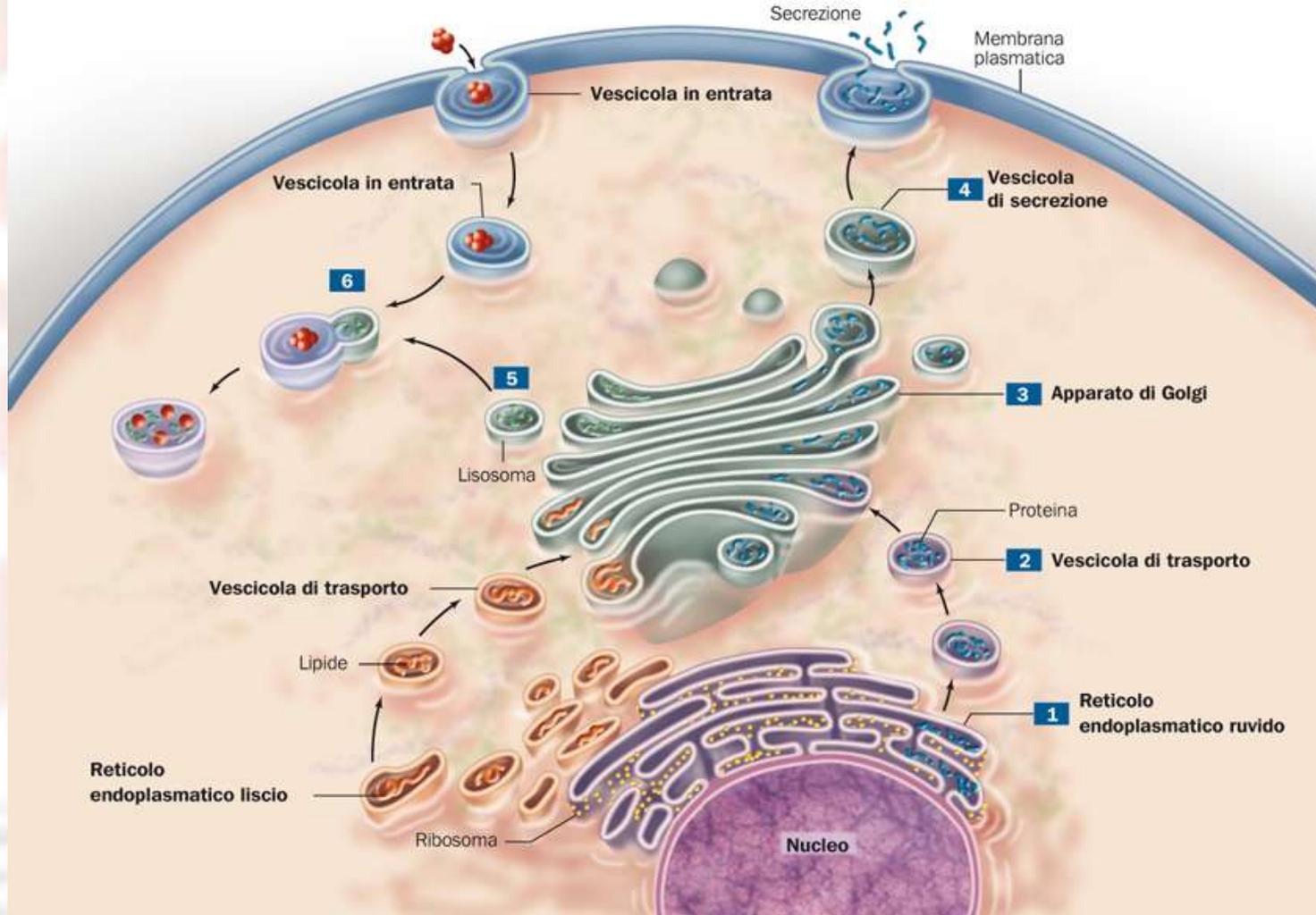
I vacuoli svolgono diverse funzioni: immagazzinamento di nutrienti, eliminazione delle scorie, deterrente per erbivori e insetti, riproduzione sessuale e sostegno meccanico

I cloroplasti sono gli impianti solari delle cellule vegetali



Il cloroplasto, presente nelle piante e nelle alghe, è l'organulo in cui ha sede la fotosintesi, ovvero la trasformazione di energia luminosa in energia chimica, con produzione di ossigeno come sottoprodotto.

Gli organuli del sistema delle membrane interne lavorano in sinergia

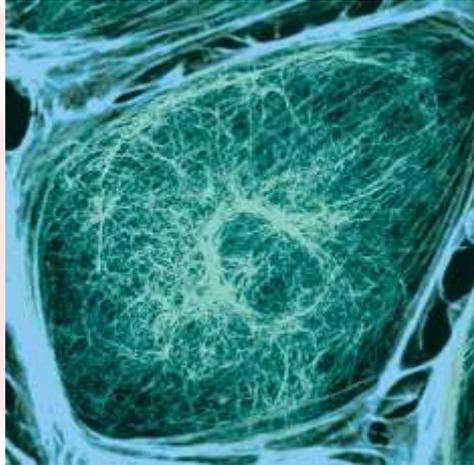


Le cellule eucariote

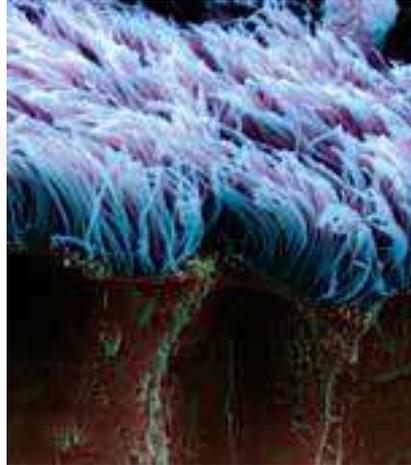
Le maggiori dimensioni delle cellule eucariote sono rese possibili anche dalla presenza del *citoscheletro*, che dà forma alla cellula, sostiene gli organuli e facilita il trasporto dei materiali.

CITOSCHELETRO: un'intelaiatura formata da una complessa rete di proteine fibrose che, sotto forma di filamenti, attraversa tutta la cellula dandole la forma caratteristica. Tipico delle cellule eucariote, svolge anche una funzione di guida dei movimenti degli organelli, e diventa fondamentale al momento della divisione cellulare. La rete del citoscheletro consiste di microtubuli, microfilamenti e filamenti intermedi.

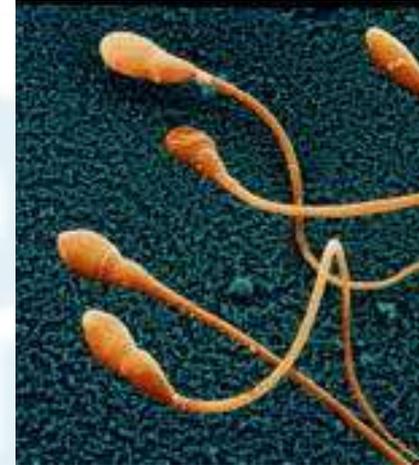
Il citoscheletro, le ciglia e i flagelli



Filamenti del
citoscheletro



Ciglia

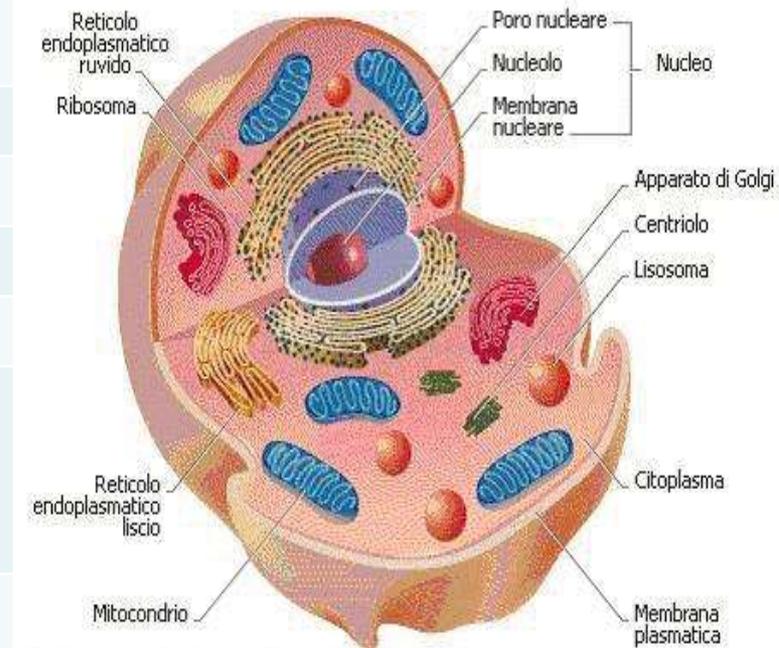


Flagelli

Il citoscheletro dà forma e sostegno alle cellule e svolge funzione di ancoraggio e guida per lo spostamento di organuli e molecole nella cellula. Molte cellule presentano anche strutture esterne mobili e filamentose chiamate ciglia e flagelli.

Funzioni degli organelli cellulari

Organello	Funzione
MEMBRANA CELLULARE	delimita e protegge la cellula - regola gli scambi di sostanze con l'ambiente esterno
CITOPLASMA	- È l'ambiente (acquoso/gelatinoso) in cui avvengono le reazioni chimiche in cui sono immersi gli organuli cellulari
RIBOSOMI	Sintetizzano le proteine
MITOCONDRI	Forniscono l'energia
LISOSOMI	Degradano le parti vecchie o dannose
VACUOLO	Accumula acqua e sostanze di riserva
NUCLEO	è sede delle informazioni necessarie alla formazione e funzionamento di una cellula. Presenta sulla superficie dei pori
APPARATO DEL GOLGI	Assemblaggio e trasporto proteine
RETICOLO ENDOPLASMATICO	Sintesi proteine (insieme ai ribosomi)
CENTRIOLI	Intervengono nella divisione cellulare



LA CELLULA una «macchina» autosufficiente

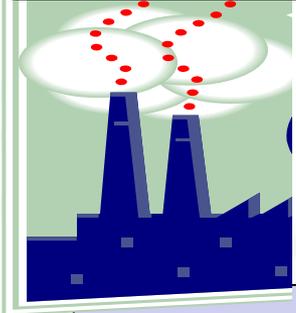
Reticolo endoplasmatico=
è una rete di trasporto



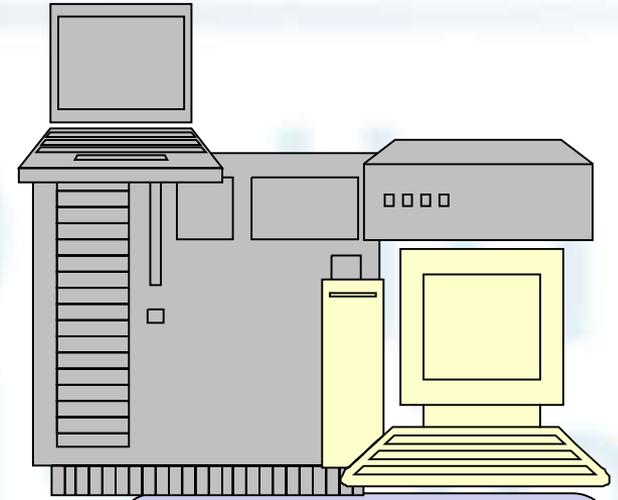
Membrana cell.=le
mura della città con
porte che regolano
l'ingresso e l'uscita
delle sostanze



Lisosomi=Sono
l'impianto di
smaltimento e
riciclo dei rifiuti



Nucleo=centrale di
controllo che
dirige tutte le
funzioni cellulari

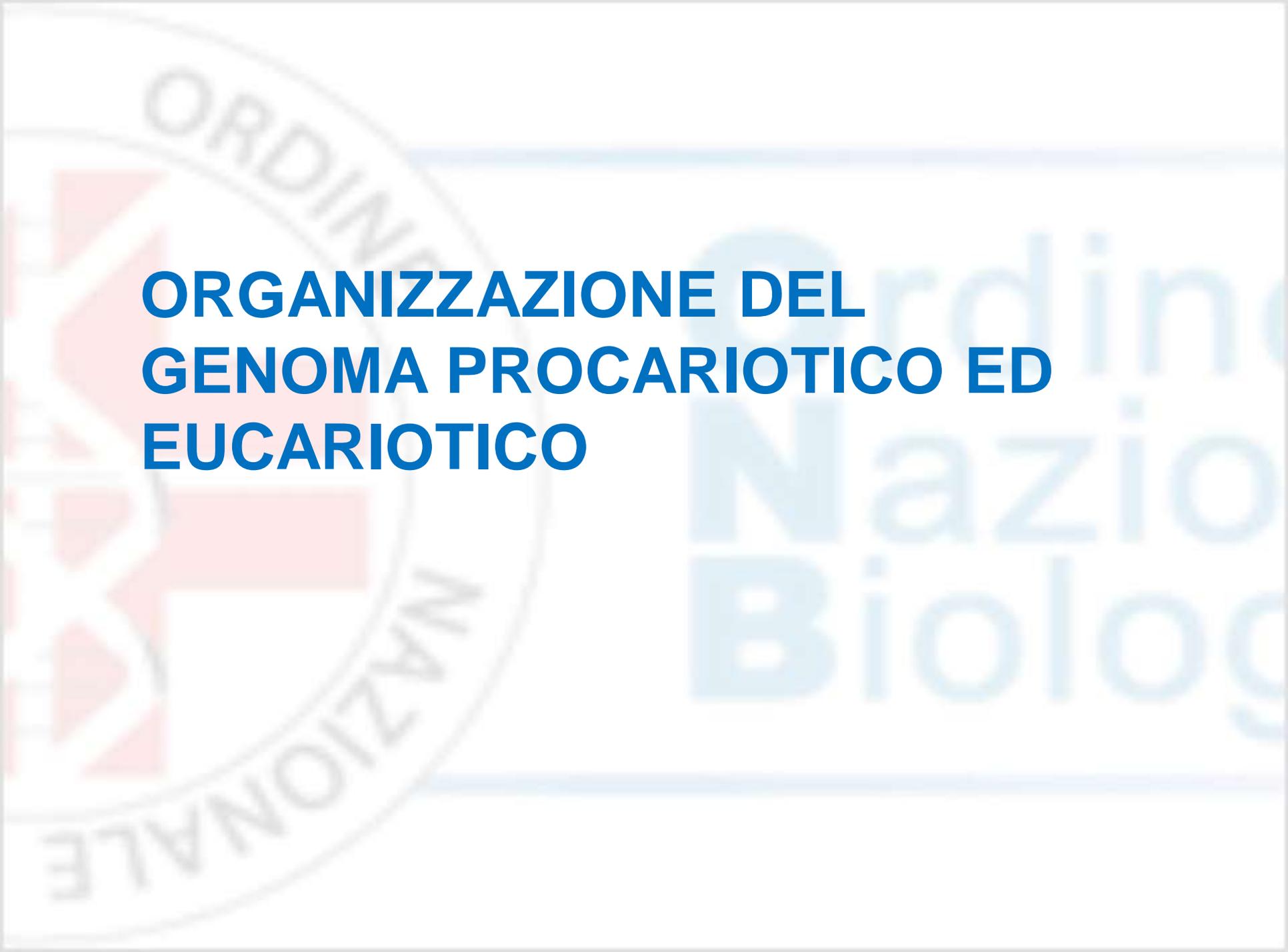


Complesso di
Golgi=magazzino
di assemblamento
e costruzione

Vacuolo=magazzin
o delle provviste

Mitocondrio=centr
ale energetica





**ORGANIZZAZIONE DEL
GENOMA PROCARIOTICO ED
EUCARIOTICO**

Le cellule eucariote

La più elevata complessità della cellula eucariote richiede una quantità maggiore di informazioni e, quindi, di cromosomi. Essi sono rappresentati da più molecole di DNA lineare associate a proteine di supporto che ne permettono l'avvolgimento

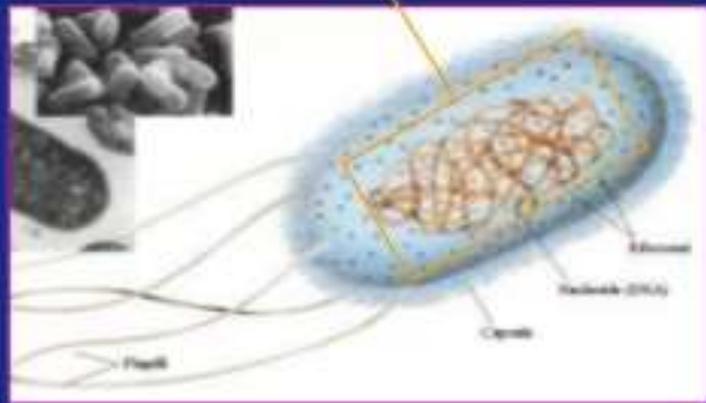
Grandezza dei genomi utili nella sperimentazione

Classe	Specie	Genoma (bp)
Alghe	<i>Pyrenomas salina</i>	$6,6 \times 10^5$
Micoplasmi	<i>M. pneumoniae</i>	$1,0 \times 10^6$
Batteri	<i>E. coli</i>	$4,2 \times 10^6$
Lieviti	<i>S. cerevisiae</i>	$1,3 \times 10^7$
Muffe mucillaginose	<i>D. discoideum</i>	$5,4 \times 10^7$
Nematodi	<i>C. elegans</i>	$8,0 \times 10^7$
Insetti	<i>D. melanogaster</i>	$1,8 \times 10^8$
Uccelli	<i>G. domesticus</i>	$1,2 \times 10^9$
Anfibi	<i>X. laevis</i>	$3,1 \times 10^9$
Mammiferi	<i>H. sapiens</i>	$3,3 \times 10^9$

Dove si trova il DNA?

Il DNA è presente in tutti i
viventi, e si trova...

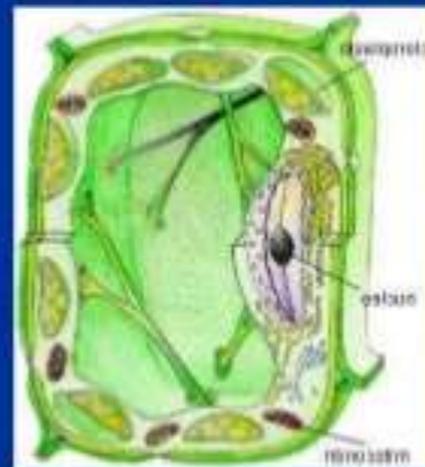
...in una regione del citoplasma
chiamata **nucleoide**, nei procarioti



...in un **nucleo** ben definito, delimitato
da doppia membrana, negli eucarioti



...Ma è presente anche
nei **mitocondri** e nei
plastidi!!!

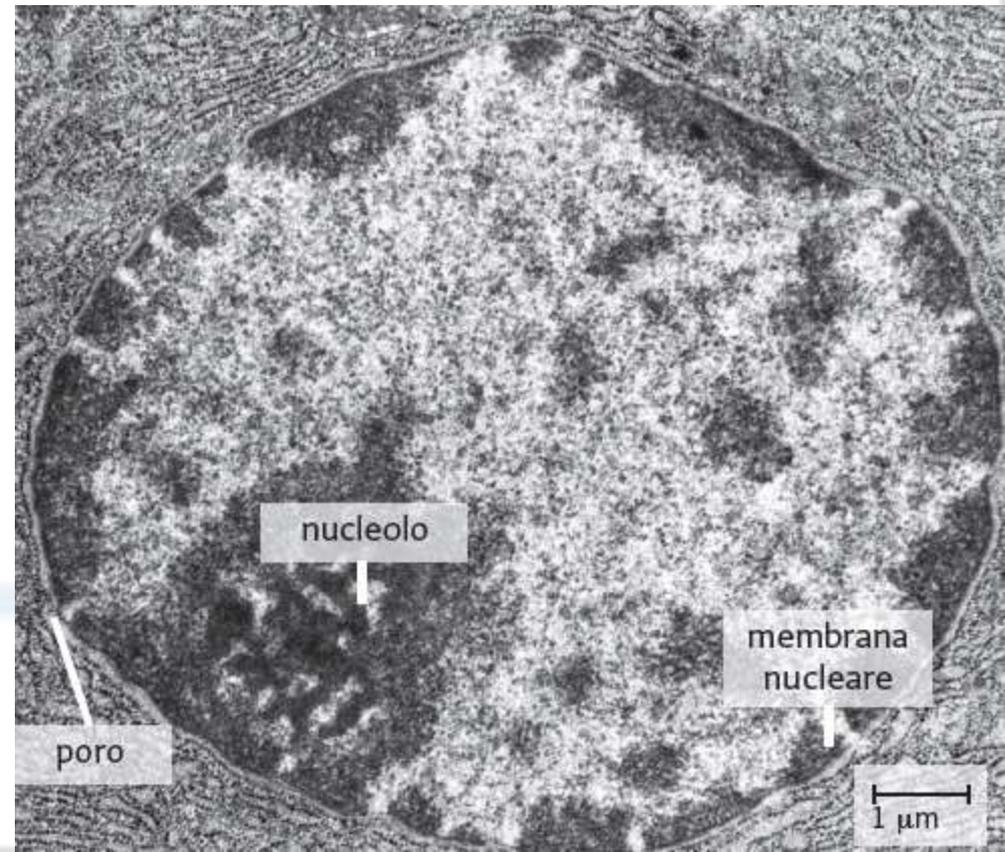




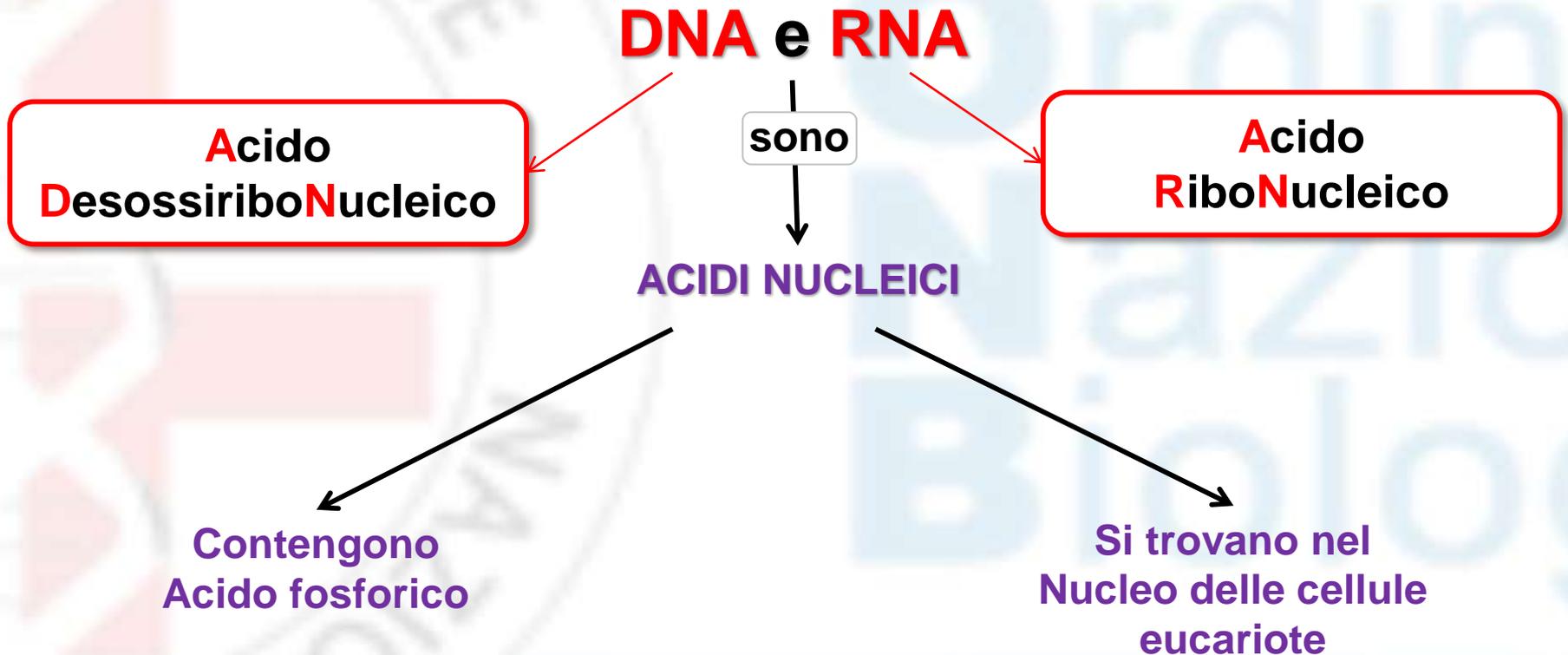
Il nucleo

Il nucleo è circondato dall'involucro nucleare, formato da due membrane - una rivolta verso il citoplasma l'altra interna attraversato da numerosi pori.

