

CORSO DI GENETICA

LA NATURA CHIMICA DEL DNA

Roberto Mengentili
Università di Urbino "Carlo Bo"

Le leggi di Mendel (1865)



- Legge della dominanza e della recessività
- Legge della segregazione o disgiunzione
- Legge dell'indipendenza dei caratteri

Eredità particolata

Lo *Streptococcus pneumoniae*

Figura 2.1

Immagine al microscopio elettronico del batterio *Streptococcus pneumoniae*. (Molte delle cellule sono riprese al momento della divisione).



Questo batterio provoca la polmonite nei mammiferi.

L'esito è letale per animali di piccole dimensioni (per es. nei topi). Nell'uomo, dopo la scoperta degli antibiotici, non è più letale.

Anche i batteri hanno un fenotipo

There are two strains of *Streptococcus pneumoniae*.

ROUGH COLONY (R)

SMOOTH COLONY (S)



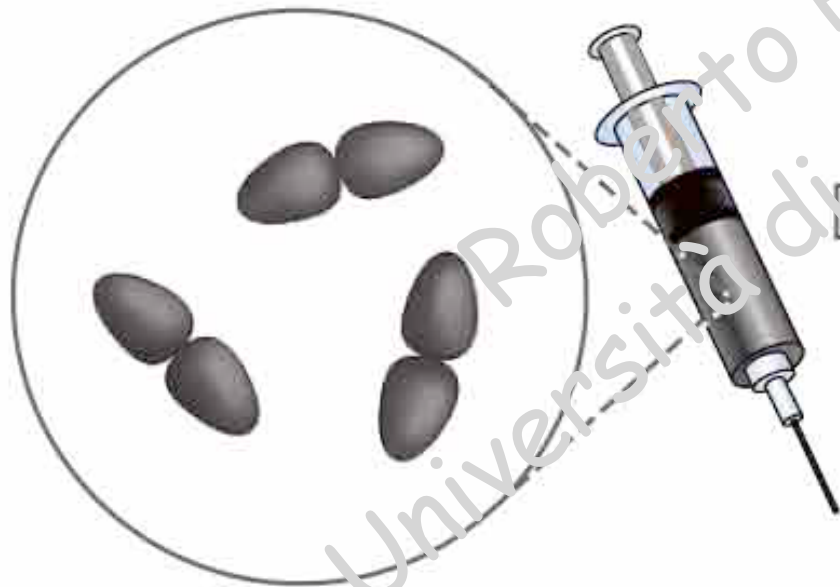
R strain is benign
(Lacking a protective capsule, it is recognized and destroyed by host's immune system)



S strain is virulent
(Polysaccharide capsule prevents detection by host's immune system)

L'esperimento di Griffith (1928)

Treatment 1 (control)



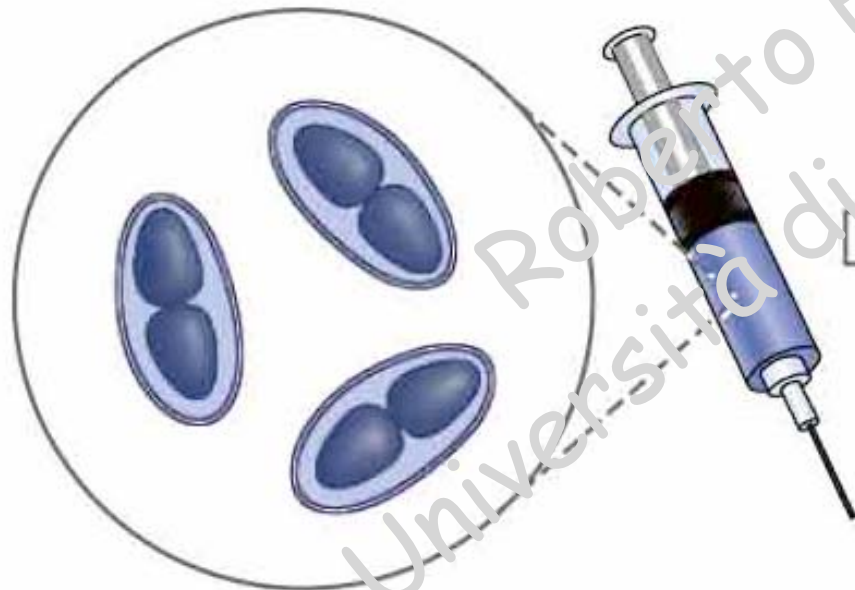
R strain



Mouse lives

L'esperimento di Griffith (1928)

Treatment 2 (control)



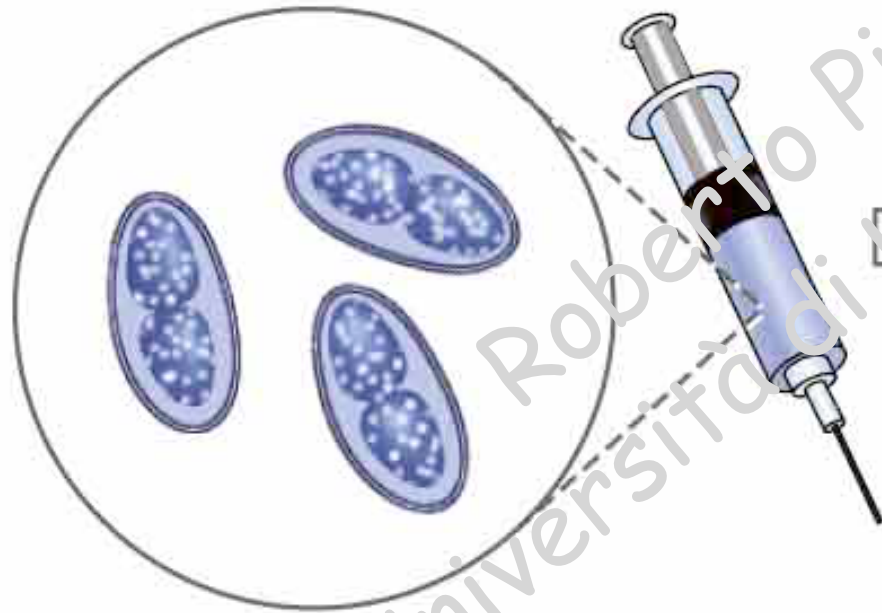
S strain



Mouse dies

L'esperimento di Griffith (1928)

Treatment 3



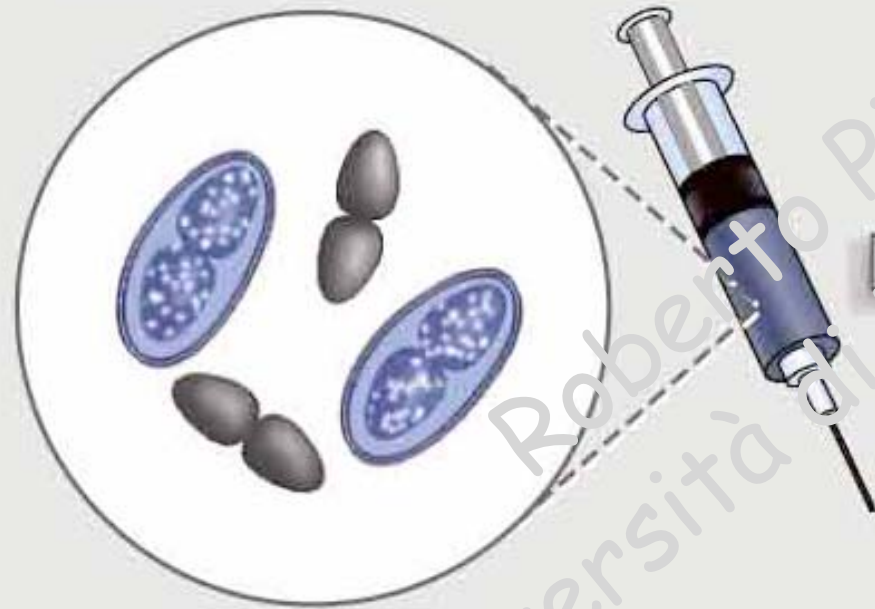
**Heat-killed
S strain**



Mouse lives

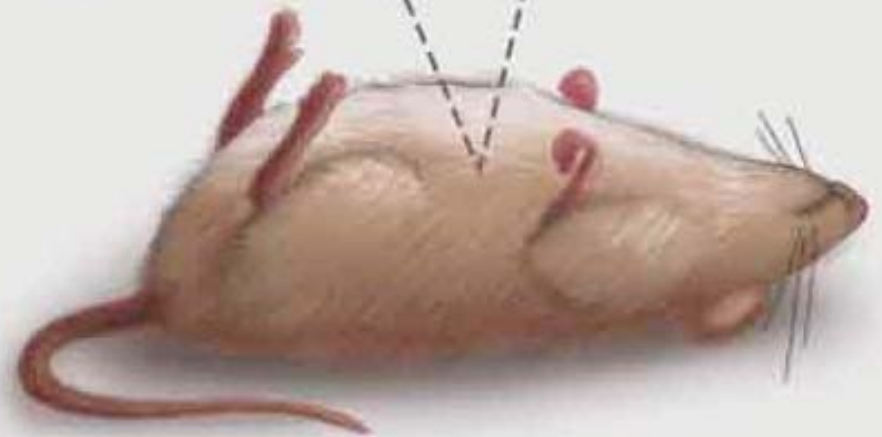
L'esperimento di Griffith (1928)

Treatment 4



**R strain +
Heat-killed
S strain**

Virulent
S strain



Mouse dies

Conclusioni

Esiste un *fattore trasformante* che può passare da un ceppo S (anche se ucciso al calore) ad un ceppo R e *trasformarlo* così in un ceppo S .

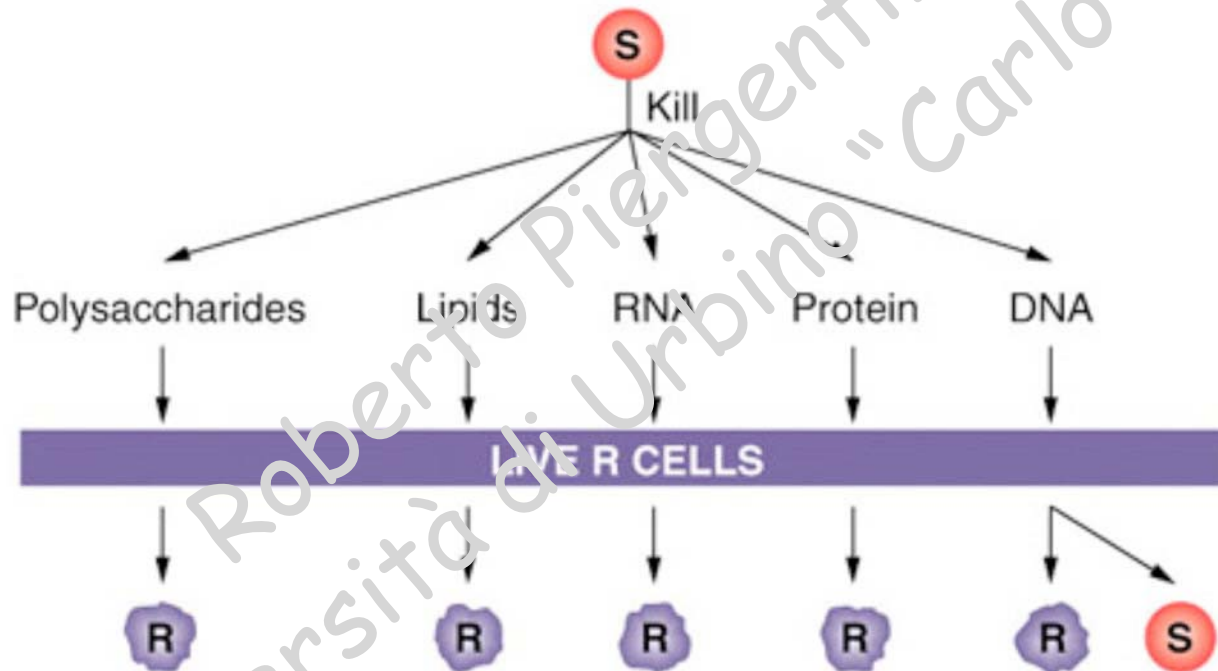
Qual è il fattore trasformante?