Il materiale interno al nucleo viene chiamato cromatina, un groviglio di DNA associato a proteine dette istoni, attorno alle quali il DNA si avvolge.



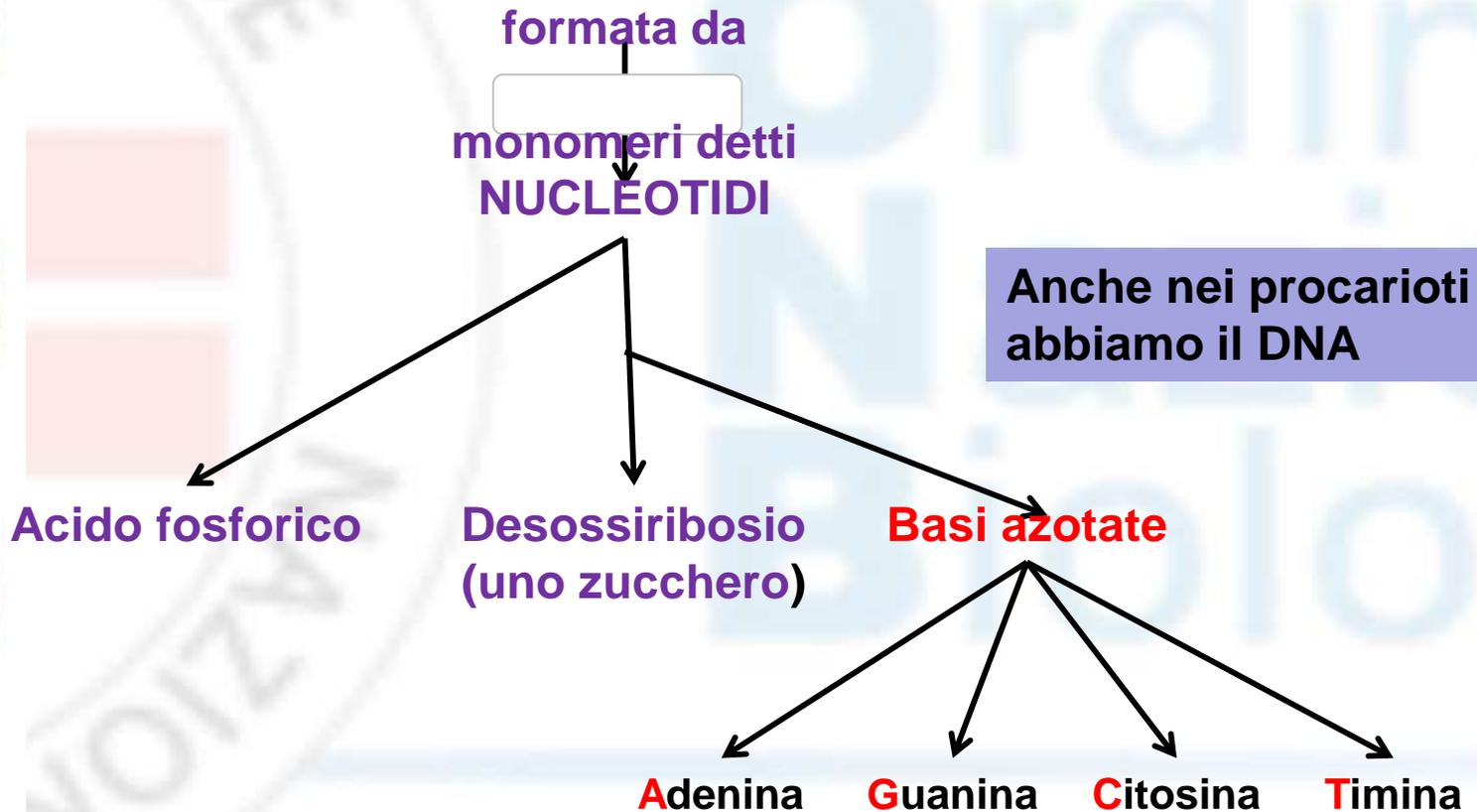
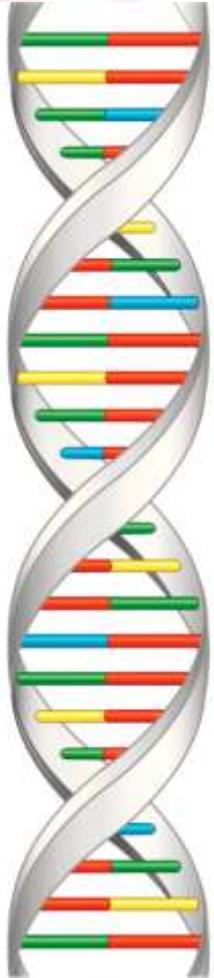
Gli acidi nucleici



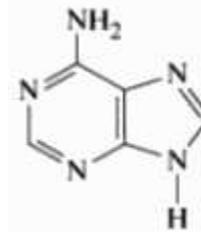
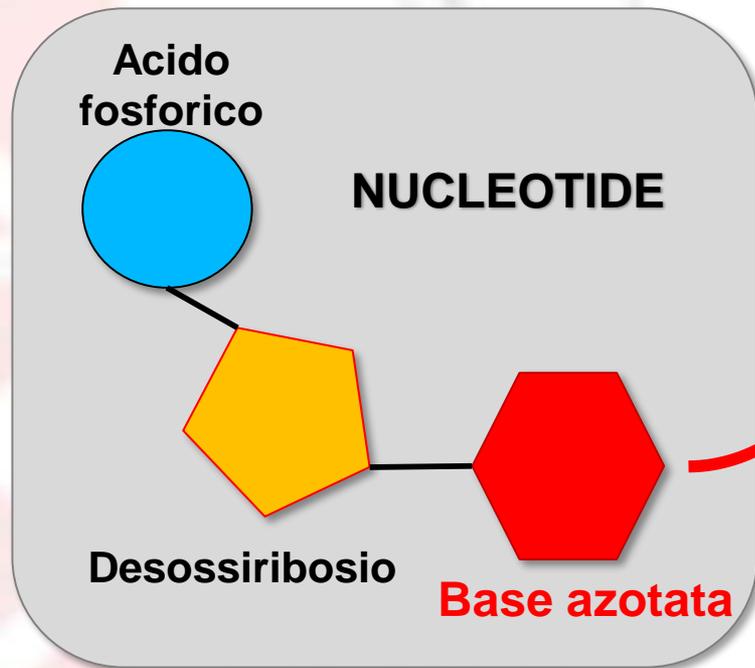
Anche nei procarioti
abbiamo DNA e RNA

DNA

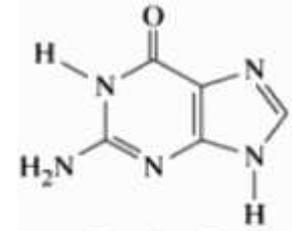
Il DNA è una macromolecola



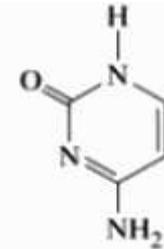
Struttura dei nucleotidi



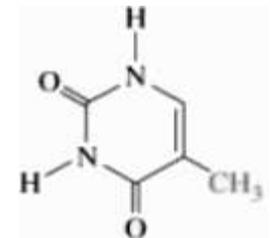
Adenina



Guanina

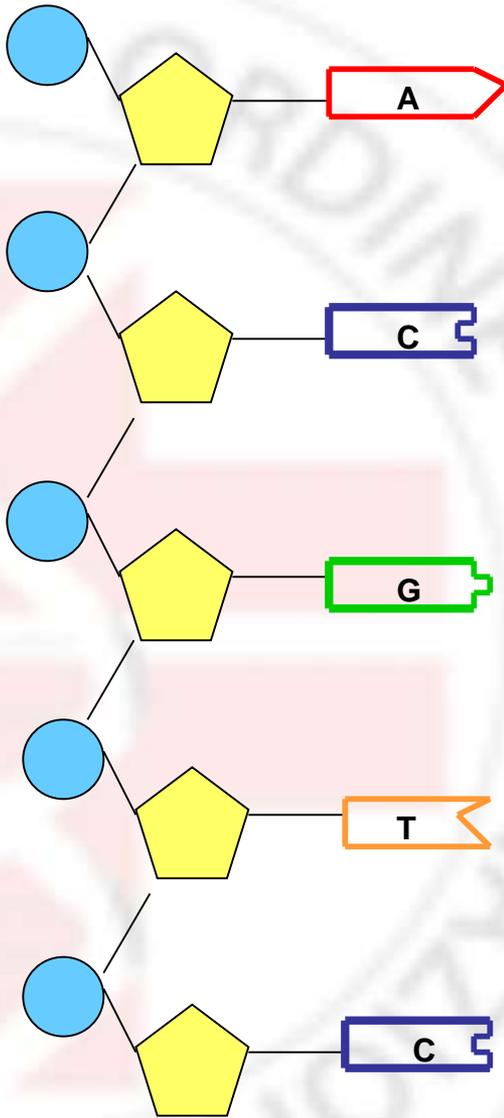


Citosina



Timina

Il DNA ha la stessa struttura anche nei procarioti



UN FILAMENTO DI DNA è una
successione di nucleotidi



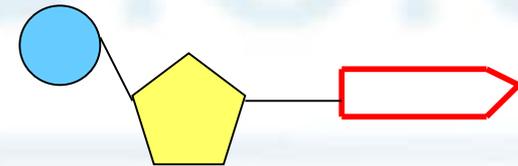
Una molecola di
ACIDO FOSFORICO



Lo zucchero
DEOSSIRIBOSIO



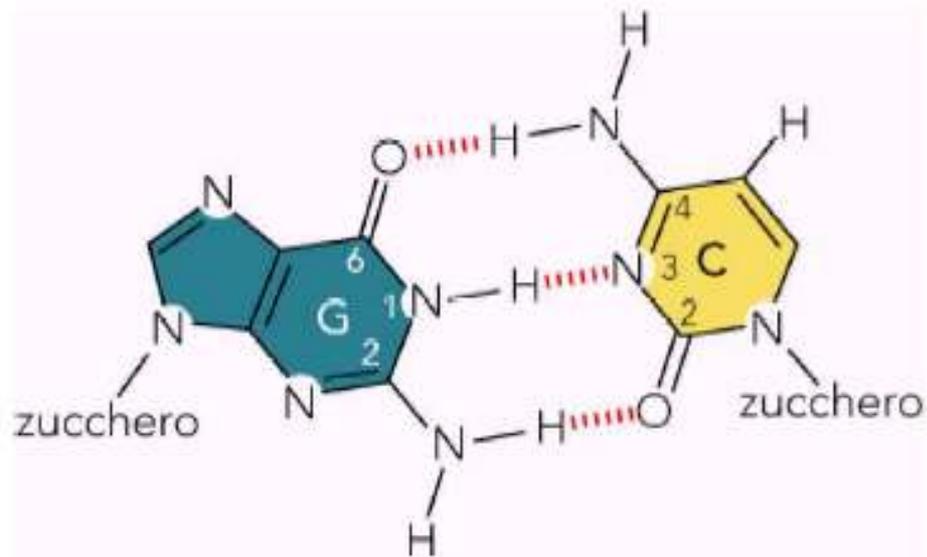
Una BASE AZOTATA



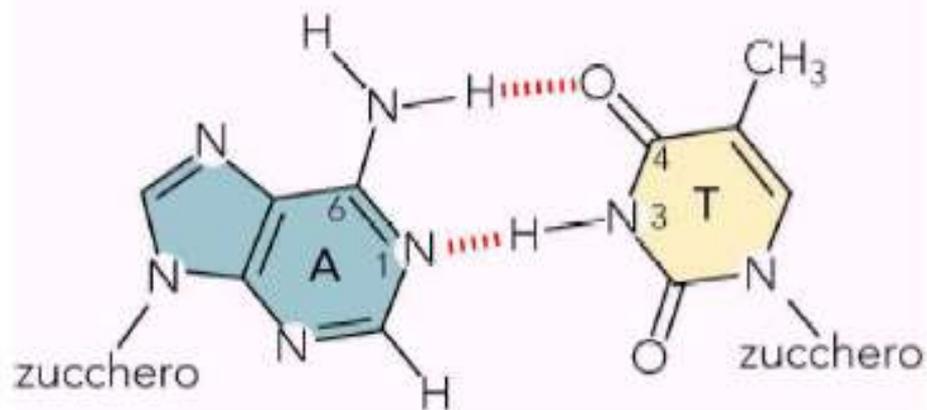
NUCLEOTIDE

unità fondamentale del DNA

Appaiamento tra le basi A:T e G:C per mezzo dei legami idrogeno

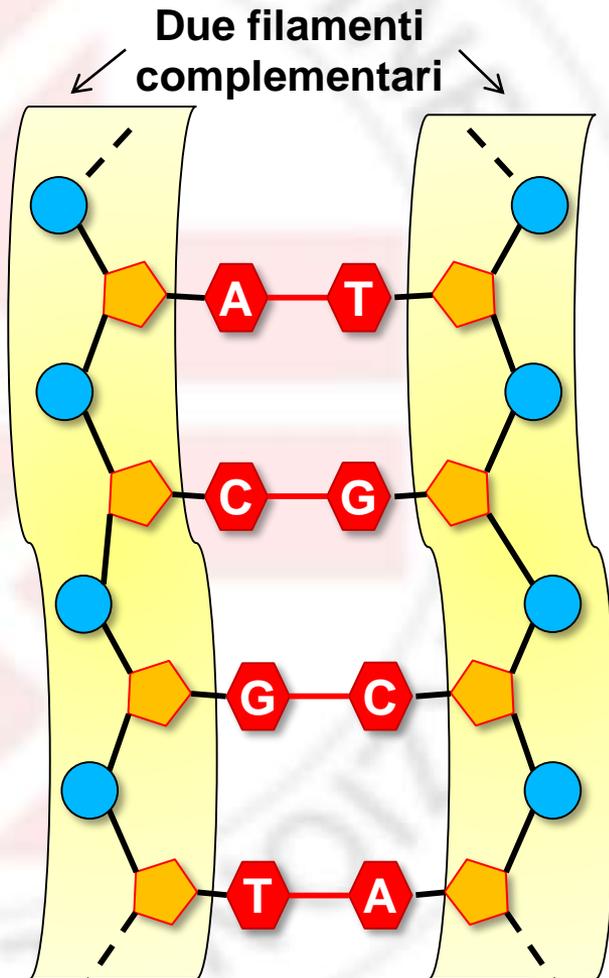


3 legami idrogeno

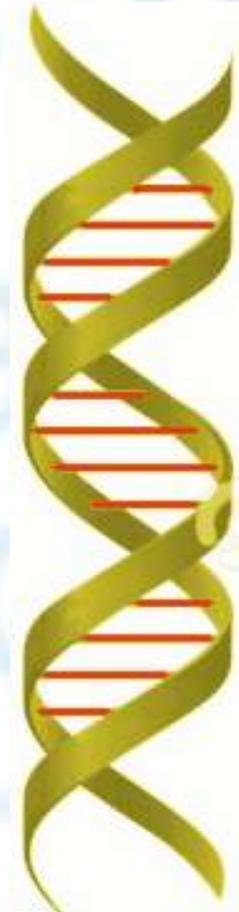
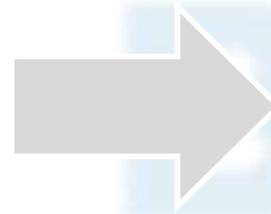


2 legami idrogeno

Struttura del DNA



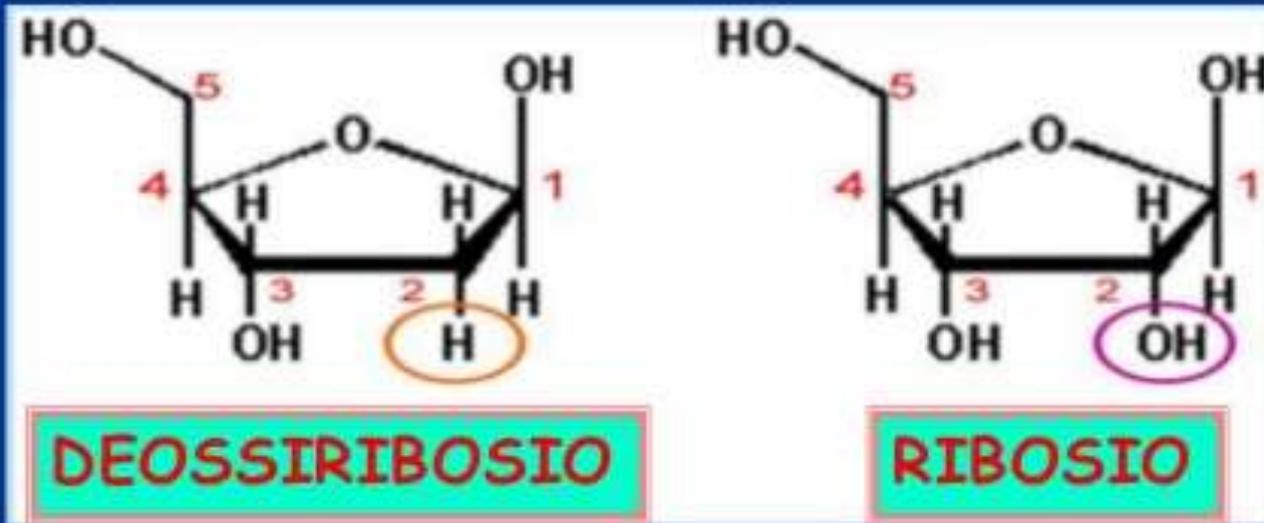
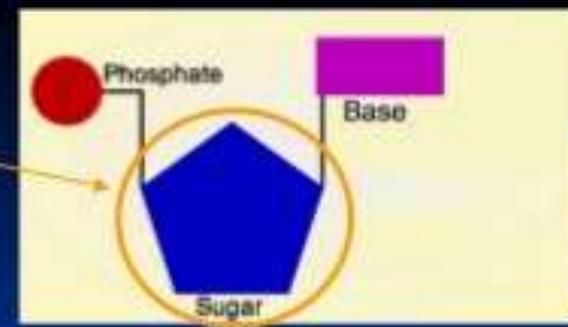
I filamenti si avvolgono intorno a uno stesso asse formando la struttura a DOPPIA ELICA



Struttura del DNA

LO ZUCCHERO

- ✓ E' sempre un pentoso (cioè a 5 atomi di Carbonio, numerati da 1 a 5 in senso orario)
- ✓ La differenza tra lo zucchero del DNA e quello dell'RNA consiste rispettivamente nella presenza/assenza dell'atomo di ossigeno in posizione 2



Nel DNA

Nell'RNA

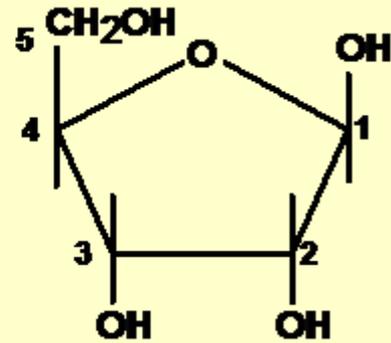
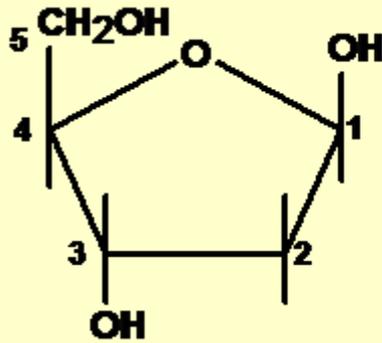
Acido **Deossiribo**Nucleico

L'atomo di ossigeno in meno nel DNA conferisce a tale molecola una minore reattività chimica ed una maggiore stabilità rispetto all' RNA

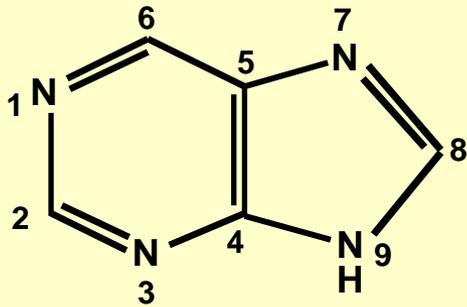
ATTENZIONE ALLA DIFFERENZA!

Componenti chimici degli acidi nucleici

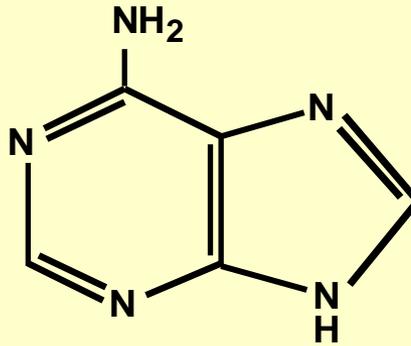
2-desossiribosio
(2-deoxyribose)



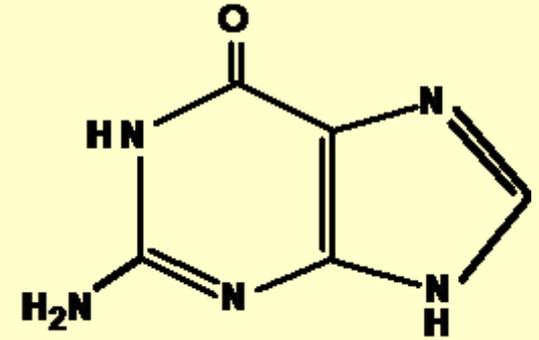
ribosio



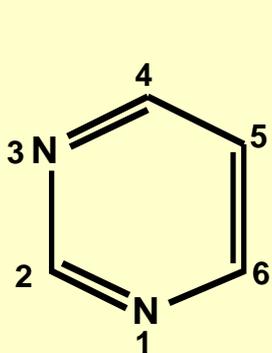
purina



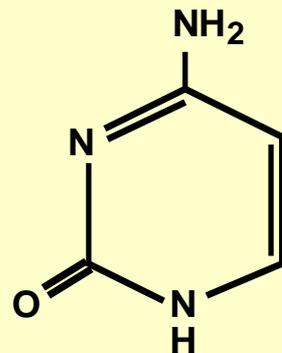
adenina



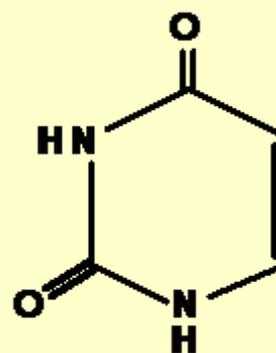
guanina



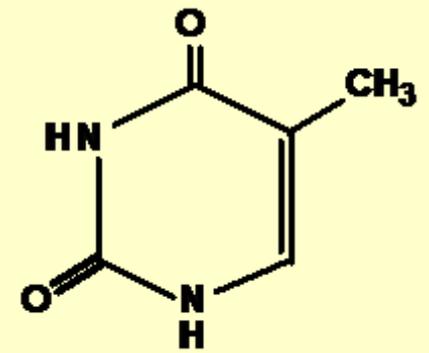
pirimidina



citosina



uracile



timina

DNA VS RNA

	DNA	RNA
Dove si trova?	Nel nucleo	Nel nucleo e nel <u>citoplasma</u>
Quanti filamenti?	2	1
Quale zucchero?	Desossiribosio	Ribosio
Quali basi azotate?	Adenina, Guanina, Citosina, <u>Timina</u>	Adenina, Guanina, Citosina, <u>Uracile</u>
Quale funzione?	Contiene le <u>informazioni</u> per la sintesi delle proteine	<u>Intermediario</u> del DNA durante la sintesi delle proteine

DIFFERENZE DNA-RNA

Il DNA è più stabile dell'RNA

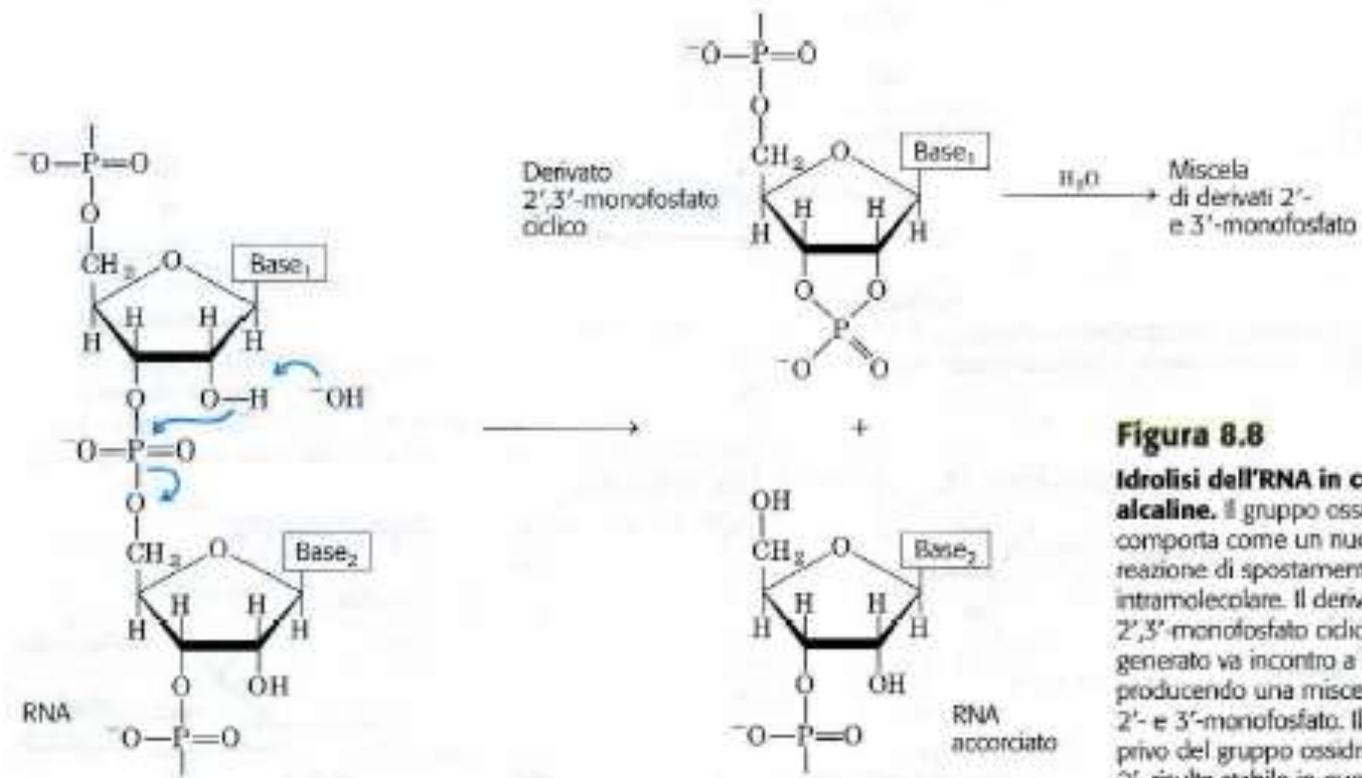


Figura 8.8
Idrolisi dell'RNA in condizioni alcaline. Il gruppo ossidrilico 2' si comporta come un nucleofilo in una reazione di spostamento intramolecolare. Il derivato 2',3'-monofosfato ciclico che si è generato va incontro a idrolisi producendo una miscela di derivati 2'- e 3'-monofosfato. Il DNA, essendo privo del gruppo ossidrilico in posizione 2', risulta stabile in queste condizioni.