La composizione chimica degli esseri viventi

- Acqua
- Sali minerali
- Polisaccaridi
- Lipidi
- Proteine
- Acidi nucleici (DNA ed RNA)

Qual è la molecola che trasporta l'informazione genetica?

Avery, MacLeod & McCarty (1944)

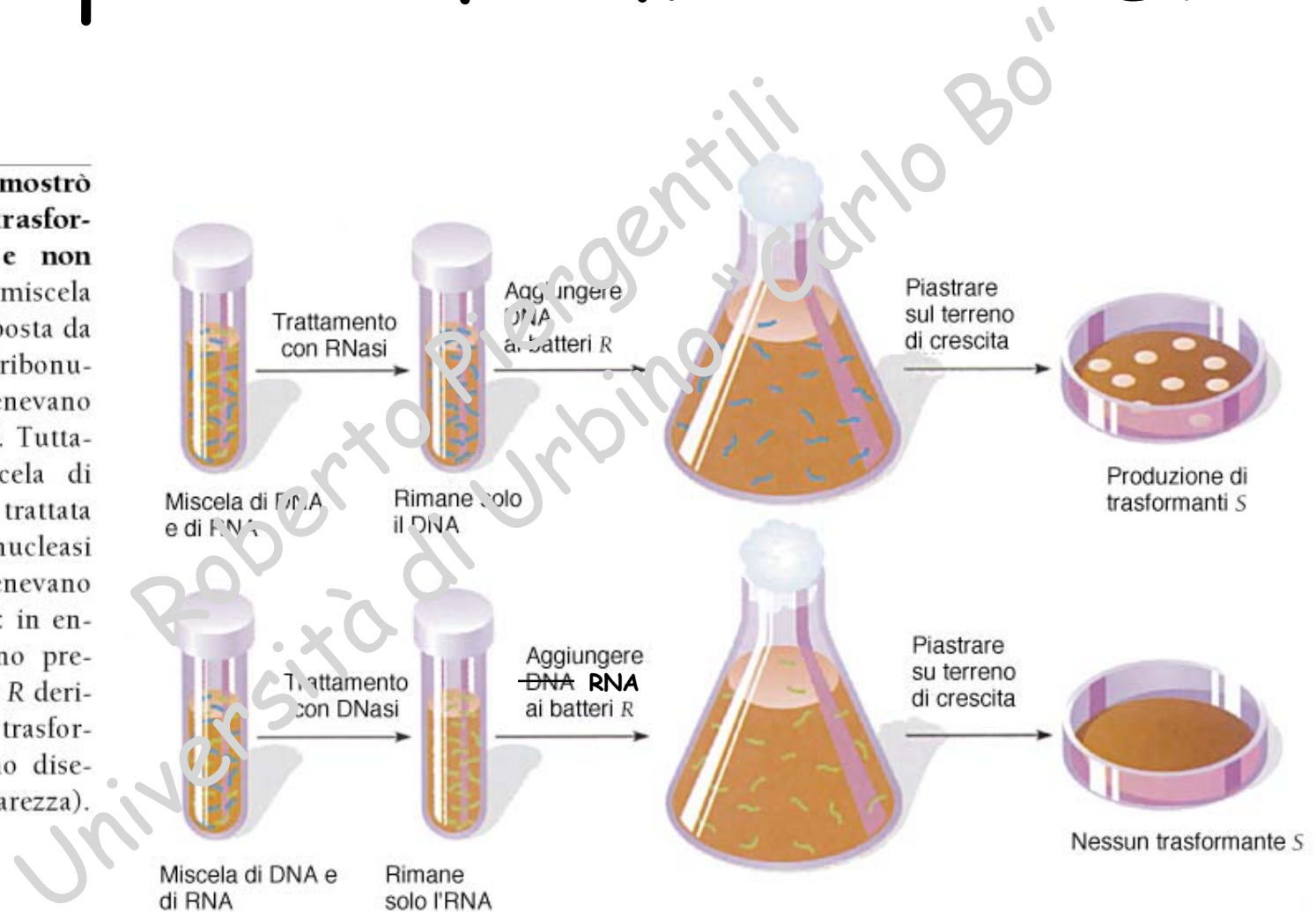


Il DNA è il responsabile della trasmissione dell'informazione genetica (ma molti non ci credettero!).