Tipi di strutture secondarie nell'RNA

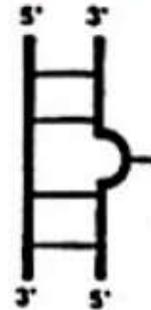
Singolo filamento



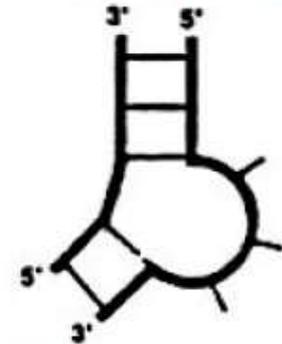
Doppio filamento
Elica (forma A)



Bulge loop singolo



Bulge loop multiplo



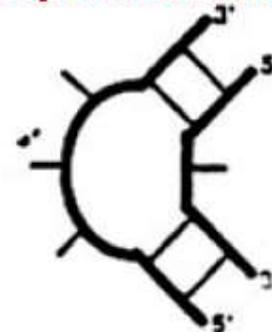
Stem and loop
Hairpin loop



Loop interno simmetrico

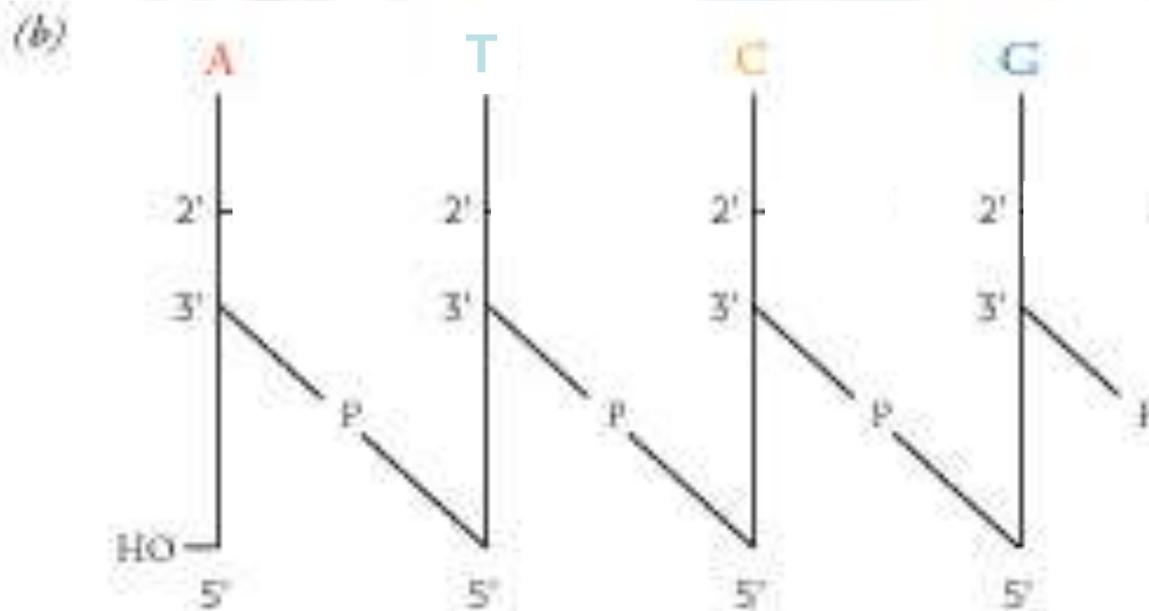


Loop interno asimmetrico

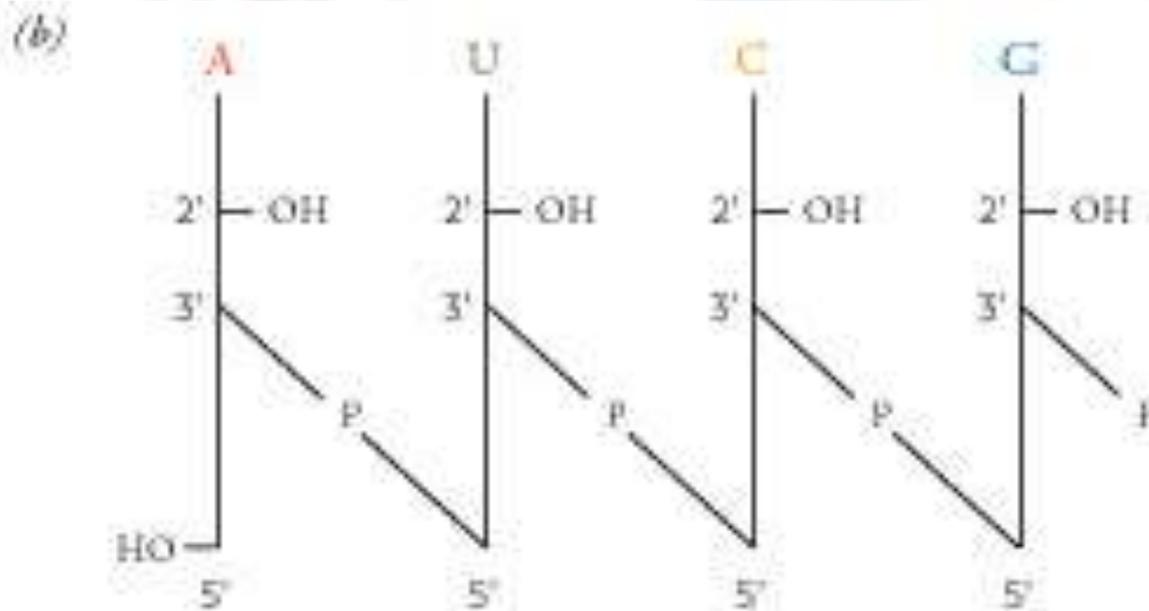


La combinazione regioni a doppio filamento (ds) e a singolo filamento (ss) genera vari tipi di strutture. Regioni non appaiate di un elica di distinguono in **bulge** (rigonfiamento) quando la regione ss interessa un singolo filamento, **hairpin** (molletta) quando la regione a ss interessa la parte terminale di un elica e **loop interni** quando la regione ss interessa entrambi i filamenti. Queste regioni destabilizzano le regioni a ds circostanti. L'hairpin è tra tutte la regione più stabile a condizione che abbia un numero minimo di basi ss (quattro o più).

DNA

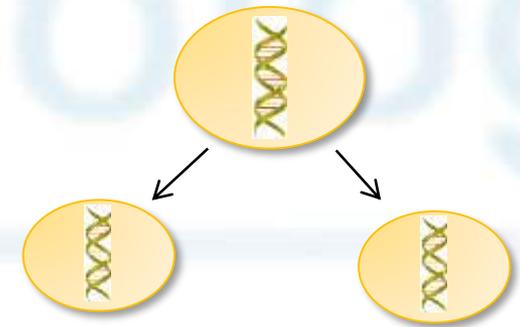


RNA



Caratteristiche del DNA

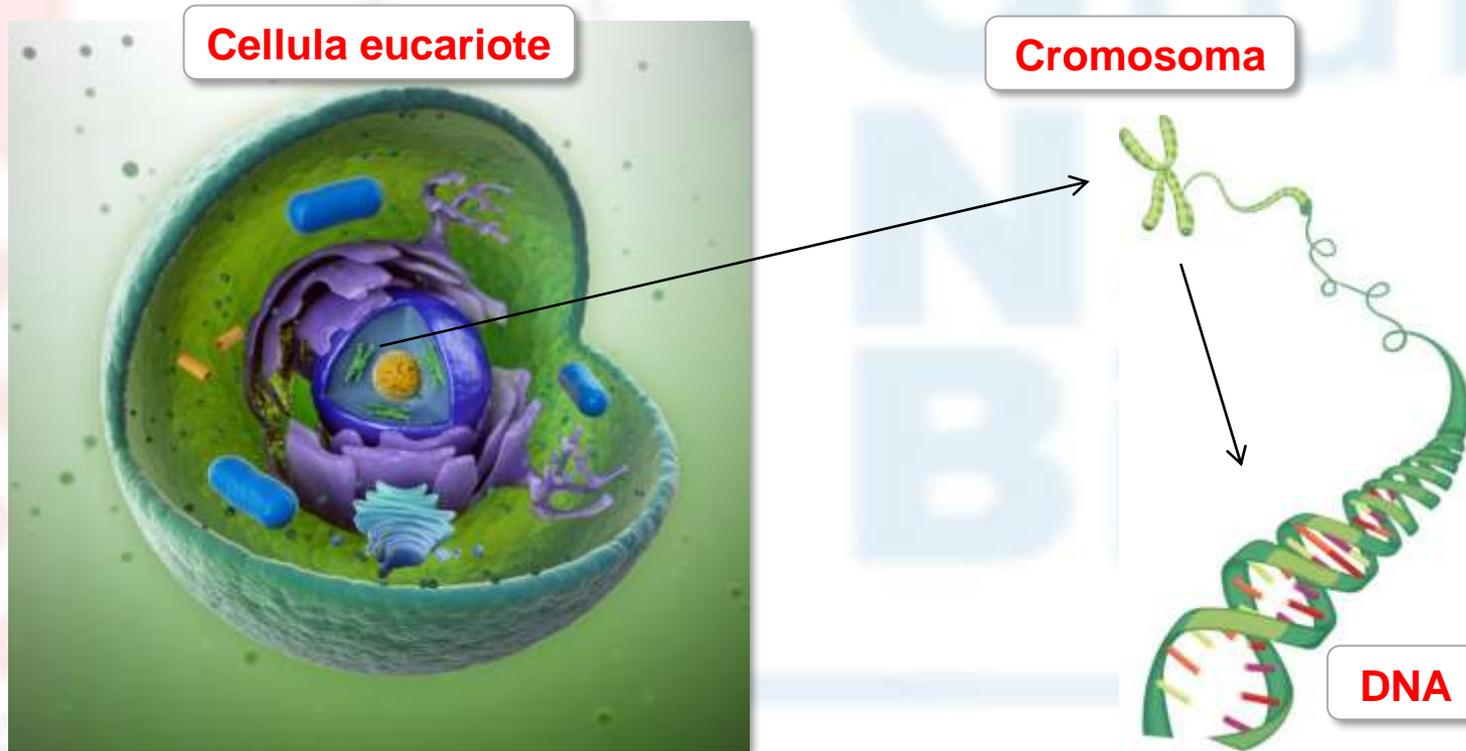
- **Serve per la trasmissione dei caratteri ereditari**
- **Contiene le informazioni per la costruzione delle proteine**
- **Si autoduplica: quando una cellula si divide le cellule figlie ereditano lo stesso DNA della cellula madre**



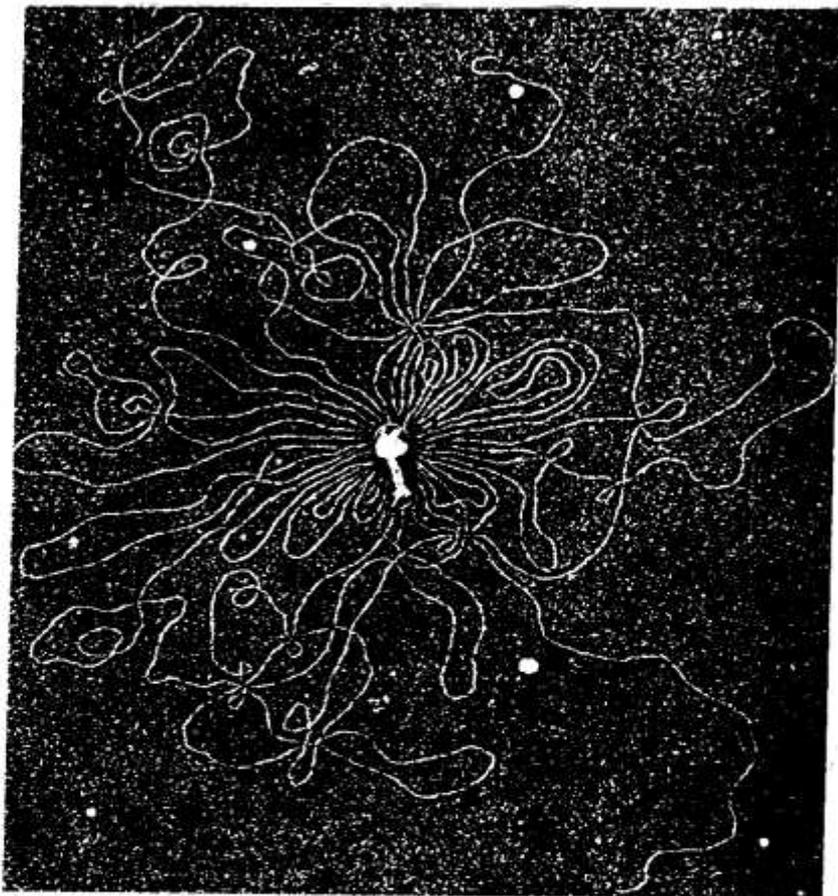
A COSA SERVE IL DNA?

Dove si trova il DNA

Nelle cellule di eucarioti il DNA si trova all'interno del nucleo, avvolto su sé stesso insieme a specifiche proteine fino a formare i cromosomi.

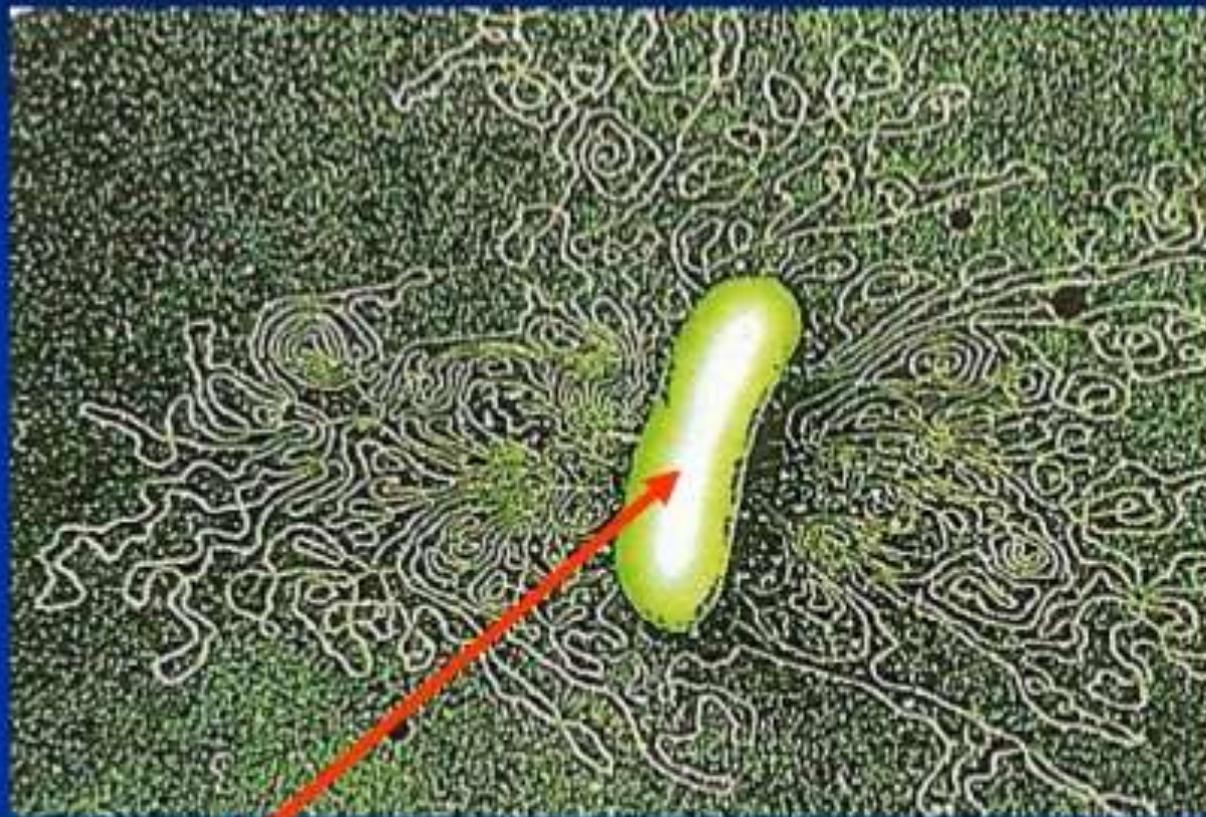


Localizzazione del DNA NEGLI EUCARIOTI

**Figura 6.42**

Dimostrazione del rapporto esistente tra lunghezza del DNA e dimensioni del suo «contenitore». Al centro della microfotografia elettronica (58.000 ingrandimenti) si osserva una particella virale del batteriofago T₄ che scoppiando ha liberato il DNA che era contenuto all'interno della testa del virus. L'immagine illustra la enorme sproporzione tra le dimensioni lineari del DNA e lo spazio estremamente piccolo in cui tale DNA deve essere impaccato. (Da Kleinschmidt *et al.* 1962; riportata da F. Stahl in «Il meccanismo della eredità», Zanichelli, 1972).

DNA di Escherichia coli



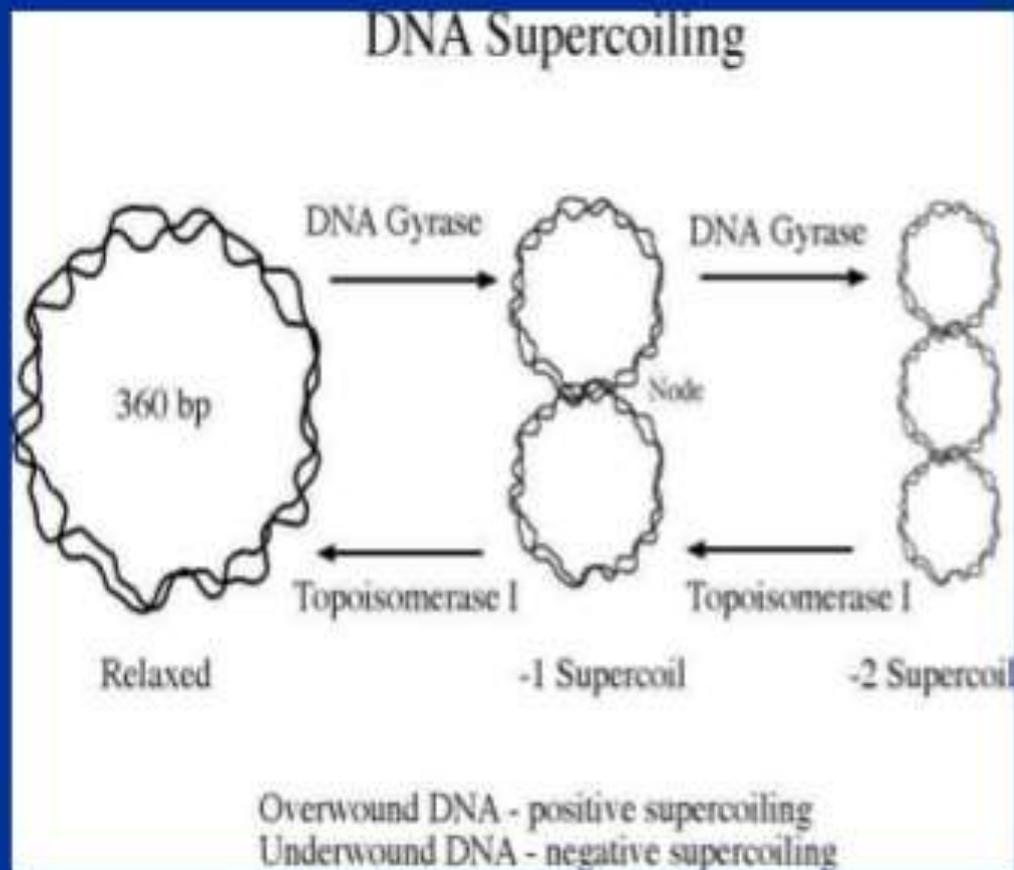
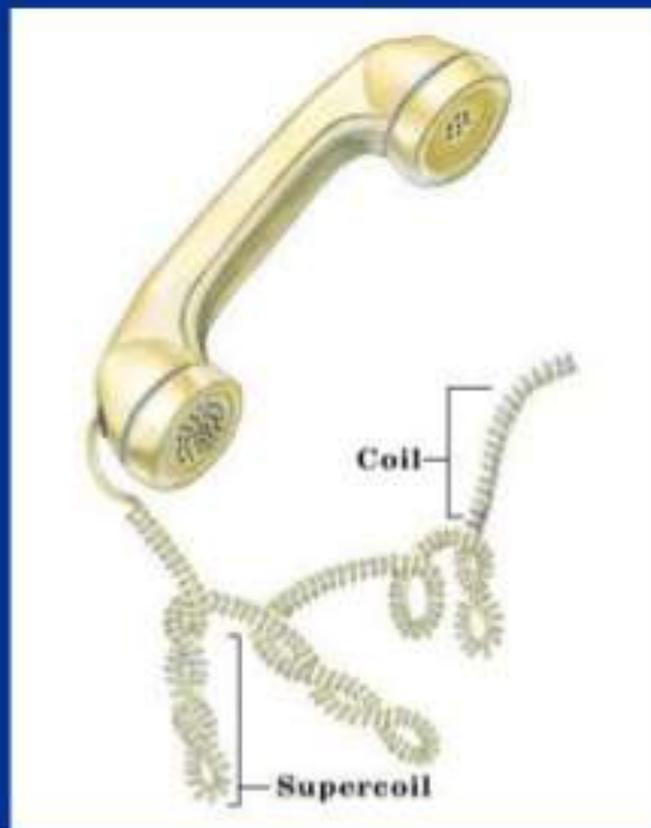
BATTERIO

DNA
(groviglio
filamentoso
esterno)

Nei batteri è presente una sola molecola di DNA, che distesa misura 1,5 mm, una lunghezza ben superiore ai 2 μm di diametro medio della cellula procariota!!

Come si sistema il DNA nella cellula batterica?