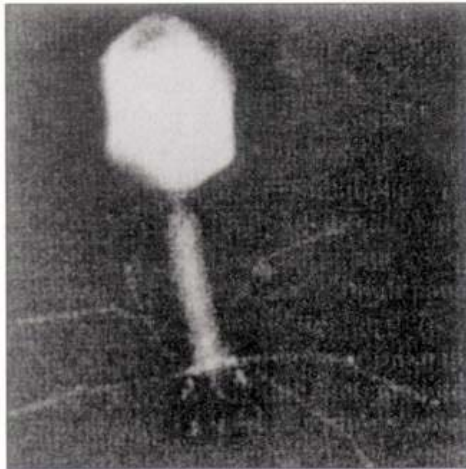
Il principio trasformante è il DNA

Figura 2.3

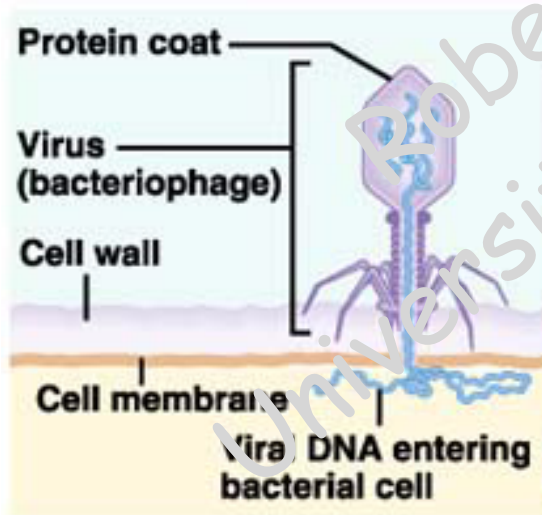
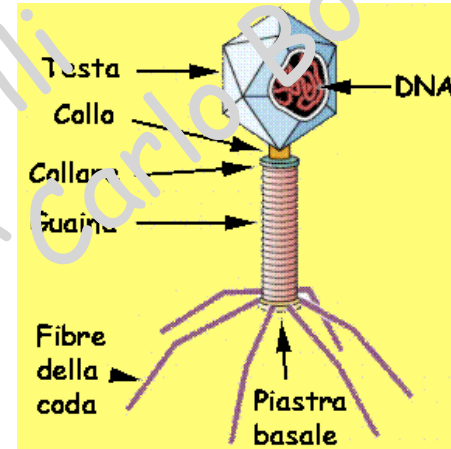
L'esperimento che dimostrò che il principio trasformante è il DNA e non l'RNA. Trattando la miscela di acidi nucleici composta da DNA ed RNA con ribonucleasi (RNasi), si ottenevano ancora trasformanti S. Tuttavia, quando la miscela di DNA ed RNA veniva trattata con desossiribonucleasi (DNasi), non si ottenevano trasformanti S. (Nota: in entrambe le piastre sono presenti anche le colonie R derivate da cellule non trasformate, e che non sono disegnate per maggior chiarezza).



Hershey & Chase (1952)



Il sistema del batteriofago serie T (foto: un T2) evita contaminanti: ci sono solo DNA e proteine!