Il DNA batterico viene "superavvolto" dal cosiddetto apparato degli enzimi topoisomerasi, che viene così compattato mediante numerose torsioni



T4

$l = 60 \times 10^{-6} \text{ m}$
diametro del capside = $80 \times 10^{-9} \text{ m}$



**NELLA TESTA DEL VIRUS IL RAPPORTO ASSIALE DEL
DNA VIRALE DEVE ESSERE RIDOTTO DI ≈ 1000 VOLTE**

UOMO

NUCLEO DI UNA CELLULA SOMATICA UMANA

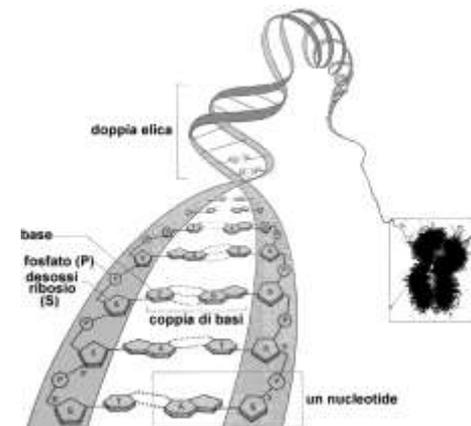
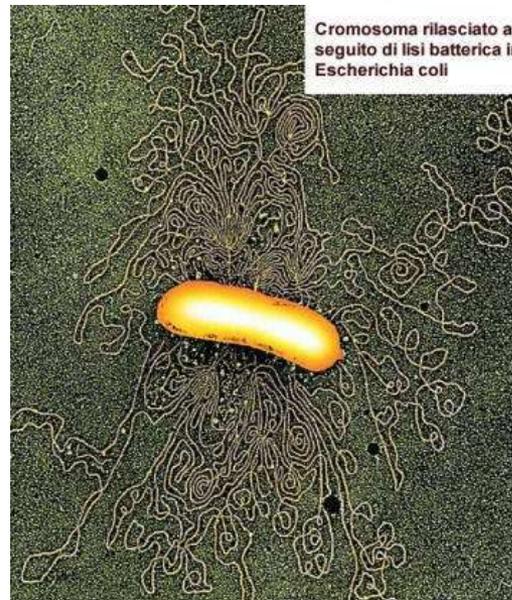
$D = 5 \mu\text{m}$

DNA IN FORMA COMPLETAMENTE DISTESA $\Rightarrow 1.7 \text{ m}$



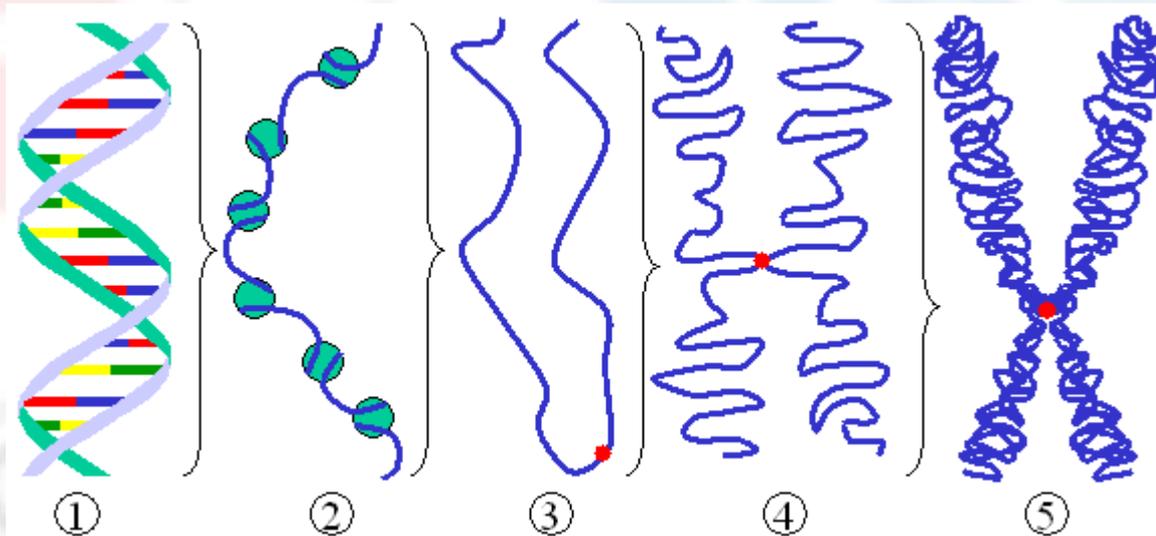
**350.000 VOLTE MAGGIORE DEL DIAMETRO DEL
SUO CONTENITORE**

**LA SUPERSPIRALIZZAZIONE DELLA
DOPPIA ELICA INTORNO AL
PROPRIO ASSE E' LA SOLUZIONE
UNIVERSALMENTE ADOTTATA PER
CONCENTRARE IL MATERIALE
GENETICO IN UN VOLUME
RELATIVAMENTE LIMITATO**



Cromatina

- La **cromatina** rappresenta la forma in cui gli acidi nucleici si trovano nel nucleo di una cellula eucariota.

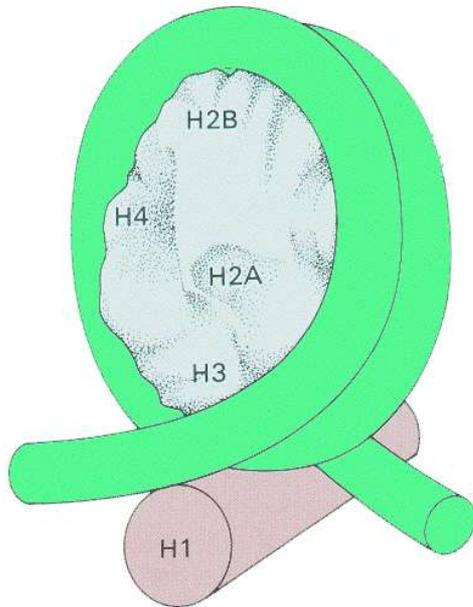


Cromatina

- **35% DNA- 60% proteine- 5% RNA**
- Le proteine si dividono in:
 - a) Istioniche:** basiche, ricche di cariche + (sono le proteine più conservate in natura)
 - b) Non istioniche:** funzione di controllo dell'espressione genica

PROTEINE ASSOCIATE AL DNA

ISTONICHE



**NON
ISTONICHE**

1. proteine che regolano la trascrizione genica
2. proteine che contribuiscono al mantenimento della struttura della cromatina
3. enzimi

NON ISTONI

- **comprendono tutte le altre proteine della cromatina**
- **mostrano una maggiore variabilita' tra tessuti e tra specie rispetto agli istoni**
- **rappresentano una frazione minoritaria della massa della cromatina rispetto agli istoni**
- **comprendono un maggior numero di proteine e percio' ogni proteina e' rappresentata in minore quantita' rispetto agli istoni**
- **comprendono funzioni implicate nella espressione genica e nella formazione di strutture di ordine superiore**

proteine che regolano la trascrizione genica

enzimi e fattori attivi nella trascrizione, replicazione, ricombinazione, riparazione del DNA e nella modificazione del DNA e delle proteine cromosomiche

proteine associate all'RNA

proteine che contribuiscono al mantenimento della struttura della cromatina o alla conversione della cromatina dallo stato decondensato allo stato altamente compattato

PROTEINE ISTONICHE

ABBONDANZA

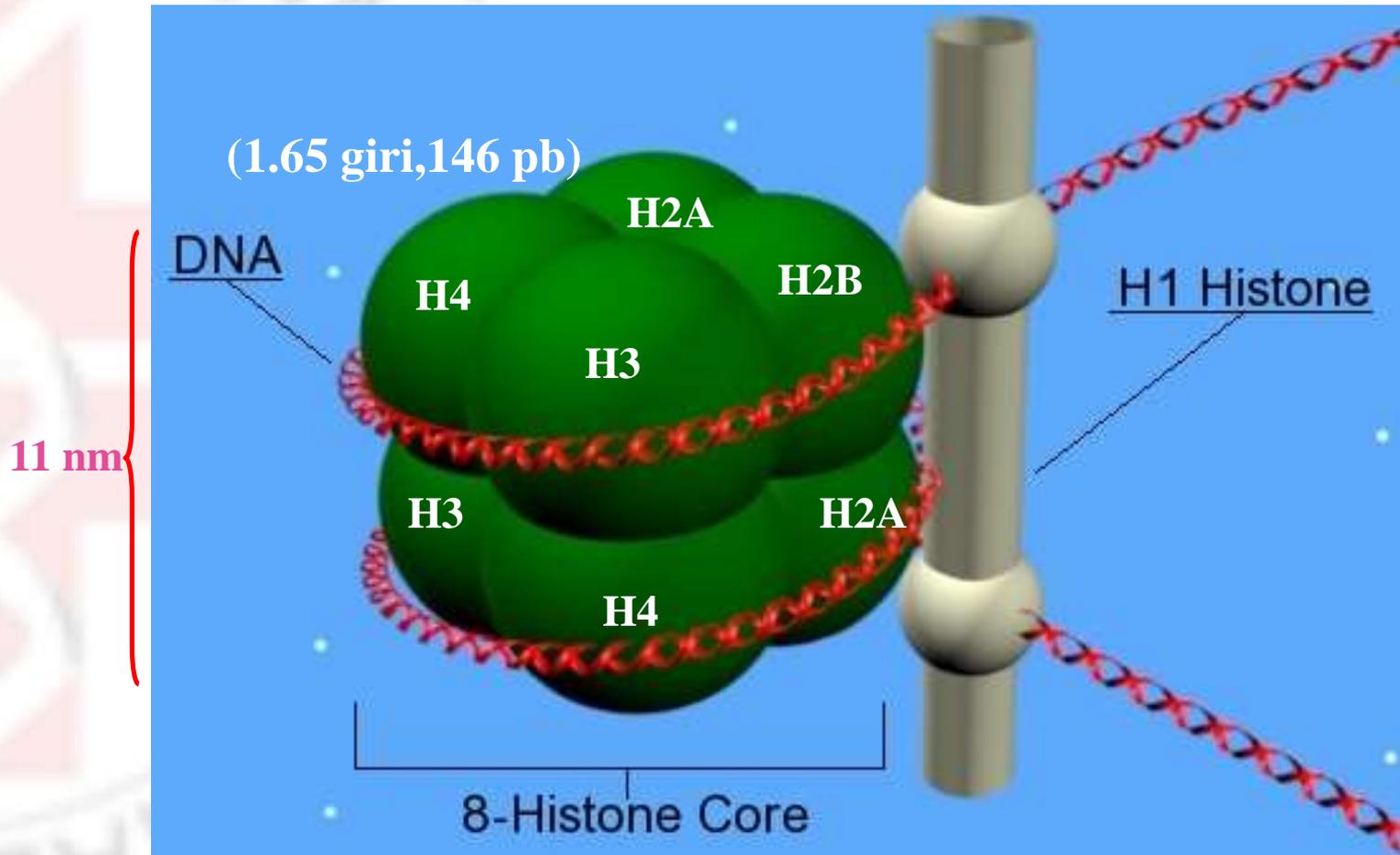
PICCOLA DIMENSIONE

FORTE CARICA POSITIVA



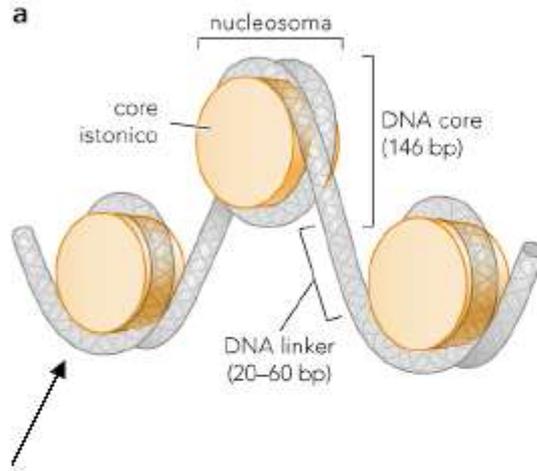
arginina e lisina

IL NUCLEOSOMA: L'UNITA' BASE DELLA CROMATINA

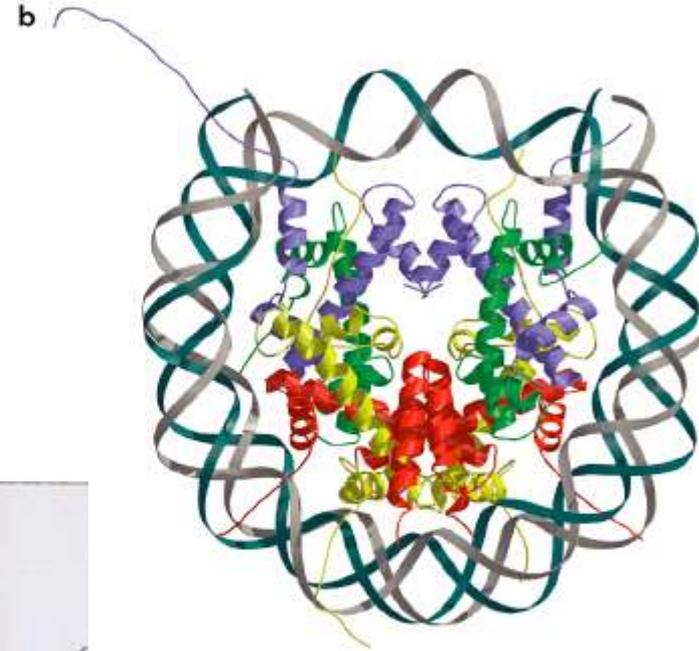
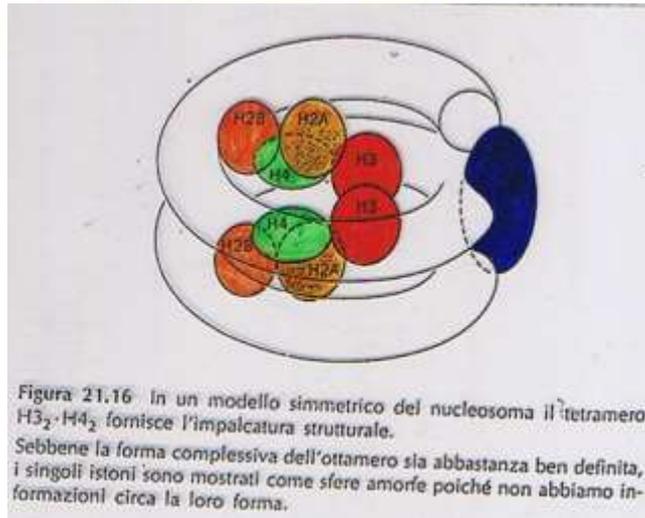


Ottamero istoni: 2 molecole di H2A, H2B, H3 e H4

I nucleosomi sono la componente fondamentale dei cromosomi

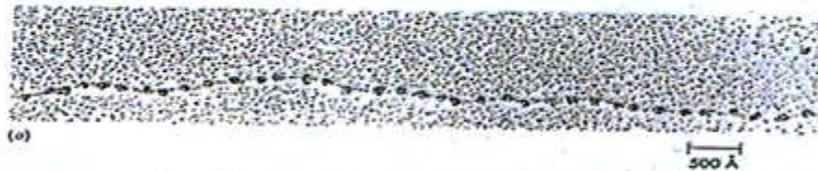


Avvolgimento di 1.65 volte



8 proteine istoniche (2x4): H2A (rosso), H2B (giallo), H3 (blu), H4 (verde)

In questo 1° livello di strutturazione della cromatina il rapporto di impaccamento del DNA è circa 6 e le fibre cromatiniche presentano un diametro di 10 nm



15

Figura 21.17 I superavvolgimenti del minicromosoma possono essere rilassati per generare una struttura circolare in cui la perdita degli istoni genera superavvolgimenti nel DNA libero.

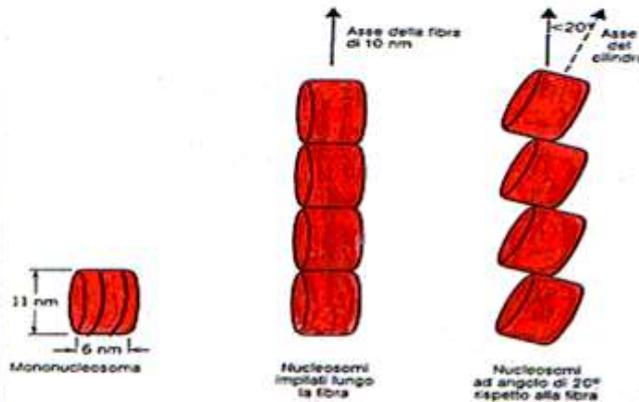


Figura 21.19 La fibra da 10 nm consiste di una serie di nucleosomi organizzati fianco a fianco impilati lungo la fibra o inclinati di meno di 20° rispetto all'asse.

Le fibre da 10 nm sono costituite essenzialmente da filamenti continui di nucleosomi. Talvolta tale filamento assume una conformazione più distesa in cui i nucleosomi sono visibili come una collana di perle.

si ottiene in condizioni di bassa forza ionica e non cede ad H₁

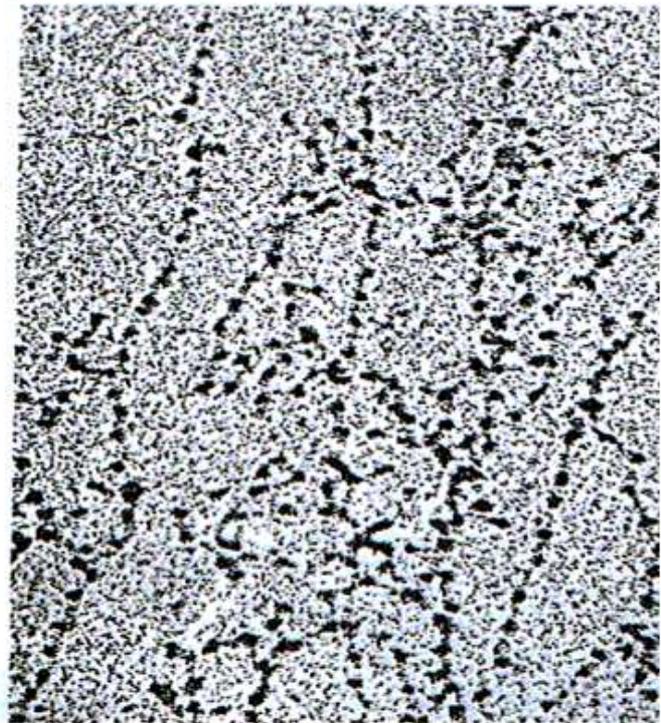
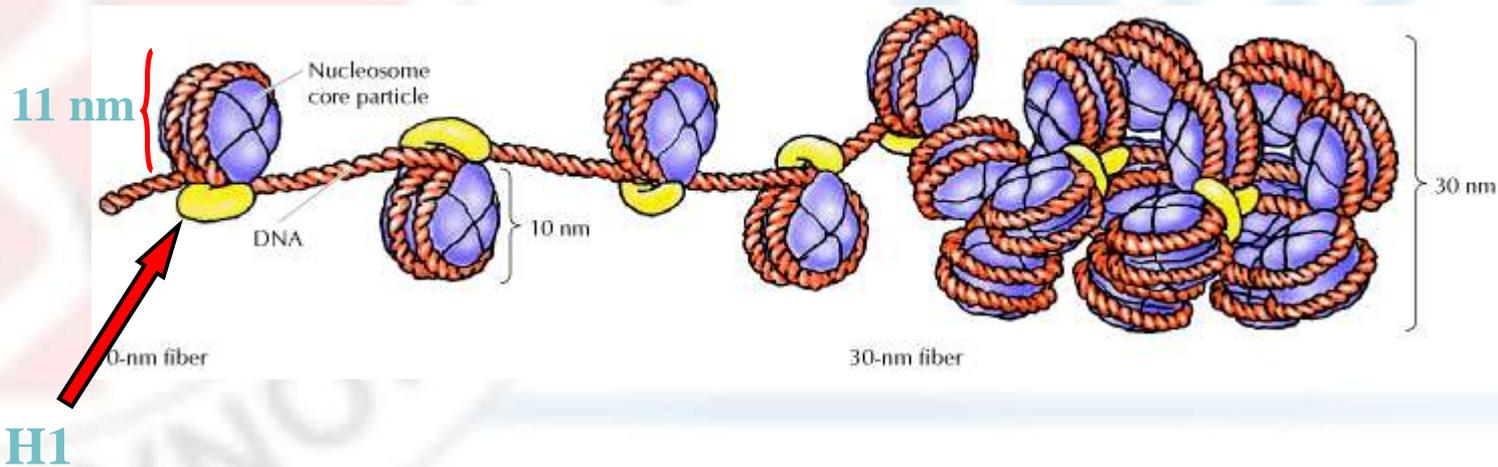
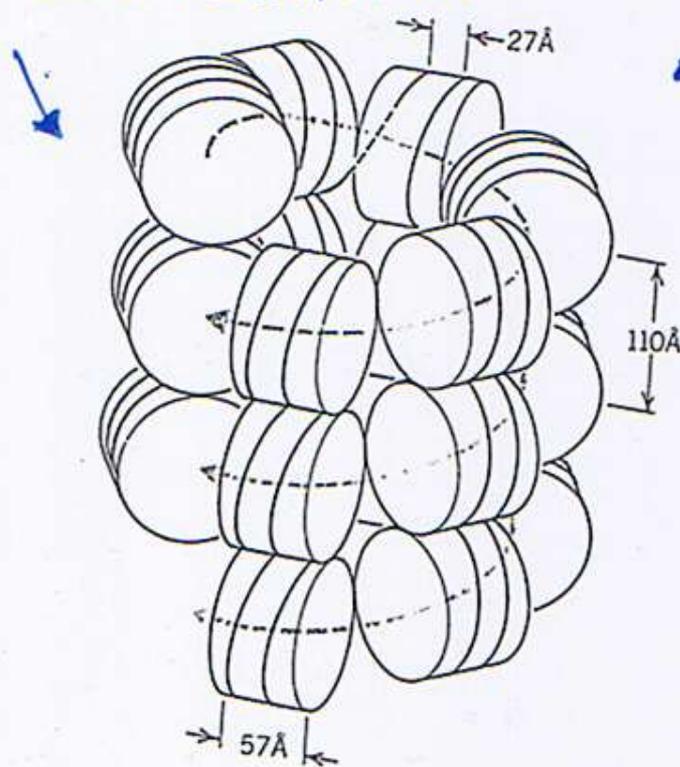


Figura 21.18 La fibra da 10 nm consiste di un nastro di nucleosomi, come si può vedere quando è nella condizione parzialmente distesa. Fotografia gentilmente fornita da Barbara Hamkalo.

- * L'istone H1 (di giunzione) ha la funzione di compattare ulteriormente i nucleosomi
- * Promuove la formazione della fibra solenoide da 30nm



QUESTA FIBRA RAPPRESENTA IL
20 LIVELLO DI STRUTTURAZIONE
DELLA CROMATINA



rapporto di
impaccamento:
40

(ogni μm lungo
l'asse della fibra
contiene 40 μm di
DNA)

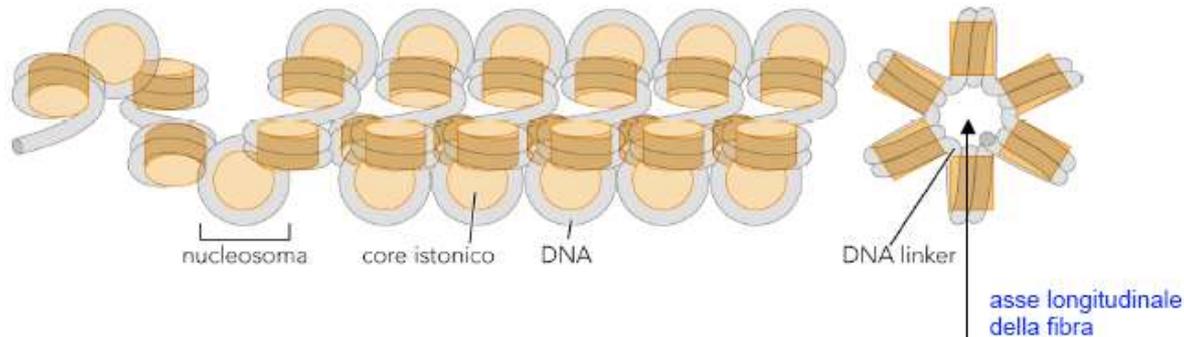
Figura 21.21 La fibra da 30 nm potrebbe avere una struttura elicoidale con 6 nucleosomi per giro, organizzati radialmente.

Per la sua formazione è necessario H1

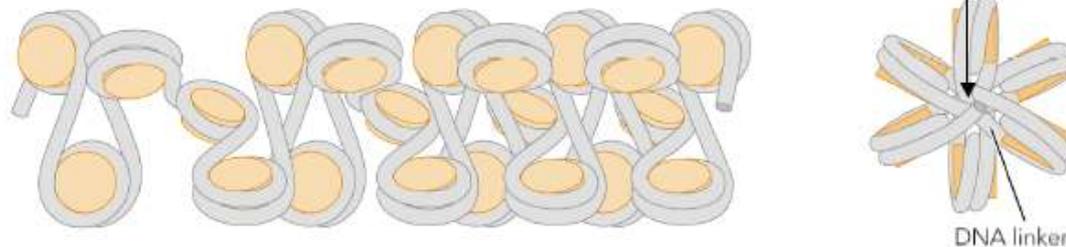
L'istone H1 media la formazione della fibra da 30 nm

L'aggiunta di H1 stabilizza una struttura cromatinica di ordine superiore: la **fibra da 30 nm**. Sono stati proposti due modelli alternativi per illustrare la formazione di questa struttura: i) modello a solenoide (supportato da diffrazione a raggi X e microscopia elettronica) e ii) modello a zig-zag.

a solenoide



b zig-zag



- Il DNA linker non attraversa l'asse longitudinale della fibra ed è relativamente inaccessibile

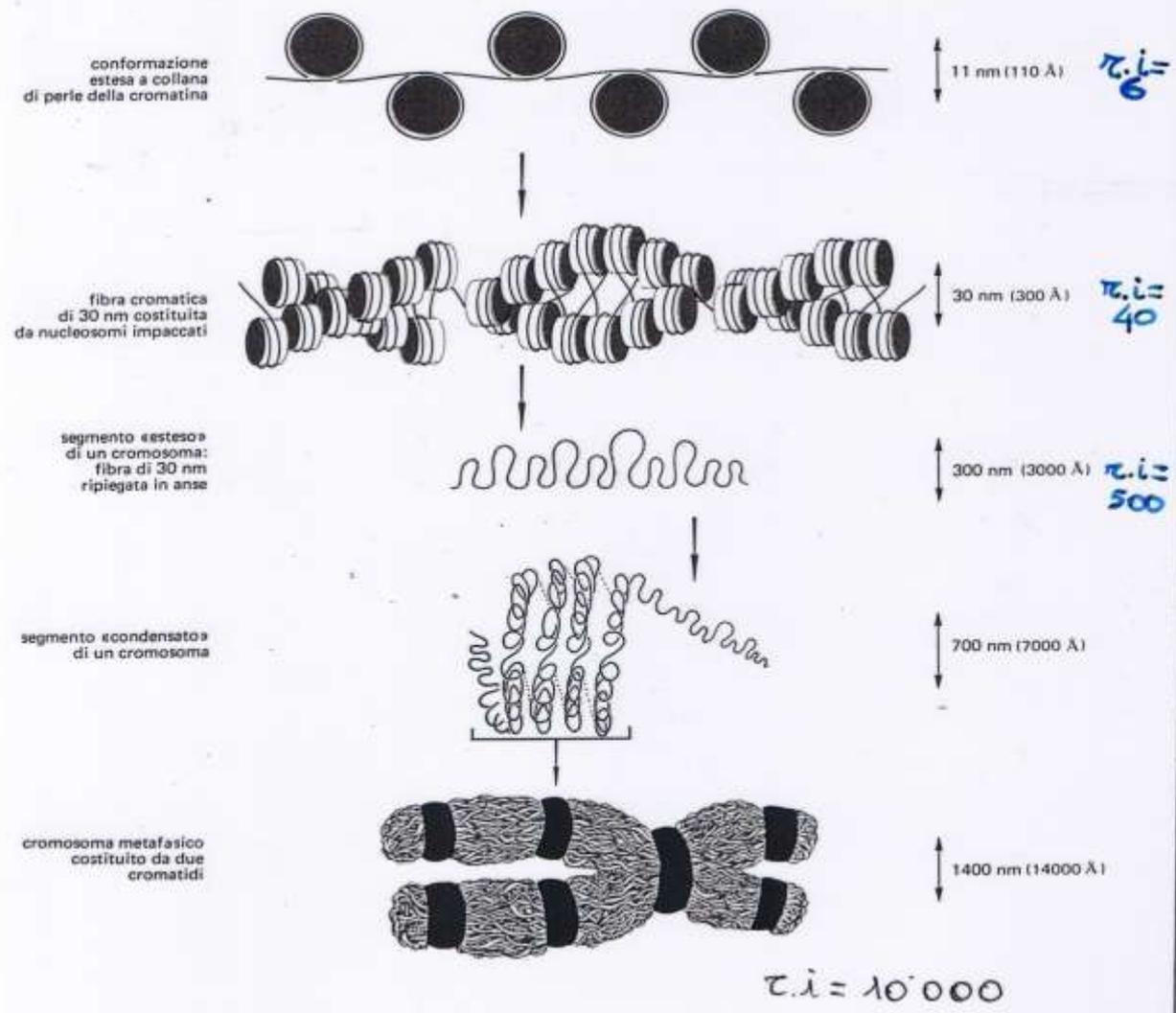
- Il DNA linker attraversa frequentemente l'asse longitudinale della fibra ed è più accessibile

concentrati in circa 100 nm. Un'ulteriore condensazione del DNA è assicurata dal ripiegamento su se stessa della fibra di 3.000 Å. Tale ripiegamento genera una struttura il cui spessore — pari a circa 7.000 Å — corrisponde, per l'appunto, a quello di un singolo cromatidio di un cromosoma metafasico.

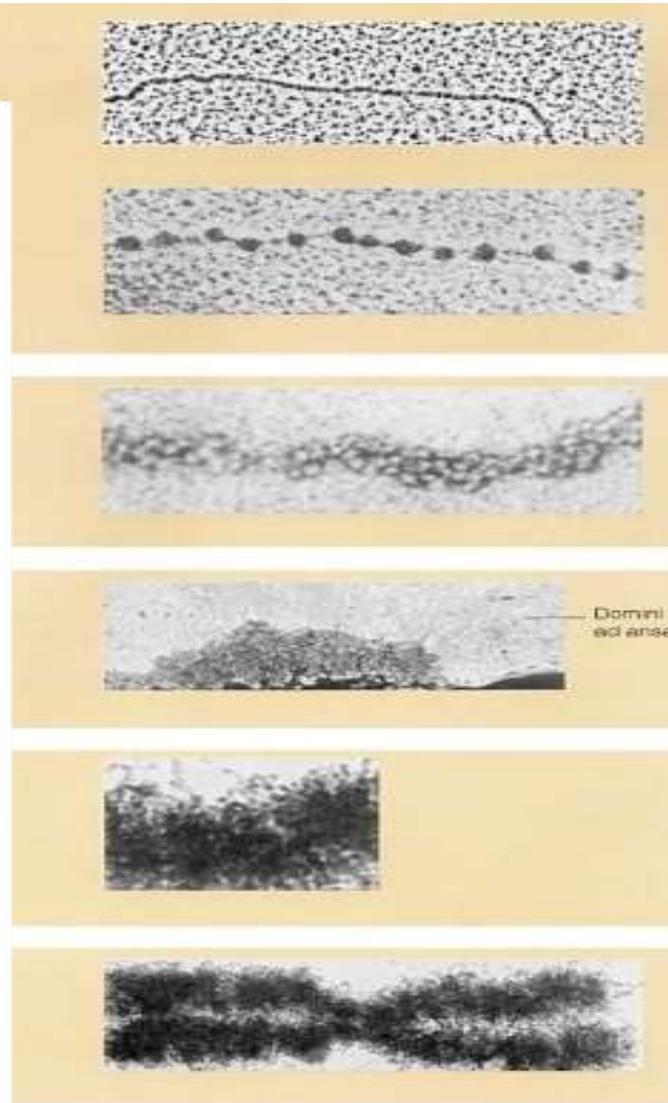
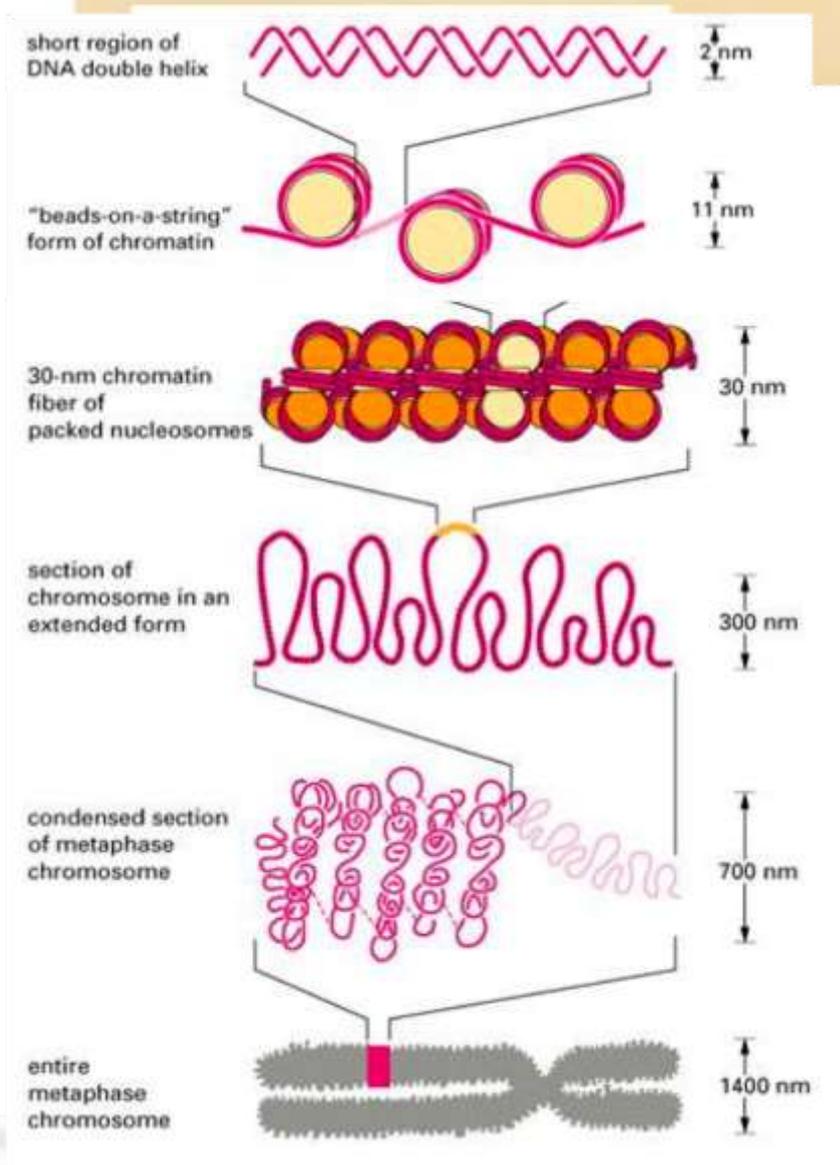
Il cromosoma corrisponde pertanto ad uno stato di massima organizzazione superelicoideale della fibra cromatinica elementare di ciascuno dei diversi segmenti di DNA tra i quali è ripartito il genoma di ogni specie.

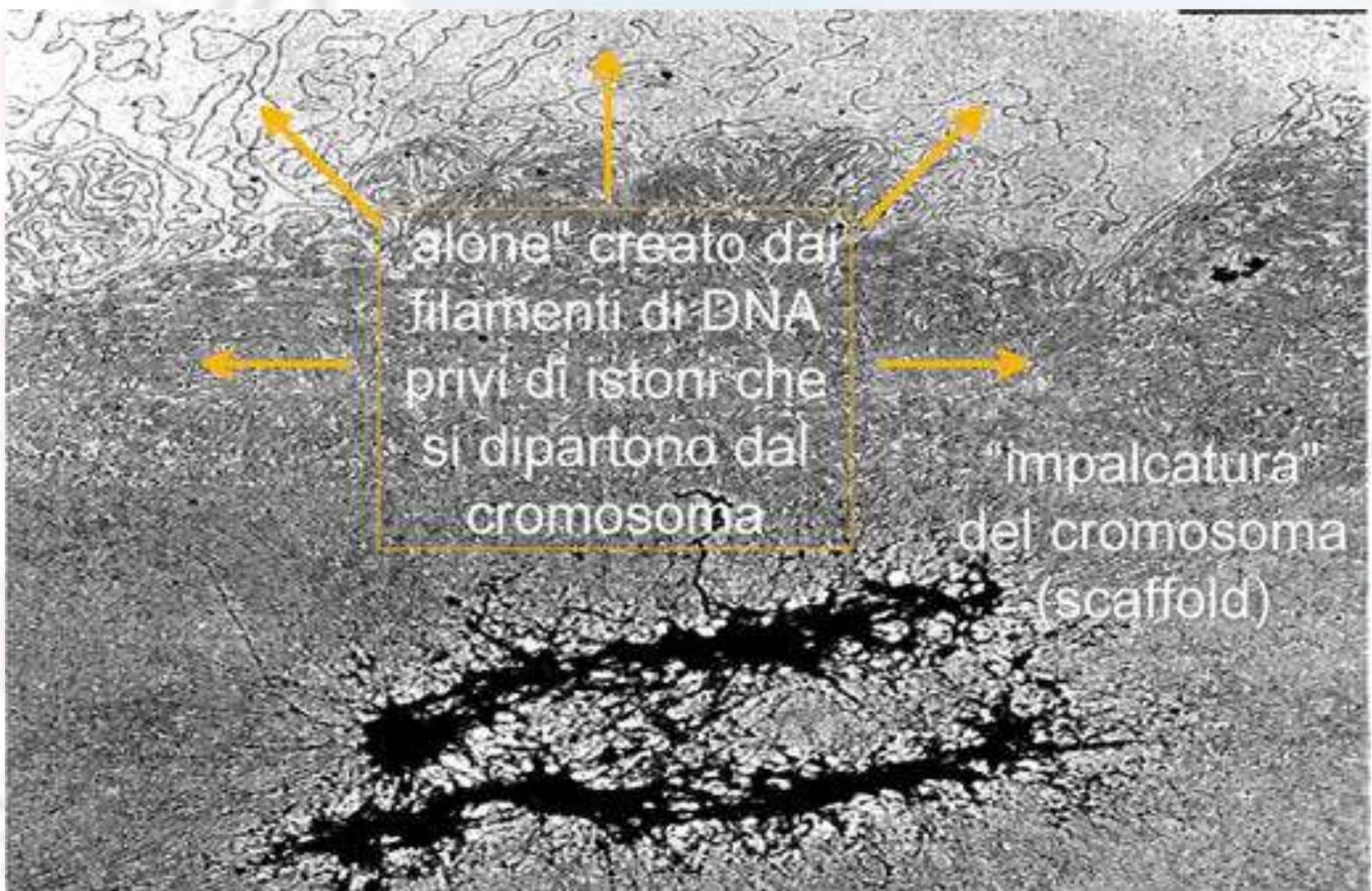
Uno schema riassuntivo che illustra i diversi livelli di complessità della organizzazione superelicoideale del DNA — dalla fibra cromatinica elementare fino al cromosoma metafasico — è illustrato nella fig. 6.61.

Figura 6.61
Livelli di organizzazione della fibra cromatinica elementare nei cromosomi eucariotici (spiegazione nel testo).



Stati di impacchettamento del DNA





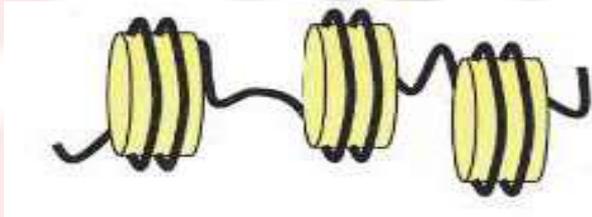
“alone” creato dai
filamenti di DNA
privi di istoni che
si dipartono dal
cromosoma

This electron micrograph shows a chromosome spread. A central, dark, branched structure represents the chromosome's scaffold. From this scaffold, numerous thin, wavy filaments of DNA extend outwards. A dashed yellow box highlights a region where these filaments branch off from the scaffold. Five yellow arrows point from this box to various parts of the DNA filaments. The background is a light gray, granular texture.

“impalcatura”
del cromosoma
(scaffold)

This label points to the dark, branched structure at the bottom of the image, which is the chromosome's scaffold. The scaffold consists of a central horizontal axis with several vertical branches extending upwards and downwards.

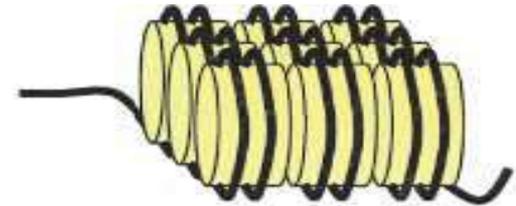
Eucromatina vs Eterocromatina



Cromatina svolta



**trascrizionalmente
accessibile**



Cromatina condensata

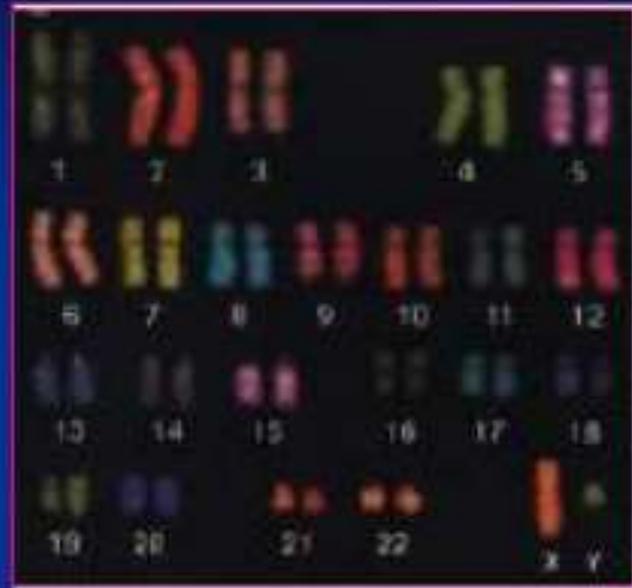


trascrizionalmente repressa

Fattori che determinano lo stato di condensazione della cromatina:

- **Modificazioni istoniche**
- **Metilazione del promotore**

Il numero di cromosomi presente in una cellula è detto cariotipo



Cariotipo dell'uomo: 22 coppie di Autosomi + una coppia di eterocromosomi

Il numero dei cromosomi solitamente varia al variare della specie

SPECIE	Numero di CROMOSOMI
UOMO (HOMO SAPIENS)	46
CAVALLO (EQUUS CABALLUS)	66
CANE (CANIS FAMILIARIS)	78
TOPO (MUS MUSCULIS)	40
RANA (RANA ESCULENTA)	26
DROSOFILA (DROSOPHILA MELANOGASTER)	8

SNPB

Sperm Nuclear Basic Proteins

Proteine altamente basiche, che sostituiscono gli istoni durante l'ultima fase della spermatogenesi determinando un corretto compattamento della cromatina negli spermatozoi.

H-TYPE

- Sono correlabili agli istoni presenti nei nuclei delle cellule somatiche.
 - Sono stati identificate principalmente in organismi ancestrali.
- Sostituiscono parzialmente (negli echinodermi) o completamente (nei tunicati) i loro omologhi somatici.
 - Presentano alto contenuto di Arg e Lys

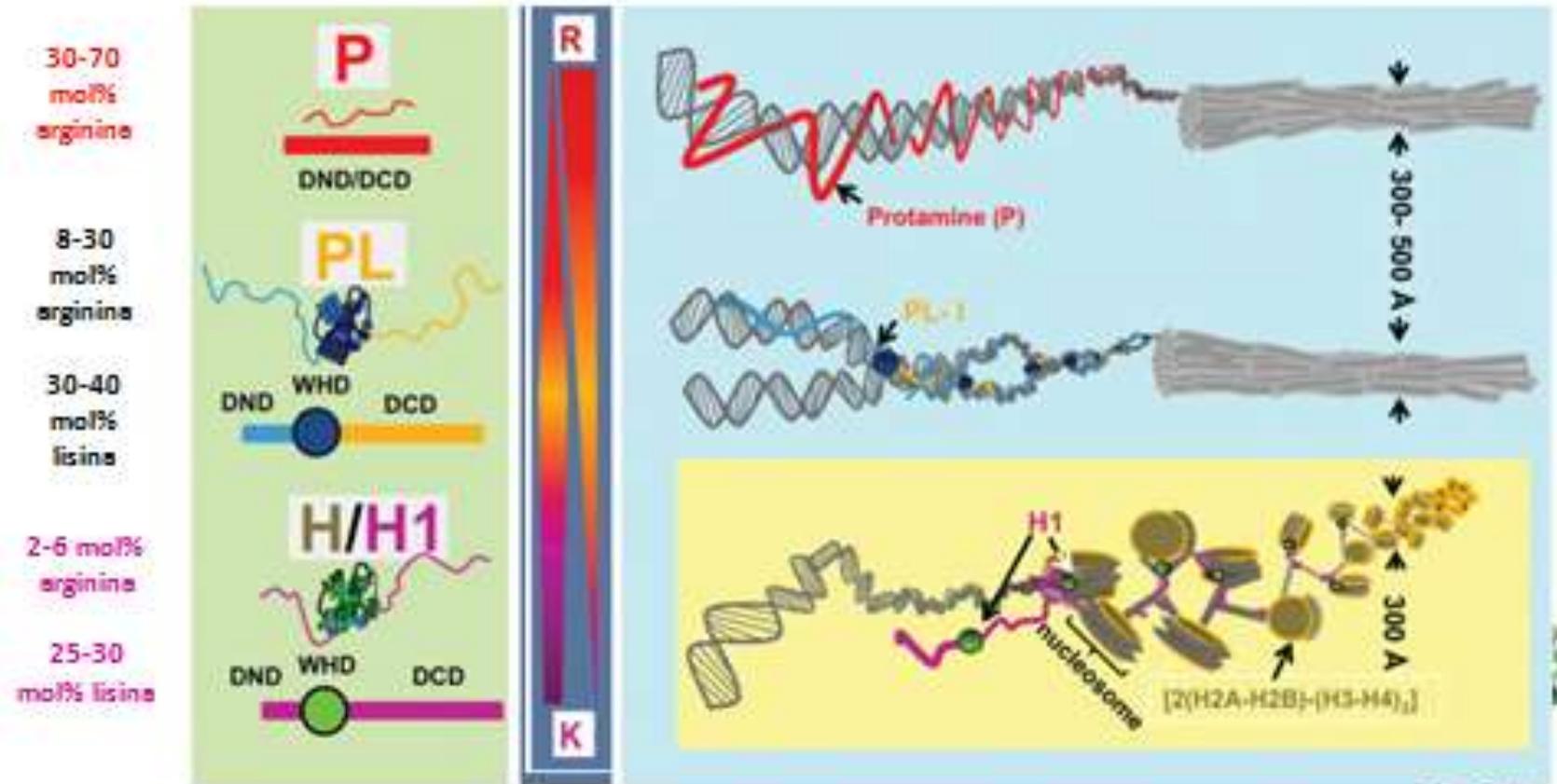
PL-TYPE

- Ricontrate per la prima volta nei molluschi bivalvi, successivamente sono state studiate ampiamente in molte specie del regno animale.
 - Contengono generalmente da 100 a più di 200 amminoacidi.
 - Hanno un peso molecolare compreso tra i 10000 e i 200000 Da.
 - Caratterizzate da un contenuto di 35-50% di Arg e Lys

P-TYPE

- Sono state riscontrate nella maggior parte degli organismi, dai pesci ai primati.
- Contengono dai 50 ai 110 residui aminoacidici, di cui il 70 mol % sono Arg.
 - Hanno un peso molecolare compreso tra i 4 e i 10 kDa.

SNBP



PROTEINE ASSOCIATE AL DNA BATTERICO

- ENZIMI DELLA TRASCRIZIONE E REPLICAZIONE
- PROTEINE DI REGOLAZIONE (CON FUNZIONI \cong AD ALCUNI NON ISTONI
- PROTEINE SIMILI AGLI ISTONI



RUOLO ANCORA OSCURO

AUMENTANO IL GRADO DI SPIRALIZZAZIONE DEL DNA

SEBBENE QUESTE PROTEINE SI LEGHINO AL DNA MENO FORTEMENTE RISPETTO AGLI ISTONI, DUE DI QUESTE, HU E IHF SONO IN GRADO IN VITRO DI ORGANIZZARE IL DNA IN STRUTTURE SIMILI AI NUCLEOSOMI ANCHE SE NON CI SONO EVIDENZE DIRETTE CHE QUESTE PROTEINE SVOLGANO LA STESSA FUNZIONE NELLE CELLULE. «SPERIMENTI CON ENDONUCLEASI NON HANNO DIMOSTRATO NESSUNA PERIODICITA' NEL DNA BATTERICO COME PER LA STRUTTURA DEI NUCLEOSOMI.