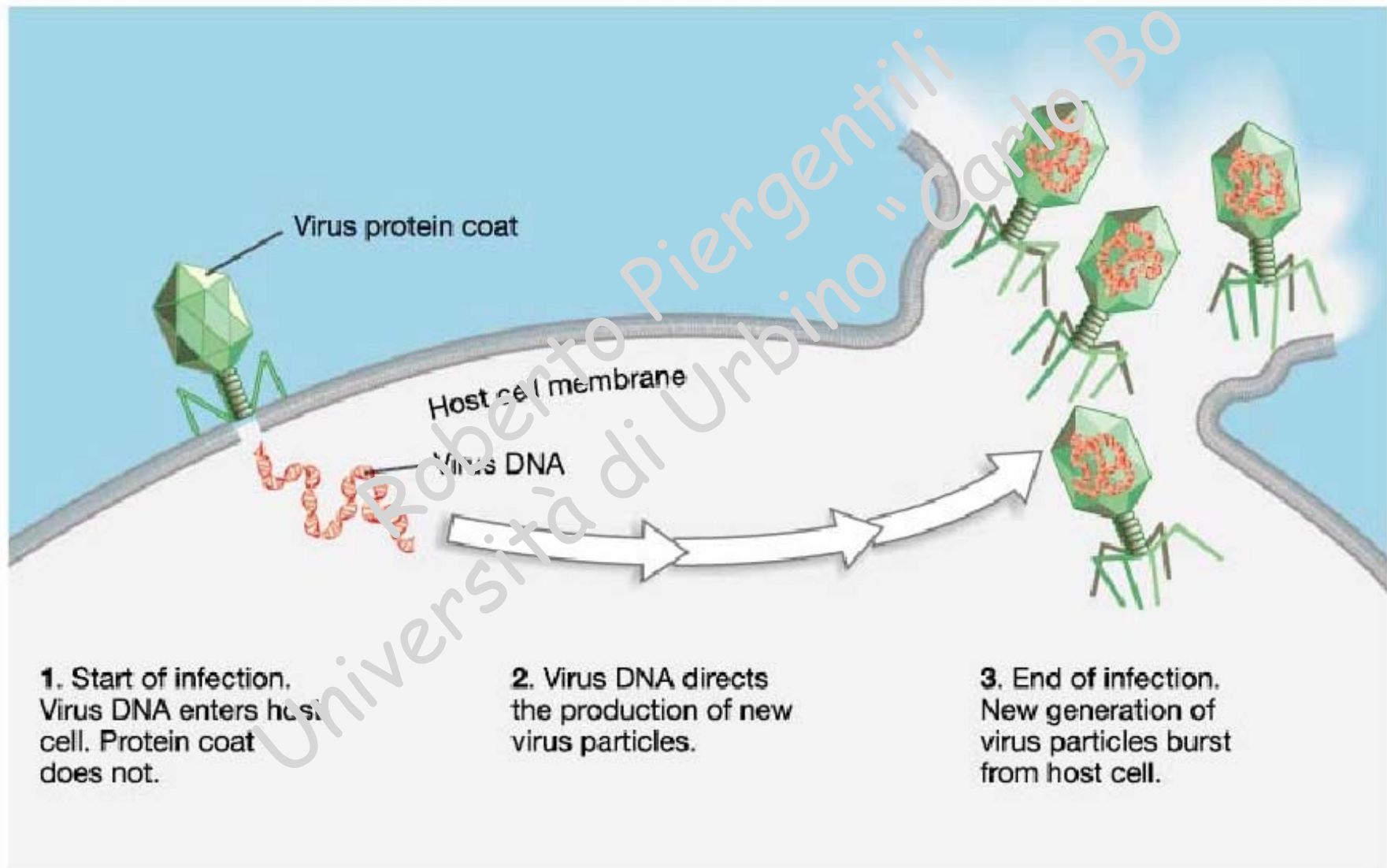


A

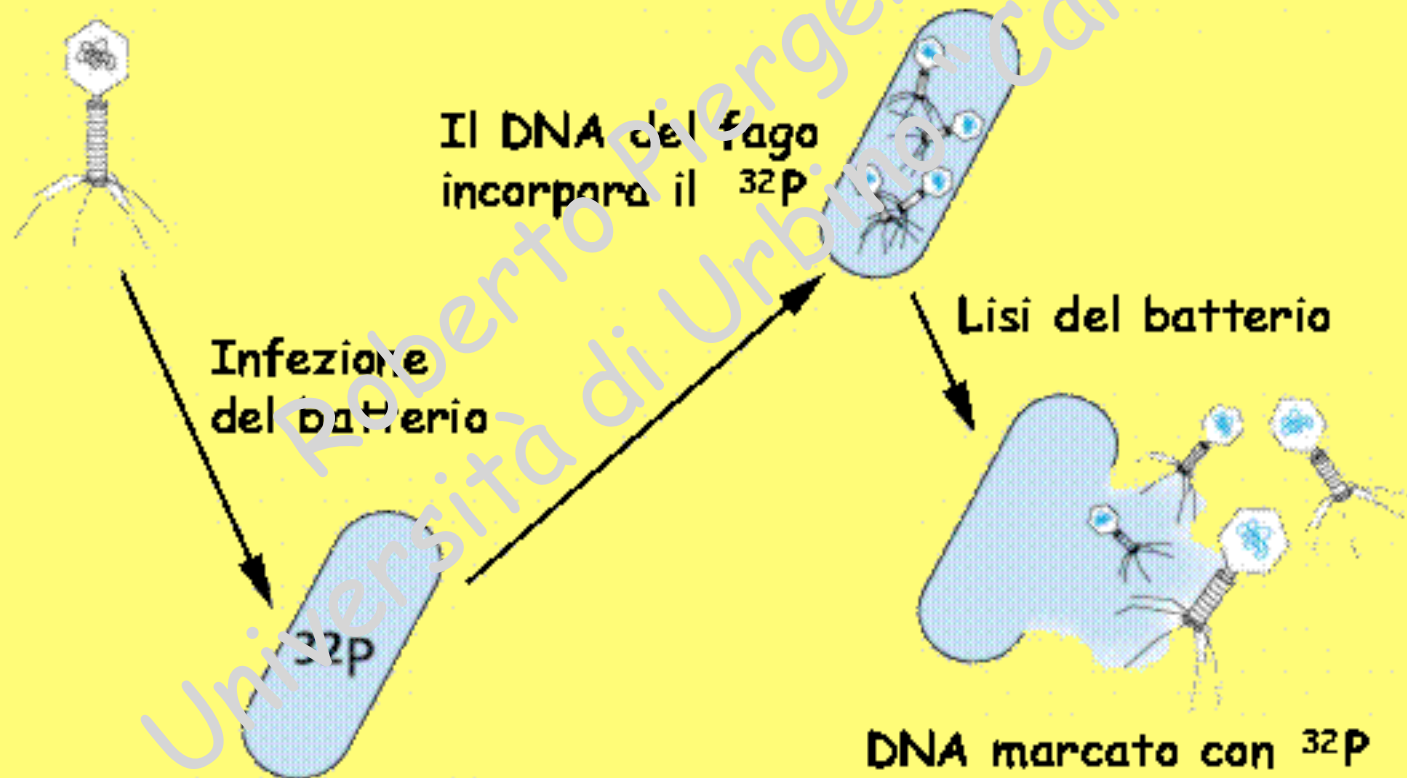


B

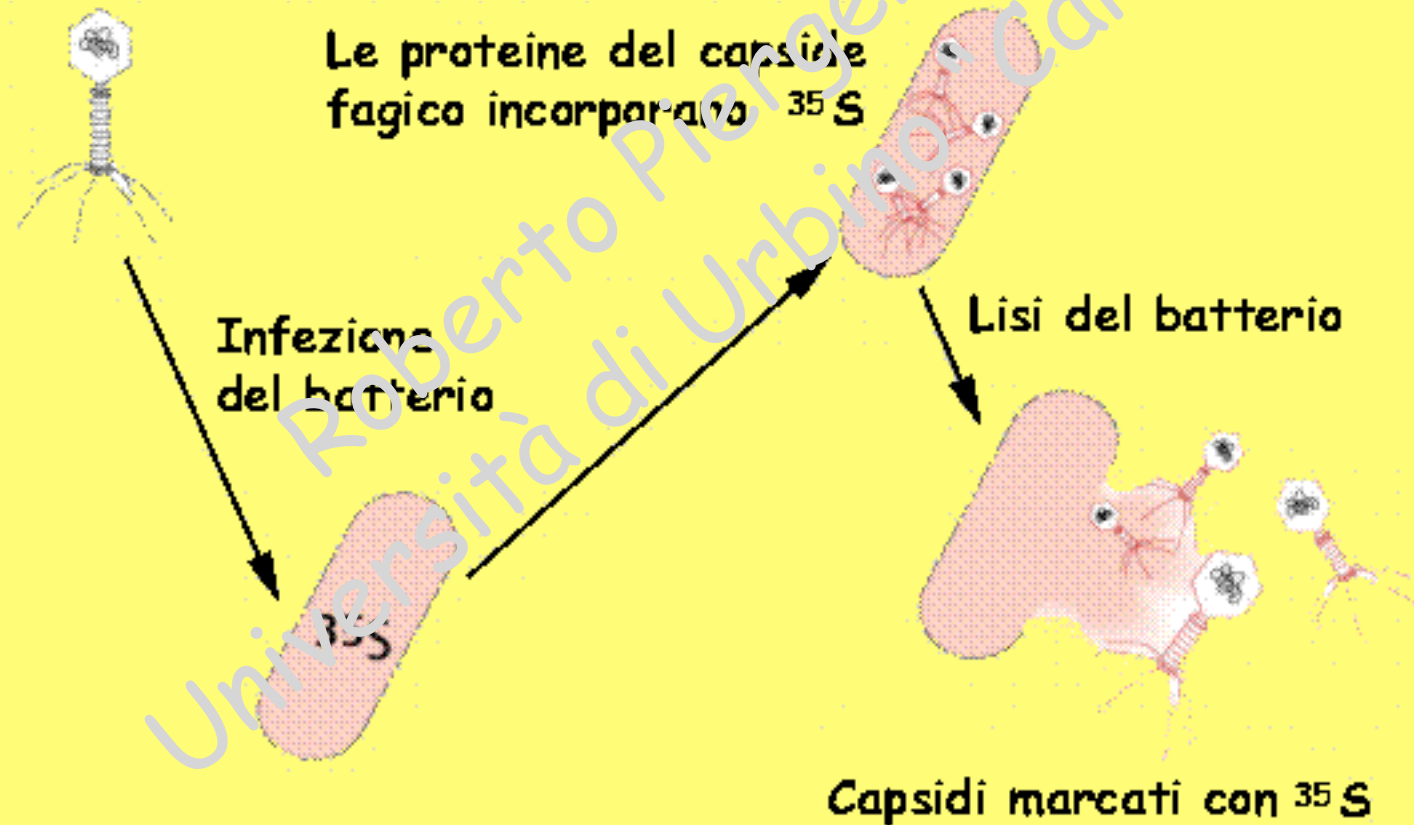