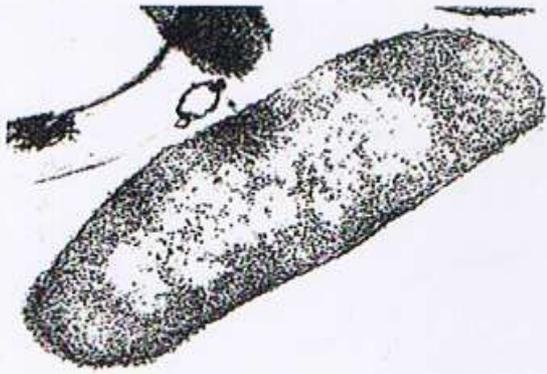


Figura 20.4 Una sezione sottile mostra il nucleotide batterico come una massa compatta al centro della cellula.
fotografia gentilmente fornita da Jack Griffith.

Supercoiled loops and binding proteins in bacterial nucleoid

Figure 18-6 The bacterial genome consists of a large number of loops of duplex DNA (in the form of a fiber), each secured at the base to form an irregular structure of DNA.



There are ~100 supercoiled loops per genome; each consists of ~40 kb.

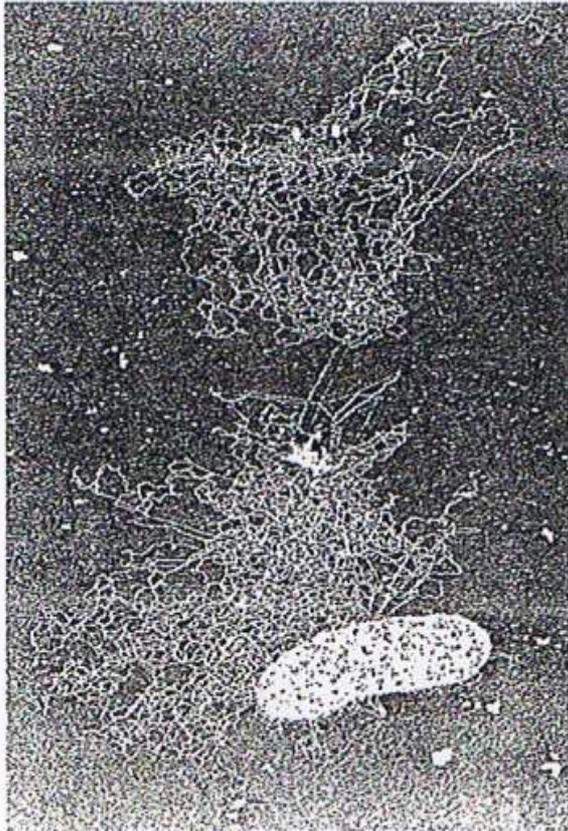


Figura 20.5 Il nucleotide fuoriesce dalla cellula liscata di *E. coli* formando

Quando le cellule di *E. coli* vengono lisate, le fibre di DNA sono rilasciate in forma di anse

Il DNA di queste anse non è nella forma estesa tipica di un duplex libero, ma si trova ripiegato in uno stato + compatto presumibilmente per via dell'interazione con alcune proteine.

aziologia

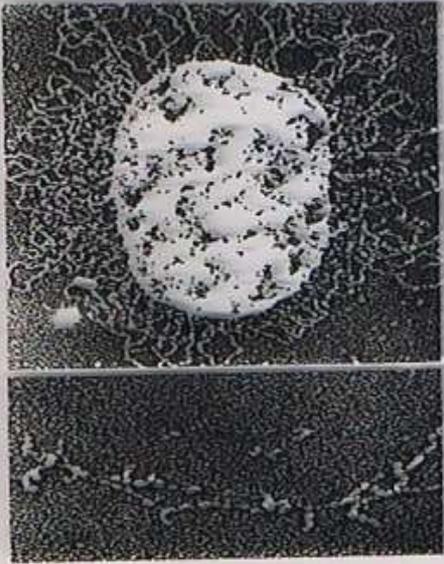


Figura 6.53
 Una cellula di *Escherichia coli* sottoposta a lisi rapida sullo stesso supporto metallico utilizzato per l'osservazione del DNA al microscopio elettronico. Il materiale estruso dalla cellula, contenente il DNA, ha un tipico aspetto "a coltana di pecora". Le fibre che protrudono dalla cellula "aperta" hanno uno spessore di 120 Å (invece di 20 Å, come nel caso del DNA nudo nella figura 6.51). La struttura della fibra elementare è illustrata in maggior dettaglio nella parte inferiore della figura: la fibra è costituita da una serie di formazioni sferoidali unite tra loro da segmenti di DNA nudo (di 20 Å di spessore). (Da D. Griffith in *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.*, 73: 56, 1976)

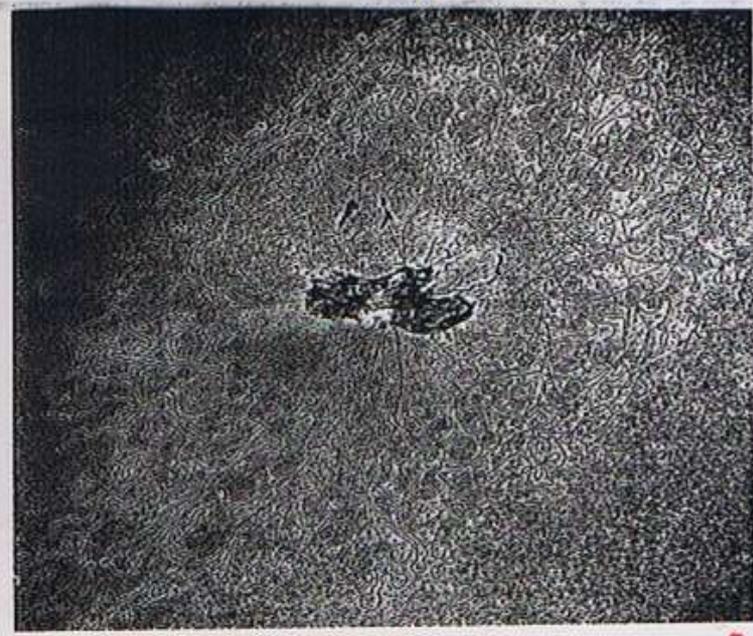


Figura 6.51
 Microfotografia al microscopio elettronico di un nucleotide estruso da una cellula di *Escherichia coli* (v. testo). Il cromosoma appare costituito da DNA "nudo" di 20 Å di diametro (come previsto dal modello di Watson e Crick) ripiegato in un sistema di anse multiple ancorate ad un frammento della membrana plasmatica del batterio. In queste condizioni non si ravvisano proteine associate al DNA. (Da Worcel in *Cold Spring Harbor Symposia for Quantitative Biology*, 1974).

0,15M NaCl
 Fissato dopo l'apertura degli involucri cellulari

1M NaCl

DNA SPIRALIZZATO
 REGOLARMENTE INTERNO AD
 APOLOGHI DI PROTEINE
 BASICHE

PERDITA DELLE PROTEINE
 BASICHE DURANTE
 L'ESTRUSIONE DEL
 NUCLEOIDE

2 e 4 tratti organizzati
 separatamente dal cromosoma
 e dal DNA

REGALITA' DI SUPERSPIALIZZAZIONE
 DEL DNA ALL'INTERNO DI CIASCUN
 DOMINIO SUPERELICOIDALE

RIPARTIZIONE DEL DNA CIRCONTO
 IN UNA SERIE DI DOMINI
 SUPERELICOIDALI INDIPENDENTI

LA STRUTTURA PRIMA DI PROTEINE
BASICHE COMPRENDE 2 LIVELLI INDIPENDENTI
DI COMPLESSITA' CONFORAZIONALE DEL
CROMOSOMA BATTERICO

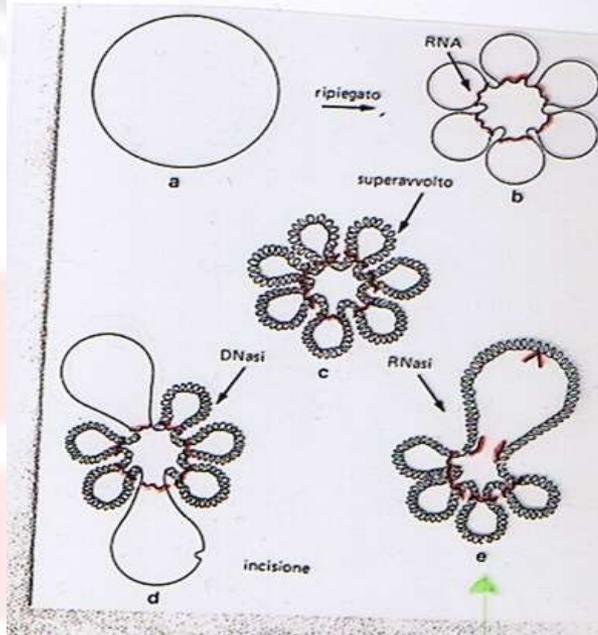


Figura 6.52
Modello di segregazione del cromosoma circolare di *Escherichia coli* in una serie di domini strutturali indipendenti.
In (a): cromosoma circolare decontratto (1200 nm di lunghezza) di circa 350 nm di diametro. In (b): la doppia elica è ripiegata di circa 50 anse delimitate ciascuna da una giunzione di RNA (solo 6 anse sono rappresentate qui per semplicità grafica). In (c): il DNA di ogni ansa è superavvolto con un avvolgimento sinistrorso. Il modello illustrato è a due dimensioni: un modello a tre dimensioni può essere ottenuto ripiegando alcuni dei domini superelicaoidali al di sopra ed altri al di sotto del piano del foglio. Il trattamento del nucleo di estrusi con l'enzima ribonucleasi, che degrada le giunzioni di RNA, determina la coalescenza di più anse senza tuttavia modificare il grado di superavvolgimento del DNA nelle anse che sono confluite. L'incisione (con DNAsi) di uno solo dei due filamenti della doppia elica in una singola ansa provoca una decontrazione (perita della superelicità (che rimane tuttavia confinata (-segregata-) nella sola ansa implicata, fintantoché le anse sono separate l'una dall'altra dalle giunzioni DNA-RNA.

Le giunzioni RNA-DNA bloccano la libera rotazione continua del frammento inciso intorno al filamento intatto impedendo che un taglio retrogrado in un qualsiasi punto del DNA provochi la disarticolazione dell'intero cromosoma.

IL TRATTAMENTO CON RNASI non ha effetto sulla superavvolgimento del DNA

Proteine histone-like in baHezi

		moluc.	const.
<u>HU</u>	H2B	(40.000/aff.)	sub. α e β (9.000 A)
H	H2A	30.000	2 sub. ident. (28.000 A)
<u>IHF</u>		-	sub. α (10.500 A)
<u>H1</u>		10.000	sub. β (9.500 A)
HLP1		29.000	sub. (15.000 A)
<u>P</u>	protamine	-	mon. (17.000 A)
			sub. (3.000 A)

- **HU** AVVOLGIMENTO DEL DNA
STIMOLAZIONE DELLA REPLICAZIONE
- H RICONOSCIUTO DA ANTICORPI ANTI H2A
PUÒ INIBIRE LA REPLICAZIONE
- **IHF** PARTECIPA ALL'IMPACCAIMENTO DEL DNA
STIMOLA LA RICOMBINAZIONE
- H1** PUÒ PARTECIPARE ALL'IMPACCAIMENTO
PREFER. INTERAGENDO CON TRATTI DI DNA PIEGATI
- HLP1 SCOMOSCIUTA
- P** COMPOSIZIONE AA SIMILE A PROTAMINE

DINOFLLAGELLATI [Struttura citopl. eucarioti]
CROMOSOMI SIMILI A PROC.



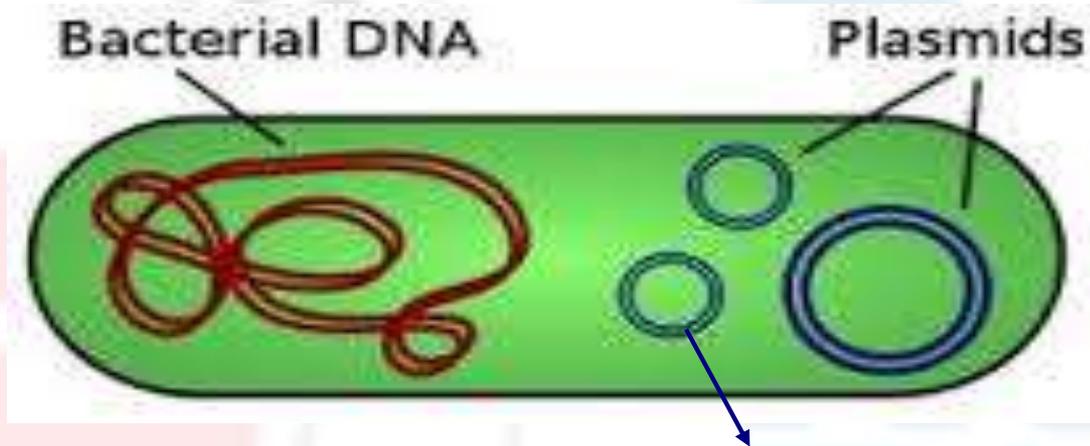
Figura 6.54
Minicosoma -a collana di perle- derivante
dalla interazione *in vitro* del DNA circolare
decontratto del virus oncogeno SV 40 e le
proteine HL-II. (Da J. Yaniv-Rouviere, in *Cell*,
1982).

HL-II = HU

DNA CIRCOLARE NUDO → STRUTTURA A
NUCLEOSOMI ⊙ SSTITUITI DA 275 bp AVVOLTE
⊖ INTORNO AD UN NUCLEO DI 8 MOLECOLE DI HL-II

Plasmids: vehicles of recombinant DNA

Bacterial cell



Non-chromosomal DNA

Replication: independent of the chromosome

Many copies per cell

Easy to isolate

Easy to manipulate

Batteri: DNA extracromosomico

Plasmidi

- DNA a forma circolare in grado di autoduplicarsi
- con geni per resistenza agli antibiotici, sintesi di enzimi, produzione di tossine, altri caratteri
- Molto importanti per il clonaggio



Duplicazione del DNA

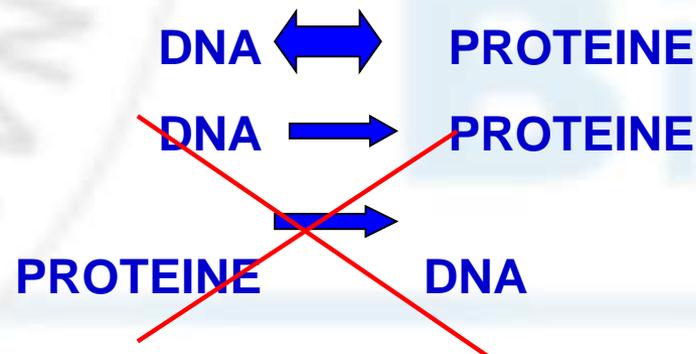
LA REPLICAZIONE DEL DNA

SCOPERTA DELLA STRUTTURA DELLA DOPPIA ELICA DEL DNA
COMPLEMENTARIETA' DELLE BASI

BASE PER LA REPLICAZIONE

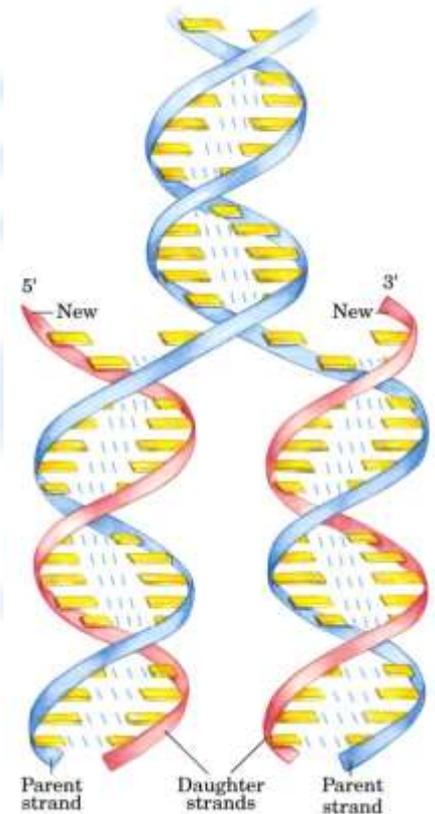
DNA =DEPOSITARIO DELL'INFORMAZIONE GENETICA

Prima della scoperta della struttura delle proteine e degli acidi nucleici



“Non è sfuggito alla nostra attenzione che lo specifico accoppiamento delle basi suggerisce un possibile meccanismo di duplicazione del materiale genetico”

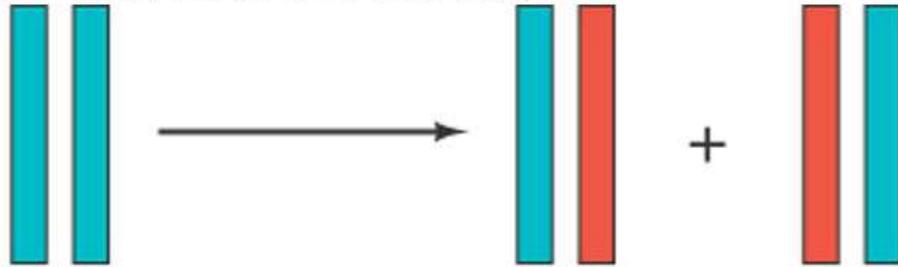
Watson & Crick, Nature, 1953



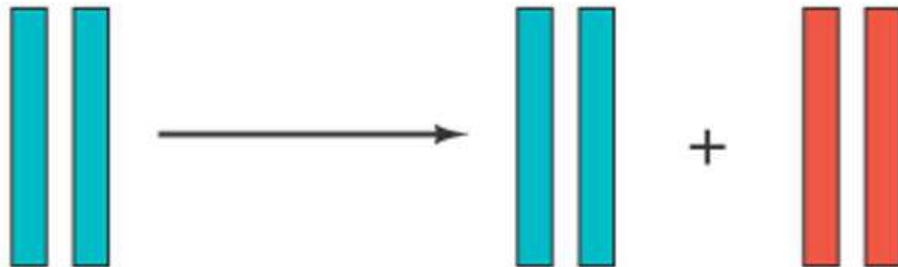
REPLICAZIONE DEL DNA

SINTESI DI MOLECOLE FIGLIE UGUALI A QUELLA PARENTALE

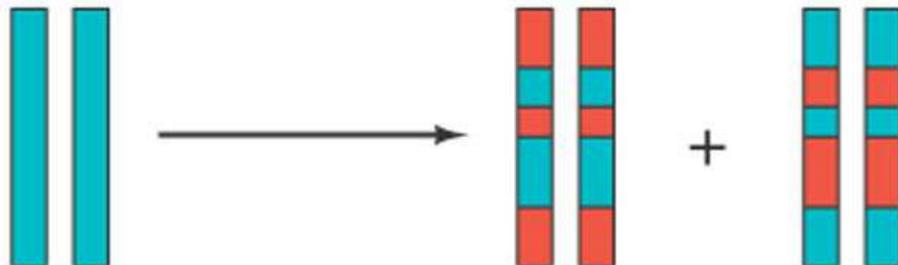
(a) Semiconservative

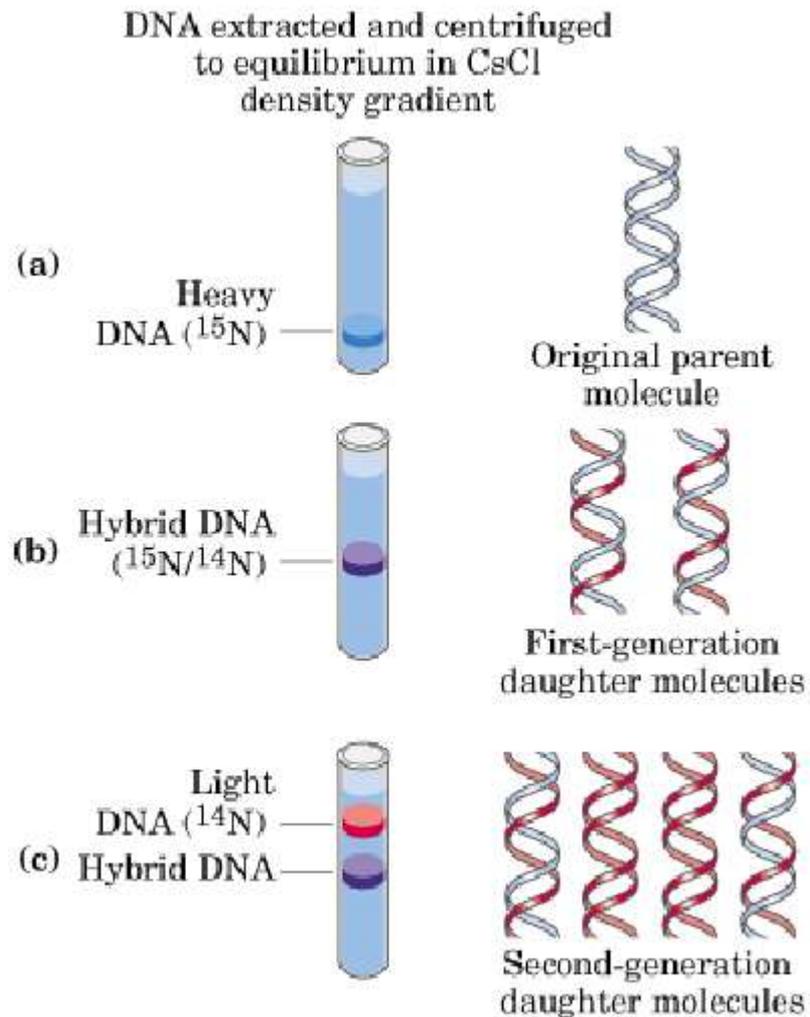


(b) Conservative



(c) Dispersive





Esperimento di Meselson-Stahl

a) Cellule coltivate per varie generazioni in un terreno contenente solo N pesante (^{15}N), per cui, dopo centrifugazione per gradiente di densità, si ottiene una sola banda (blu) di DNA

b) Cellule coltivate in ^{15}N sono trasferite in un terreno contenente solo N leggero (^{14}N). Dopo centrifugazione, la banda di DNA (viola) sedimenta in una zona più alta della precedente essendo un ibrido ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)

c) Continuando la replicazione per un'altra generazione, si producono due DNA ibridi bande di DNA (banda viola) e due DNA leggeri (banda rossa)

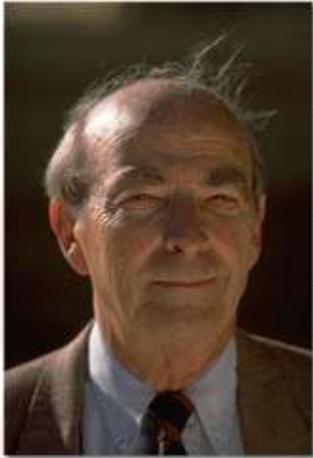
Questo esperimento conferma l'ipotesi della **replicazione semiconservativa**, in base alla quale durante la replicazione le nuove molecole di DNA sono formate da un filamento parentale ed uno neosintetizzato

LA REPLICAZIONE DEL DNA:

- **Semiconservativa:** un filamento del DNA figlio deriva dal DNA progenitore
- Ha inizio in un sito di *origine*
- **bidirezionale:** prende il via da un punto di origine e procede in entrambe le direzioni
- avviene sempre in ***direzione 5' → 3'*** ed è ***semi-discontinua***
 - le eliche del DNA devono essere mantenute separate durante la duplicazione
 - la sintesi del DNA necessita di un primer di RNA
- Utilizza delle ***DNA polimerasi***
- Utilizza numerosi altri enzimi e fattori proteici

ATTIVITA' E FUNZIONI DELLE DNA POLIMERASI DI E.COLI

Procarioti (E.coli)	Numero della subunità	Funzioni
Pol I	1	Rimozione dell'innesco, riparazione del DNA
Pol II	1	Riparazione del DNA
Pol III core	3	Replicazione
Pol III oloenzima	9	Replicazione
Pol IV	1	Riparazione del DNA, sintesi delle translesioni (TLS)
Pol V	3	TLS



Arthur Kornberg

Scoprì la polimerasi I ed il meccanismo della sintesi del DNA, lavorando con *Escherichia coli*

Sono necessari quattro componenti:

1. **dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP**
(deossribonucleoside 5'-trifosfato)
(zuccheri-base + 3 fosfati)
2. **DNA stampo**
3. **DNA polimerasi I (chiamata anche *enzima di Kornberg*)**
(DNA polimerasi II e III scoperte successivamente)
4. **Mg²⁺ (ottimizza l'attività della DNA polimerasi)**

Le DNA polimerasi sono incapaci di separare le due eliche del DNA:

Soluzione ==> ELICASI

Le DNA polimerasi sono incapaci di iniziare la sintesi di DNA "ex novo", ma richiedono un "innesco" (*primer*) di DNA o RNA:

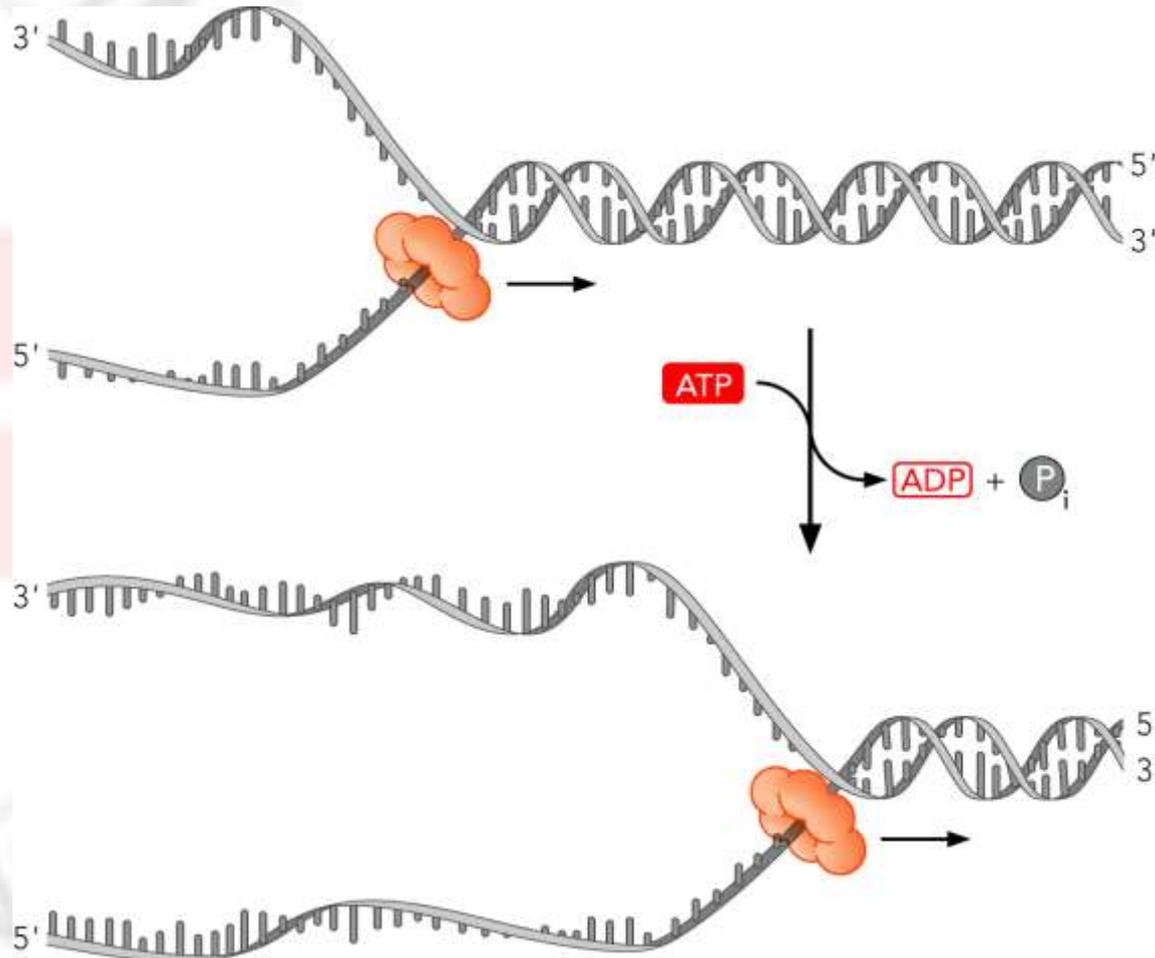
Soluzione ==> PRIMASI

Le due eliche del DNA duplex sono antiparallele, ma le DNA polimerasi sintetizzano in DNA solo in direzione 5'→3':

Soluzione ==> REPLICAZ. DISCONTINUA

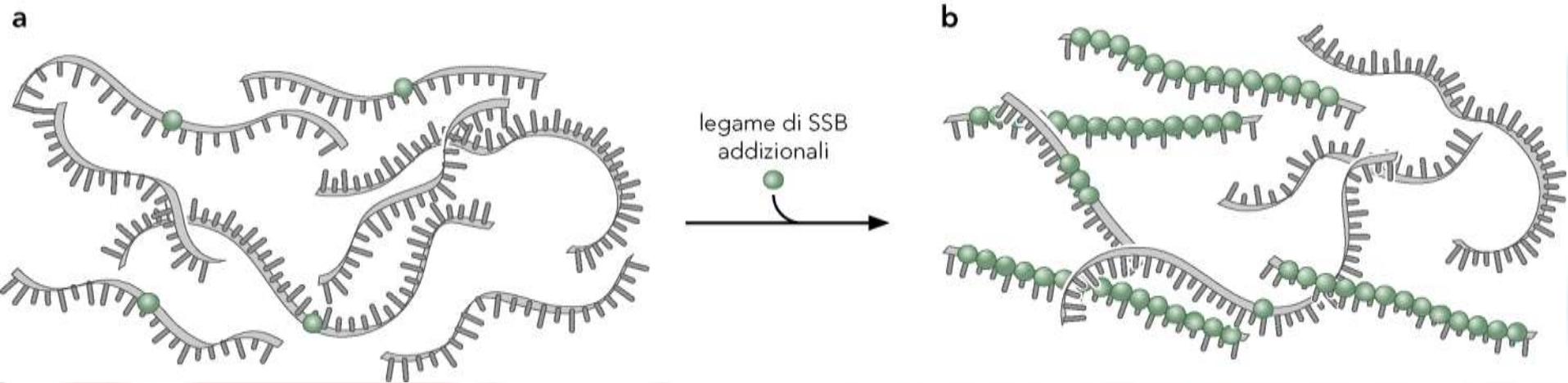
- le eliche del DNA devono essere mantenute separate durante la duplicazione

LA DNA ELICASI APRE LA DOPPIA ELICA PER FORMARE LA FORCA REPLICATIVA



LE DNA ELICASI SONO PROCESSIVE POSSONO AVERE UNA POLARITA' SIA 5' → 3' SIA 3' → 5'

PROTEINE CHE SI LEGANO AL SINGOLO FILAMENTO STABILIZZANO LA SUA STRUTTURA PRIMA DELLA REPLICAZIONE

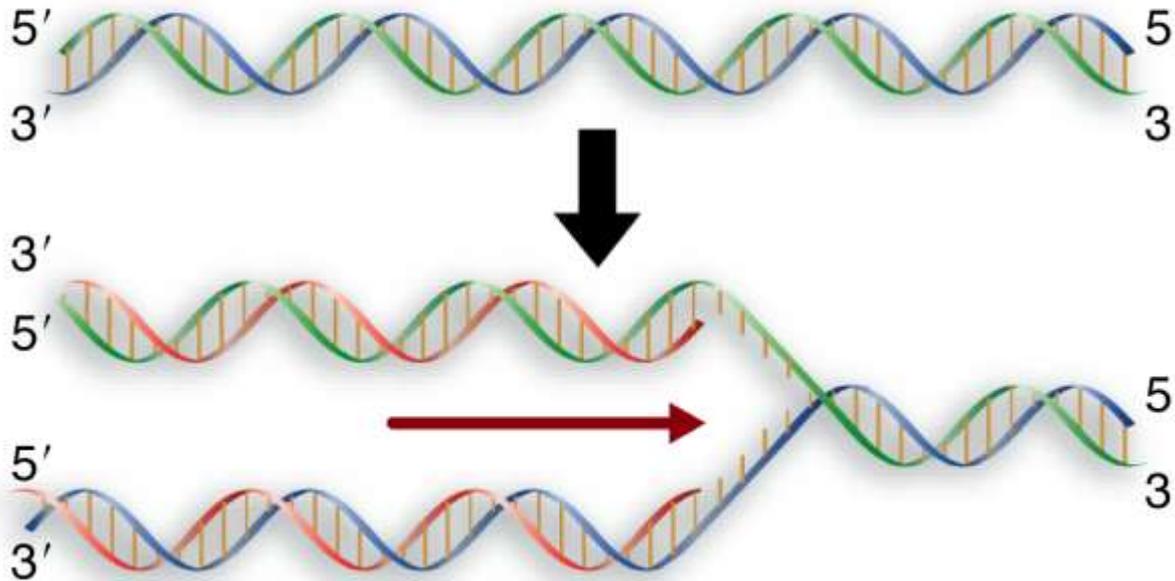


IL LEGAME COOPERATIVO ASSICURA CHE IL SINGOLO FILAMENTO UNA VOLTA CREATO DALLE ELICASI VENGA RAPIDAMENTE RICOPERTO DALLE SSB

**CONFORMAZIONE
DISTESA**

DUPLICAZIONE SEMICONSERVATIVA

Ciascun filamento del DNA parentale funziona da stampo



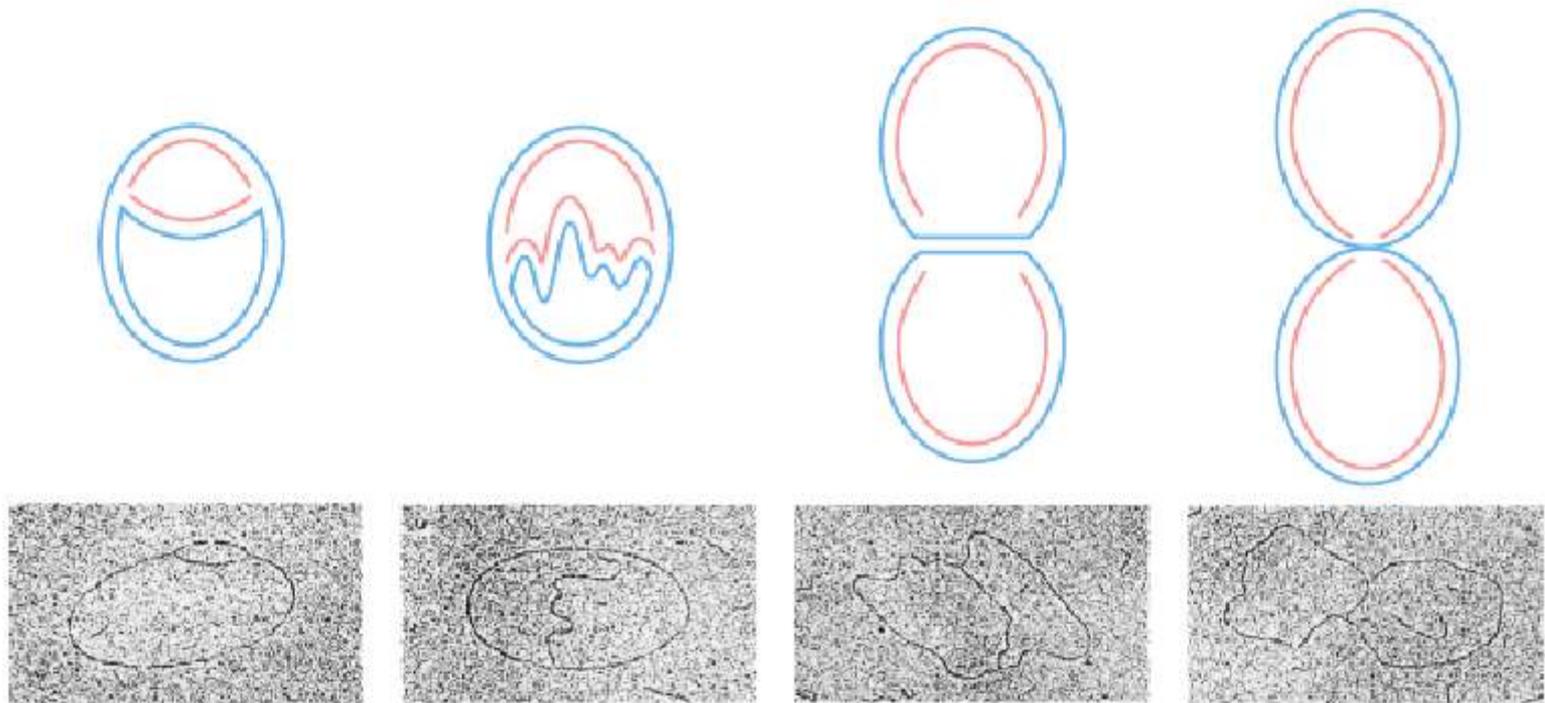
LA DUPLICAZIONE

- ✓ Ha inizio in un sito di origine

La replicazione del DNA inizia in specifici punti chiamati **Origini della replicazione** che sono riconosciuti da proteine specifiche e che generalmente sono ricchi in A-T

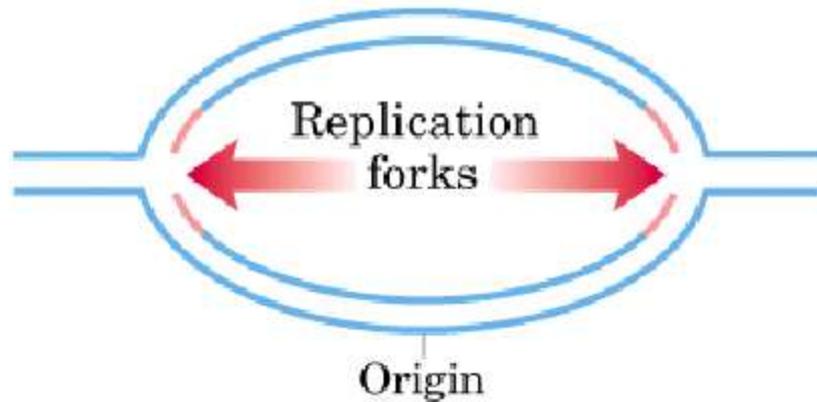
bidirezionale: prende il via da un punto di origine e procede in entrambe le direzioni

*La replicazione inizia in un sito d'origine e procede
simultaneamente in entrambe le direzioni*

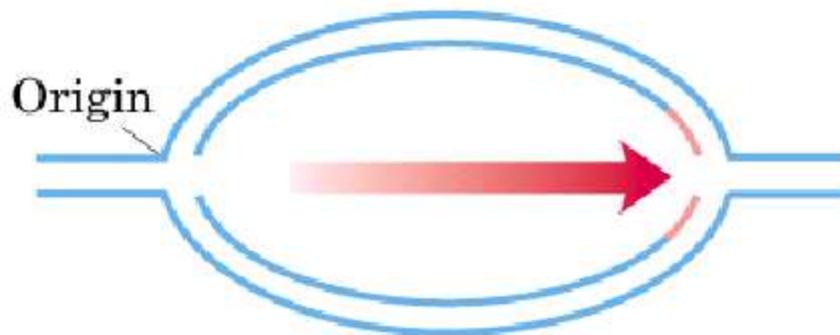


(a)

Bidirectional



Unidirectional

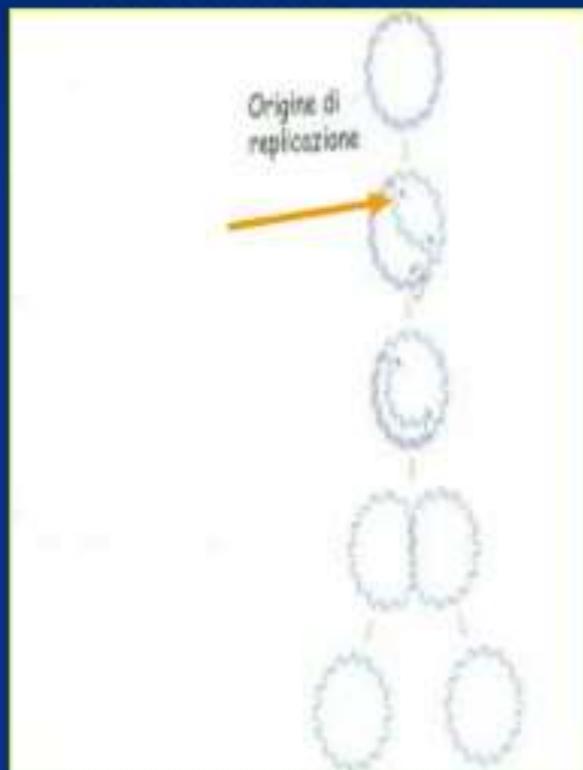


(b)

L'aggiunta di ^3H per un breve periodo, immediatamente precedente la reazione, consente di distinguere la replicazione unidirezionale da quella bidirezionale, determinando se il composto marcato (in rosso) si trovi in corrispondenza di una o di entrambe le forcelle di replicazione visualizzate negli autoradiogrammi.

Dove inizia?

Procarioti

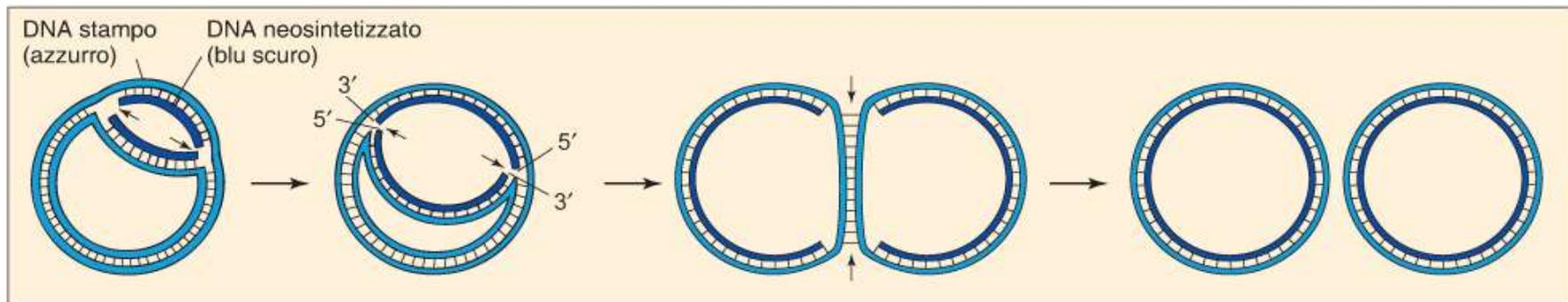


La replicazione del DNA nei Procarioti ha un **unico sito di origine** della replicazione

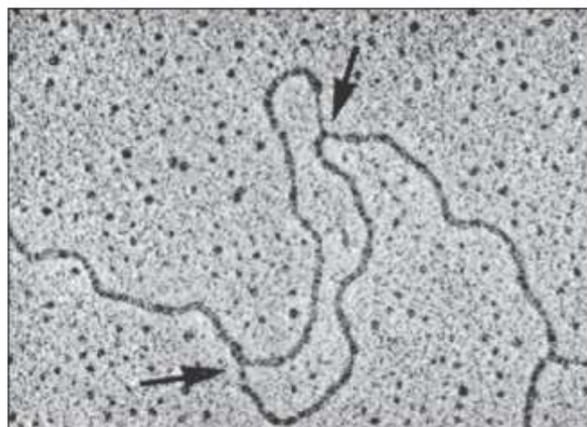
Eucarioti



La replicazione del DNA negli Eucarioti ha **molti siti di origine**

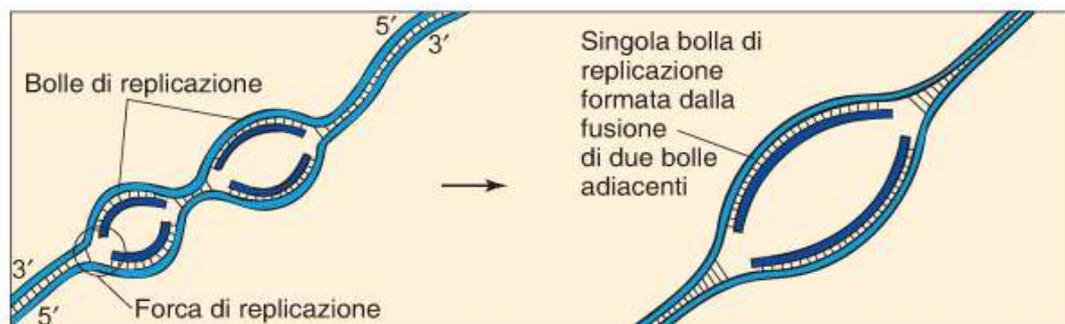


(a)



(b)

340 nm

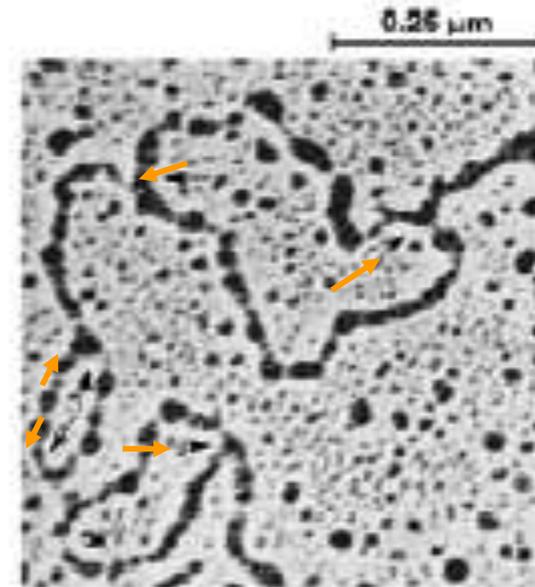
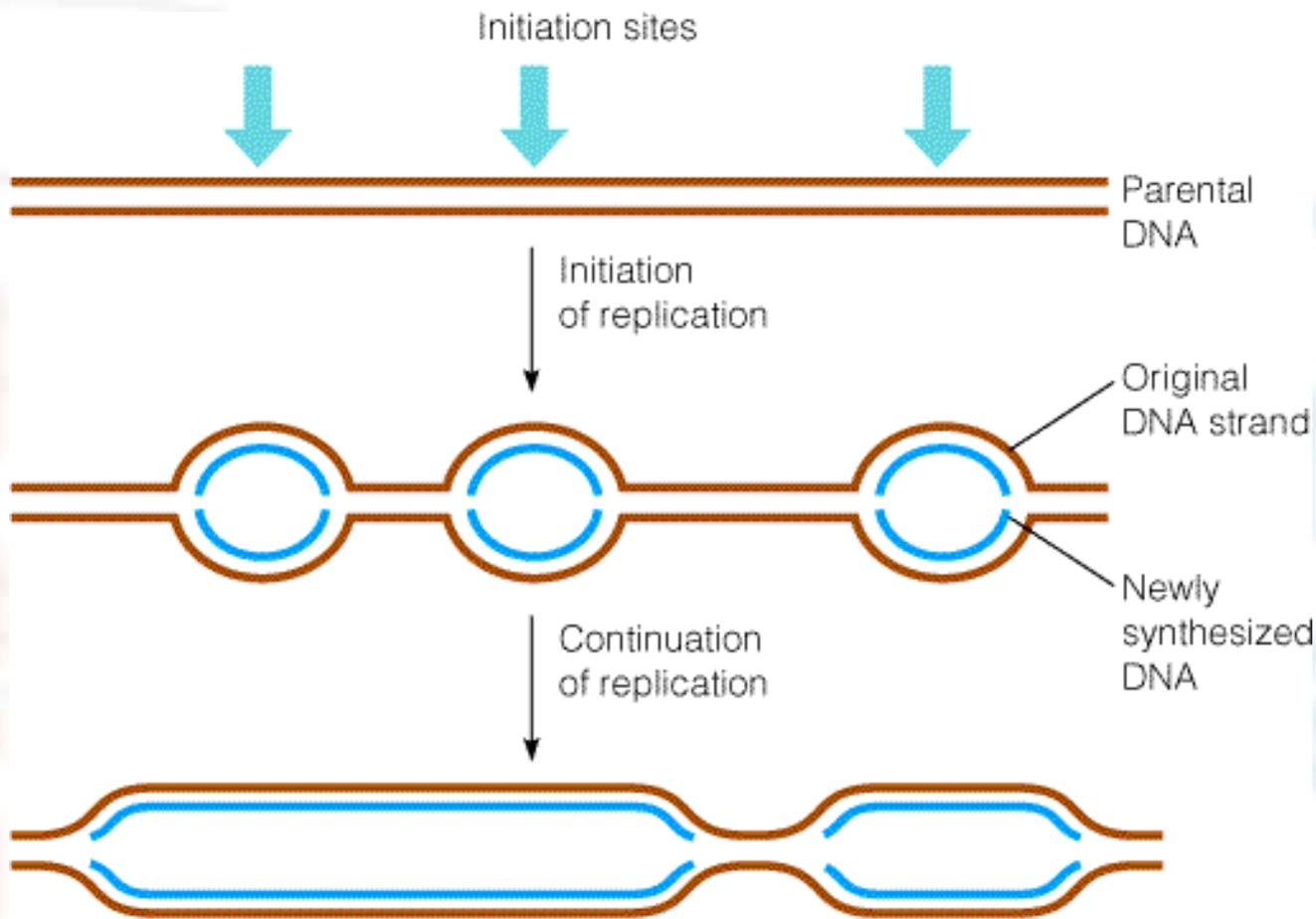


(c)

FIGURA 11-12 La replicazione del DNA è bidirezionale nei procarioti e negli eucarioti.