Il ciclo vitale di un fago



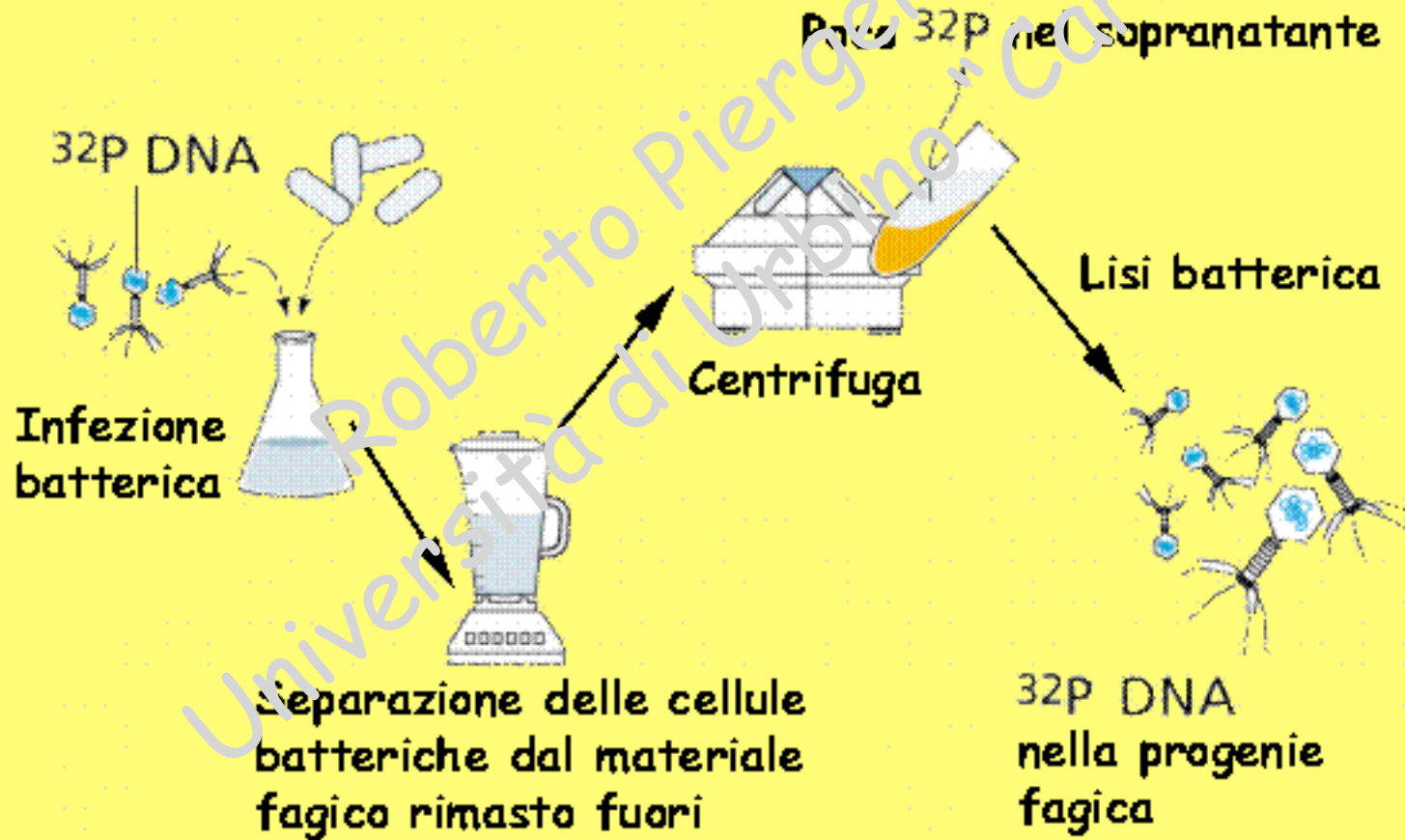
Marcatura specifica del DNA



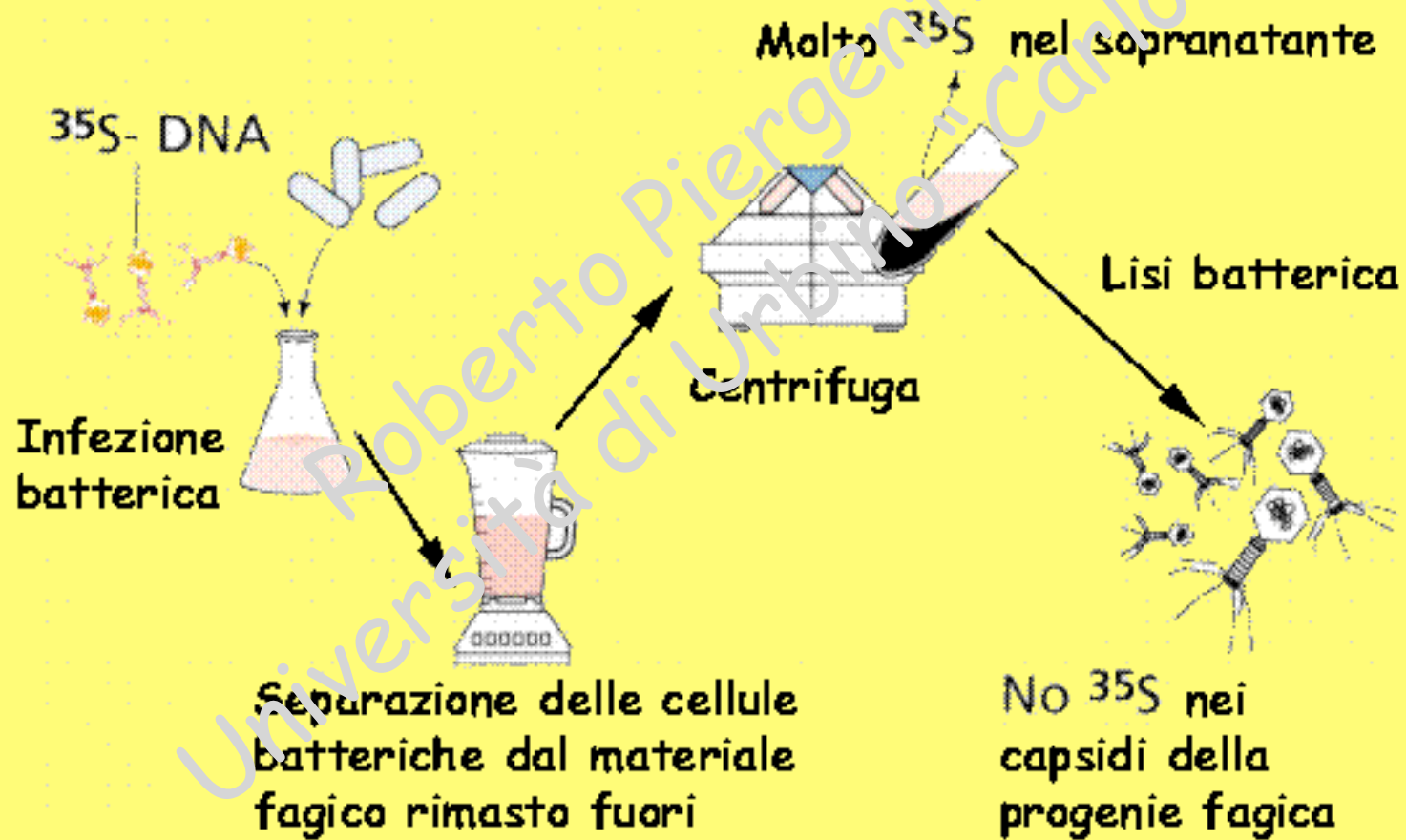