I filamenti guida e i filamenti "in ritardo" non sono rappresentati in figura. **(a)** Il cromosoma circolare di *E. coli* ha una unica origine di replicazione. La sintesi di DNA inizia in un punto e da quello procede in entrambe le direzioni finché le due forche di replicazione si incontrano (freccie). **(b)** La fotografia al microscopio elettronico a trasmis-

sione mostra 2 forche di replicazione (freccie) in un segmento di un cromosoma eucariotico che è stato parzialmente duplicato. **(c)** Il DNA di un cromosoma eucariotico contiene molte origini di replicazione. La sintesi procede in entrambe le direzioni da ogni origine fino a che "bolle di replicazione" adiacenti non si incontrano.

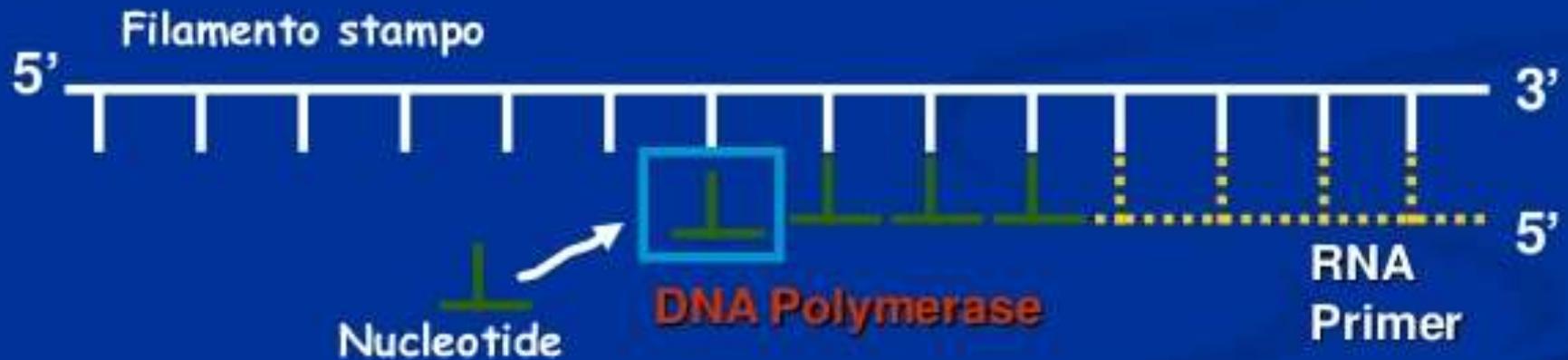


(b) In this micrograph, three replication bubbles are visible along the DNA of cultured Chinese hamster cells. The arrows indicate the direction of DNA replication at the two ends of each bubble (TEM).

La sintesi procede in entrambe le direzioni da ogni origine fino a che "bolle di replicazione" adiacenti non si incontrano

Cosa fa la DNA polimerasi?

La DNA-polimerasi è in grado di sintetizzare il nuovo filamento solo nella direzione 5'-3' in quanto richiede un terminale 3'-OH libero a cui agganciare il nucleotide successivo. Per poter funzionare, questo complesso necessita di un innesco iniziale di RNA (**primer**)



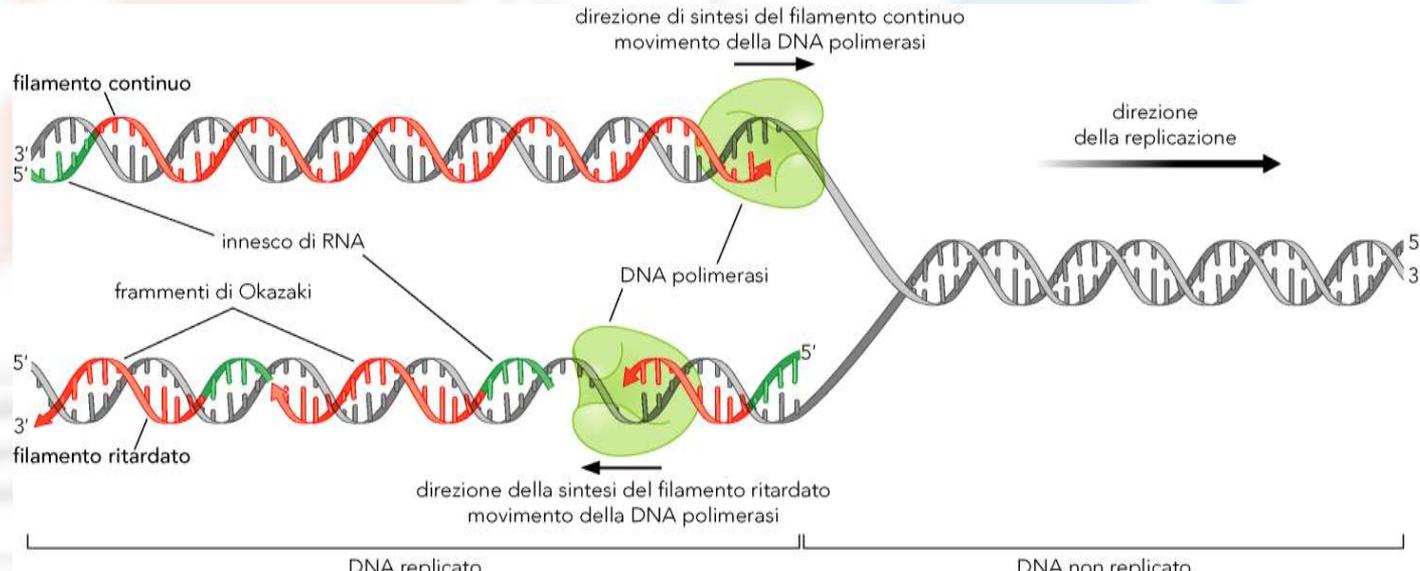
L'INIZIO DI UN NUOVO FILAMENTO DI DNA RICHIEDE UN INNESCO DI RNA

PRIMASI → **RNA PRIMER 5-10 NUCLEOTIDI**

LE DNA POLIMERASI SONO IN GRADO DI INIZIARE LA SINTESI USANDO SIA INNESCHI DI RNA CHE DI DNA

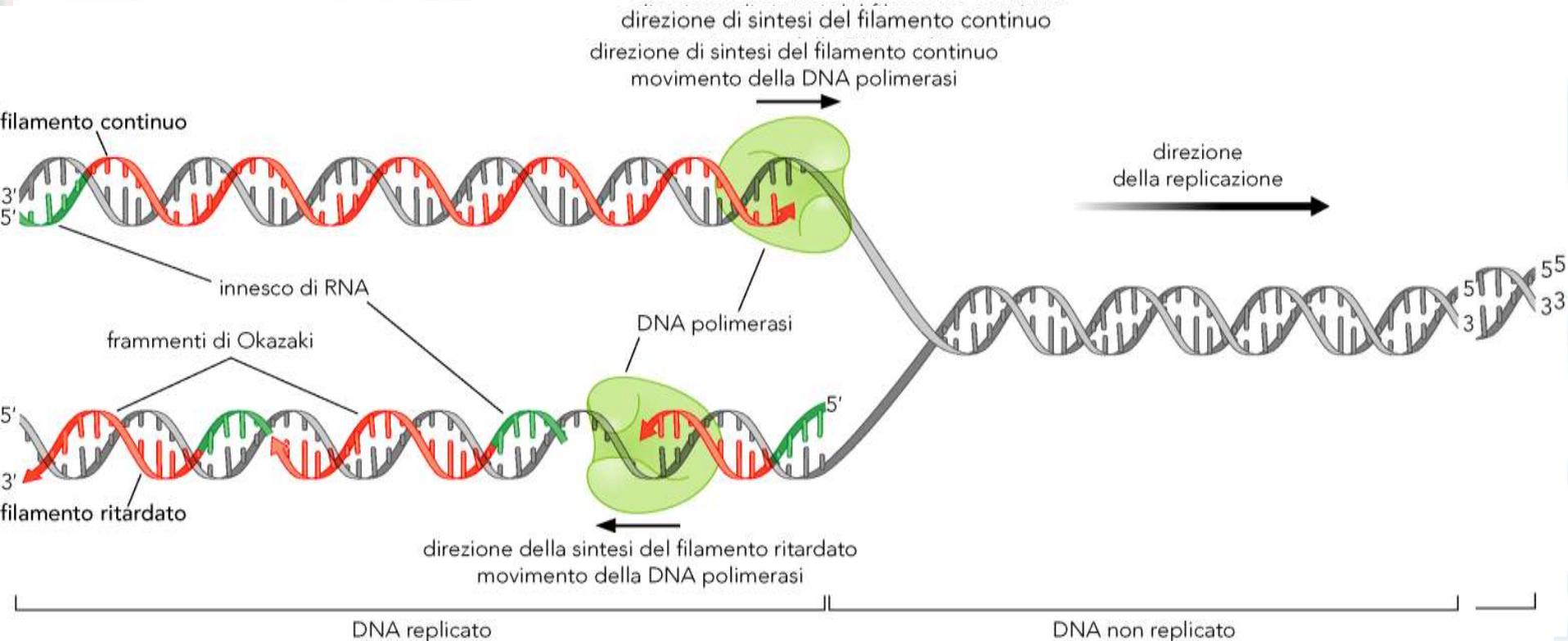
1 PRIMER PER LA CATENA VELOCE

1 PRIMER PER OGNI FRAMMENTO DI OKAZAKI PER LA CATENA LENTA



ENTRAMBI I FILAMENTI DI DNA VENGONO SINTETIZZATI A LIVELLO DELLA FORCA REPLICATIVA

Il punto che si trova tra i due filamenti separati e la doppia elica che non ha ancora subito il processo di

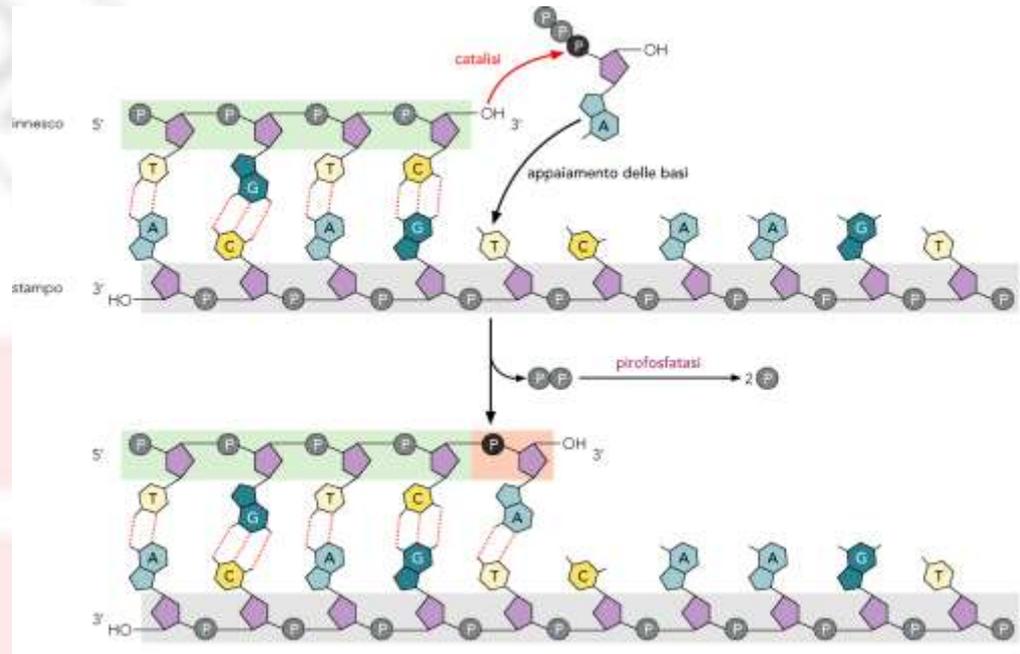


i frammenti di Okazaki variano da 1000 a 2000 bp nei batteri e da 100 a 400 bp negli eucarioti

Intermedi temporanei durante la replicazione del DNA

IL DNA E' SINTETIZZATO ALLUNGANDO IL TERMINALE 3' DELL'INNESCO

Un attacco nucleofilo del 3'OH al α -fosfato con meccanismo S_n2



IL MOTORE PER LA SINTESI DI DNA E' L'IDROLISI DEL PIROFOSFATO



$$\Delta G = -3,5 \text{ Kcal/mole}$$



$$\Delta G = -7 \text{ Kcal/mole}$$

$$K_{eq} 10^5$$

LA SINTESI DEL DNA E' UNA REAZIONE IRREVERSIBILE

DNA doppia catena antiparallela

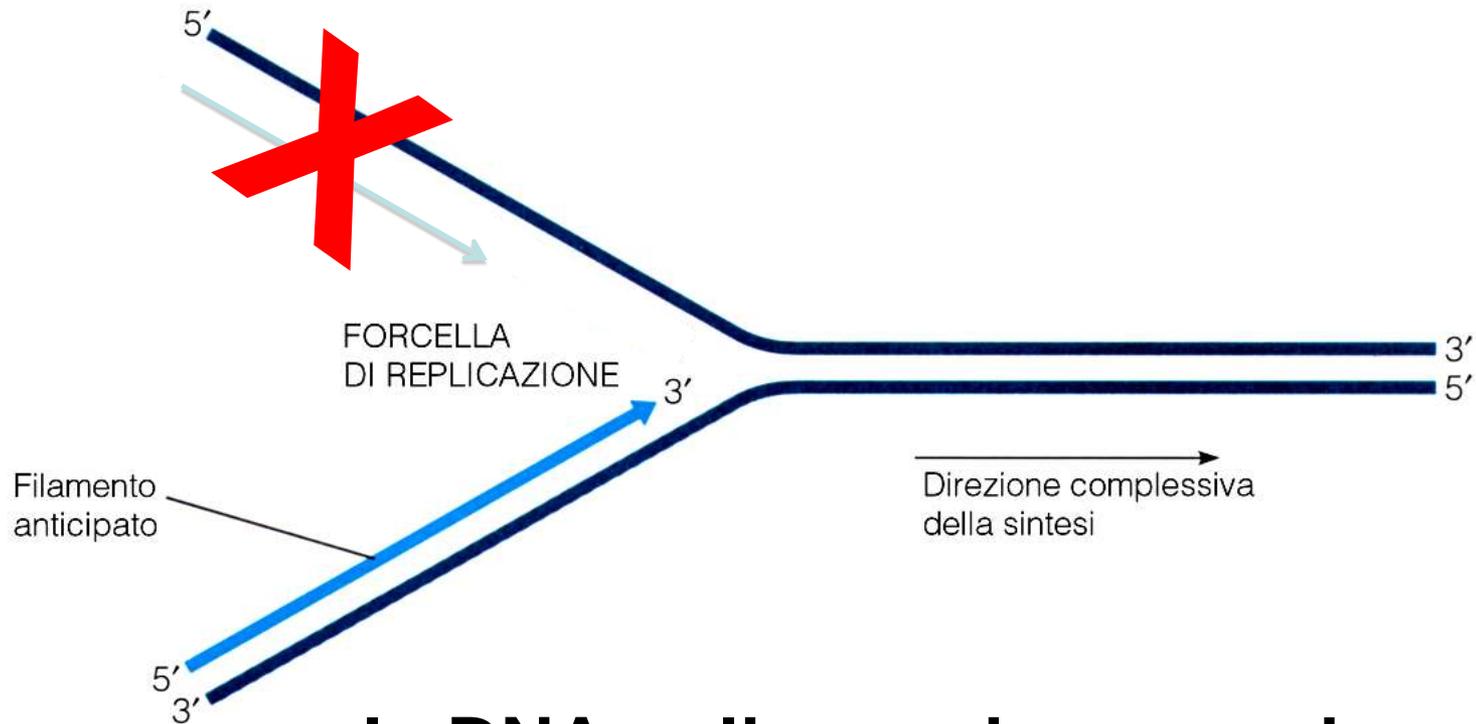


Figura 17-9

la DNA polimerasi non puo' sintetizzare il secondo filamento che corre in direzione opposta perche' non puo' andare in 3'--~~X~~5'

ALLUNGAMENTO

E' composto da due eventi, apparentemente simili, ma ben distinti per quanto riguarda il meccanismo: la *sintesi della catena veloce* e la *sintesi della catena lenta*.

Proteine di E. Coli alla forcella di replicazione

- *SSBP* (single strand binding proteins): si legano al DNA a singola elica tenendole separate
- *Elicasi*: svolgimento del DNA
- *Primasi (DnaG)*: sintesi dei primer di RNA
- *DNA polimerasi III*: allungamento della catena di nuova sintesi
- *DNA polimerasi I*: riempimento delle lacune; rimozione dei primer
- *DNA ligasi*: sutura del DNA
- *DNA topoisomerasi (girasi)*: superavvolgimento

REPLICAZIONE IN EUCARIOTI

LA REPLICAZIONE E' UNA REAZIONE MOLTO COMPLESSA CHE COINVOLGE MOLTI ENZIMI

I CROMOSOMI DELLE CELLULE EUCARIOTICHE RICHIEDONO MOLTI SITI DI INIZIO DI REPLICAZIONE

L'INIZIO DELLA REPLICAZIONE DEVE ESSERE ATTENTAMENTE COORDINATO



ATTIVITA' E FUNZIONI DELLE DNA POLIMERASI DI EUCARIOTI

EUCARIOTI	NUMERO DELLE SUBUNITA'	FUNZIONI
POL α	4	SINTESI DELL'INNESCO
POL β	1	RIPARAZIONE DELLE BASI ELIMINATE
POL γ	3	REPLICAZIONE DEL DNA MITOCONDRIALE E RIPARAZIONE
POL δ	2-3	REPLICAZIONE DEL DNA; RIPARAZIONE DELLE BASI E DEI NUCLEOTIDI ELIMINATI
POL ϵ	4	REPLICAZIONE DEL DNA; RIPARAZIONE DELLE BASI E DEI NUCLEOTIDI ELIMINATI
POL θ	1	RIPARAZIONE DEI CROSSLINK
POL ζ	1	SINTESI DELLE TRANLESIONI (TLS)
POL λ	1	RIPARAZIONE DEL DNA ASSOCIATO ALLA MEIOSI
POL μ	1	IPERMUTAZIONI SOMATICHE
POL κ	1	TLS
POL η	1	TLS RELATIVAMENTE ACCURATE NEI DIMERI DI CIS-SIN CICLOBUTANO
POL τ	1	TLS, IPERMUTAZIONI SOMATICHE
REV 1	1	TLS

Le DNA polimerasi eucariotiche catalizzano la replicazione o la riparazione

DNA polimerasi	Funzione	Struttura
Replicasi ad alta fedeltà		
α	Replicazione nucleare	Tetramero di 350 kD
δ	"	Tetramero di 250 kD
ϵ	"	Tetramero di 350 kD
γ	Replicazione mitocondriale	Dimero di 200 kD
Riparazione ad alta fedeltà		
β	Riparazione per escissione delle basi	Monomero di 39 kD
Riparazione a bassa fedeltà		
ζ	Bypass dei dimeri di timina	Eteromero
η	Riparazione delle basi danneggiate	Monomero
ι	Necessaria alla meiosi	Monomero
κ	Delezione e sostituzione di basi	Monomero

EUCARIOTI

DNA Pol α /primasi	Inizia le nuove catene
DNA Pol δ	Le allunga
DNA Pol ϵ	Le allunga

- DNA Pol δ e DNA Pol ϵ sintetizzano i filamenti opposti
- Le proteine che regolano, mantengono e coordinano l'azione di queste 3 DNA polimerasi sulla forca replicativa sono ancora sconosciute.

DNA polimerasi Procariotiche: I batteri hanno 5 DNA polimerasi :

Pol I: riparo del DNA; att. esonucleasiche 5'->3' (Nick translation) e 3'->5' (Proofreading).

Pol II: replicazione del DNA danneggiato.

Pol III: principale DNA polimerasi nella replicazione del genoma batterico. Molto processiva.

Pol IV: replicazione "translesionale".

Pol V: replicazione "translesionale", componente del "mutasoma".

DNA polimerasi Eucariotiche: gli eucarioti hanno almeno 15 DNA polimerasi:

Pol α : primasi, estende il primer con nNTP. Dopo circa 20 nt è sostituita da **Pol δ** o da **Pol ϵ** .

Pol β : riparo del DNA.

Pol γ : replicazione del DNA mitocondriale.

Pol δ : principale DNA polimerasi nella replicazione del filamento *lagging*. Molto processiva.

Pol ϵ : principale DNA polimerasi nella replicazione del filamento *leading*. Molto processiva.

Pol η , ι , κ , Rev1 e **Pol ζ : replicazione "translesionale", componenti del "mutasoma".**

Pol θ , λ , ϕ , σ , e μ . ed altre. Ancora non ben caratterizzate.

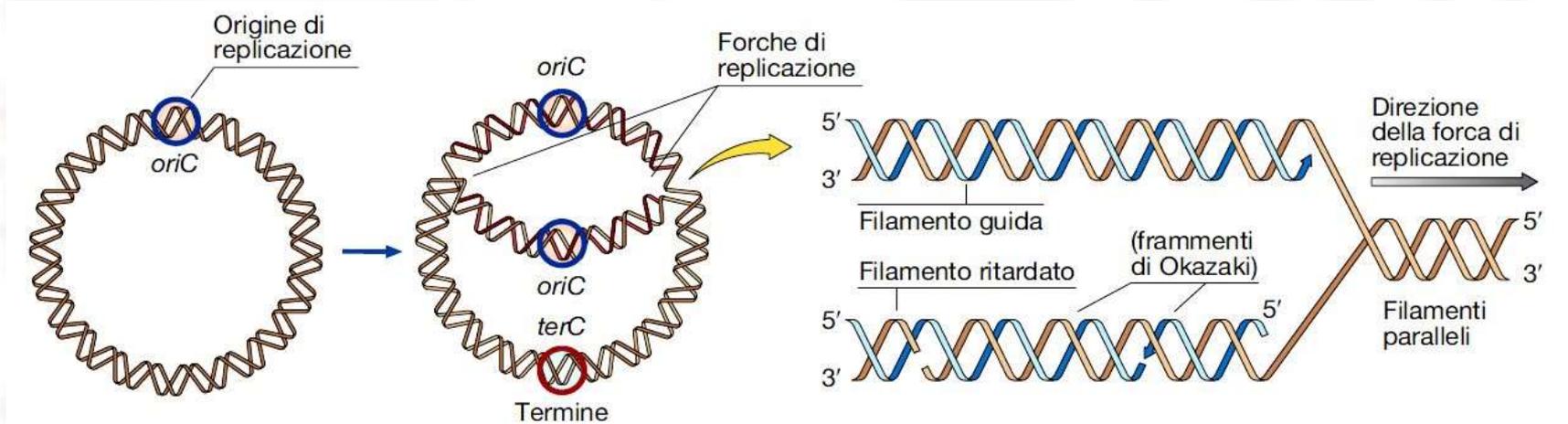
Nessuna delle DNA polimerasi eucariotiche può rimuovere i primers (5'->3' esonucleasi).

Solo le polimerasi γ , δ ed ϵ hanno attività di proofreading (3'->5' esonucleasi).

Cromosoma batterico

- duplicazione del DNA batterico: due forcelle di replicazione che procedono in direzioni opposte fino a incontrarsi al termine del processo

Visione complessiva della sintesi procariotica del DNA



Riproduzione

- **ASESSUATA o AGAMICA:** Si ottiene una progenie geneticamente identica (CLONE) a meno di fenomeni di mutazione o cambiamenti occasionali del materiale genetico tipica dei procarioti ed eucarioti unicellulari
- **SESSUATA o GAMICA:** richiede la partecipazione di due individui in quanto è affidata all'incontro di due cellule speciali i gameti prodotti nelle gonadi da un individuo di sesso maschile e da uno di sesso femminile tipica di piante e animali (eucarioti pluricellulari) ma anche di alcuni eucarioti unicellulari La diversità genetica associata ai meccanismi di riproduzione sessuata offre un'enorme opportunità a livello evolutivo



Grazie per l'attenzione