Marcatura specifica delle proteine



Risultati (1)



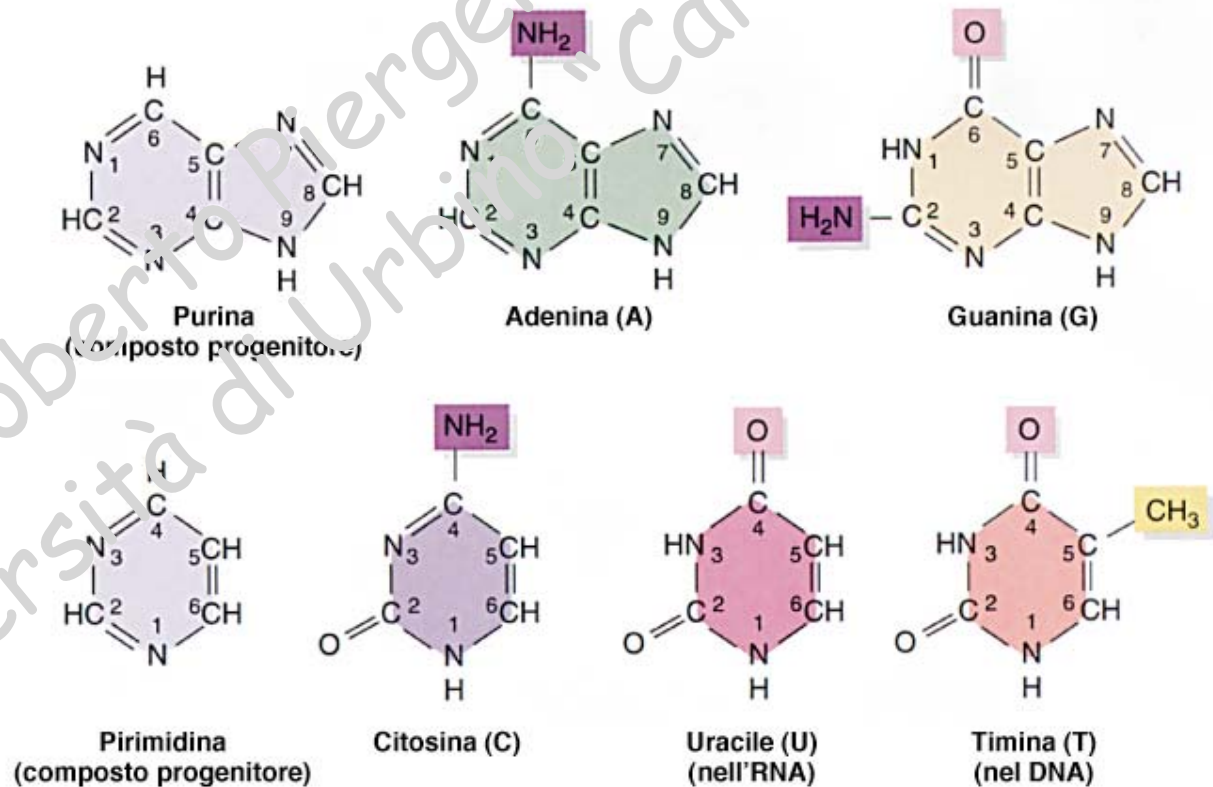
Risultati (2)



La composizione del DNA - 1

Figura 2.10

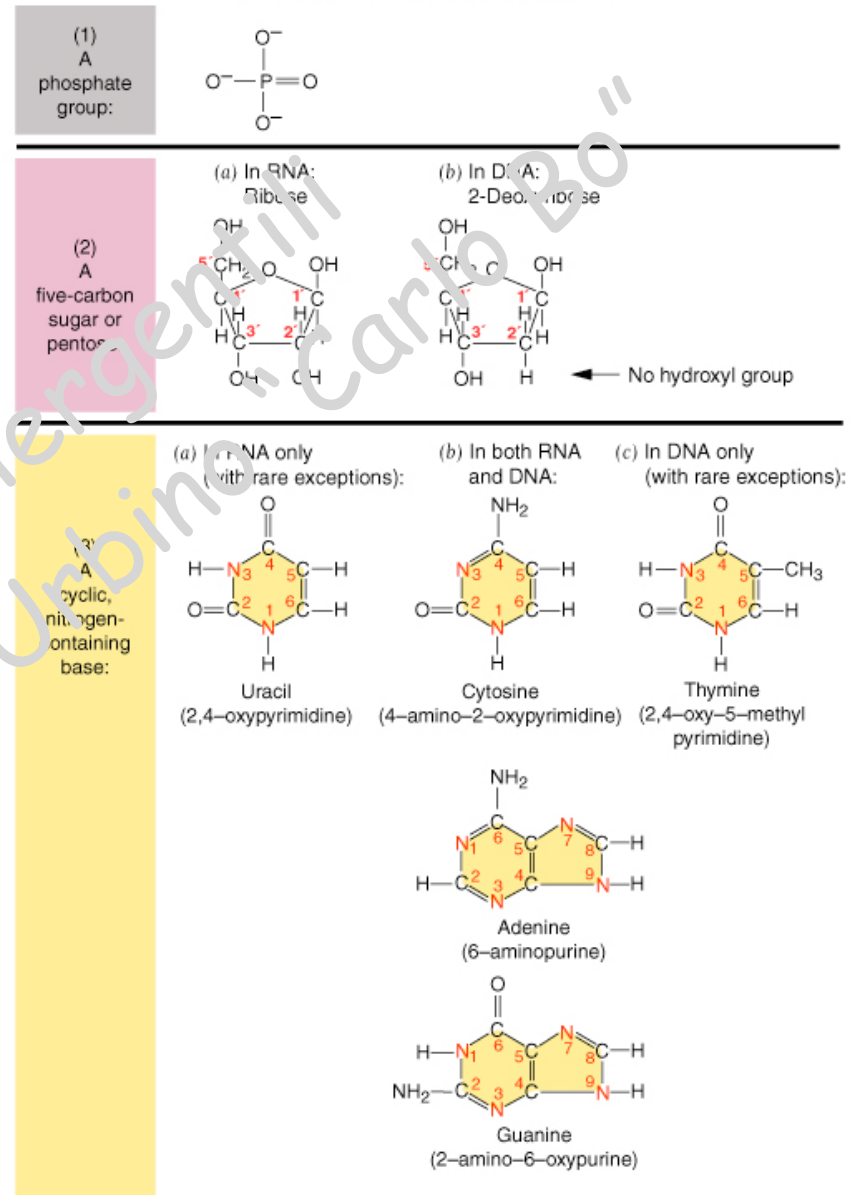
La struttura delle basi azotate nel DNA e nell'RNA. I composti progenitori sono la purina (alto) e la pirimidina (basso). Le differenze tra le basi sono evidenziate.



La composizione del DNA - 2

Le basi azotate sono collegate tra loro tramite ponti molecolari costituiti da uno zucchero pentoso e da un acido fosforico, sia nel DNA che nell'RNA.

Nucleic acids are composed of repeating subunits called nucleotides.
Each nucleotide is composed of three units.



I dati di Chargaff e Davidson (1949)

Table 3-2 Data Leading to the Formulation of Chargaff's Rules

Source	Adenine to Guanine	Thymine to Cytosine	Adenine to Thymine	Guanine to Cytosine	Purines to Pyrimidines
Ox	1.29	1.43	1.01	1.00	1.1
Human	1.56	1.75	1.00	1.00	1.0
Hen	1.15	1.22	1.06	0.91	0.99
Salmon	1.43	1.43	1.02	1.02	1.02
Wheat	1.22	1.18	1.00	0.97	0.99
Yeast	1.67	1.92	1.03	1.20	1.0
<i>Hemophilus influenzae</i>	1.74	1.54	1.07	0.91	1.0
<i>E-coli</i> K2	1.05	0.95	1.09	0.99	1.0
Avian tubercle bacillus	0.4	0.4	1.09	1.08	1.1
<i>Serratia marcescens</i>	0.7	0.7	0.95	0.86	0.9
<i>Bacillus schatz</i>	0.7	0.6	1.12	0.89	1.0

SOURCE: After E. Chargaff et al., *J. Biol. Chem.* 177 (1949).

Le osservazioni di Chargaff e Davidson

Tabella 2.2 Composizione in basi del DNA da vari organismi

Origine del DNA	Percentuale della base nel DNA				Rapporti		
	A	T	G	C	A/T	G/C	(A + T) / (G + C)
Uomo (sperma)	31,0	31,5	19,1	18,4	0,95	1,03	1,67
Mais (<i>Zea mays</i>)	25,6	25,3	24,5	24,6	1,01	1,00	1,04
<i>Drosophila</i>	27,3	27,6	22,5	22,5	0,99	1,00	1,22
Nucleo di <i>Euglena</i>	22,6	24,4	27,7	25,8	0,93	1,07	0,88
<i>Escherichia coli</i>	26,1	23,9	24,9	25,1	1,09	0,99	1,00

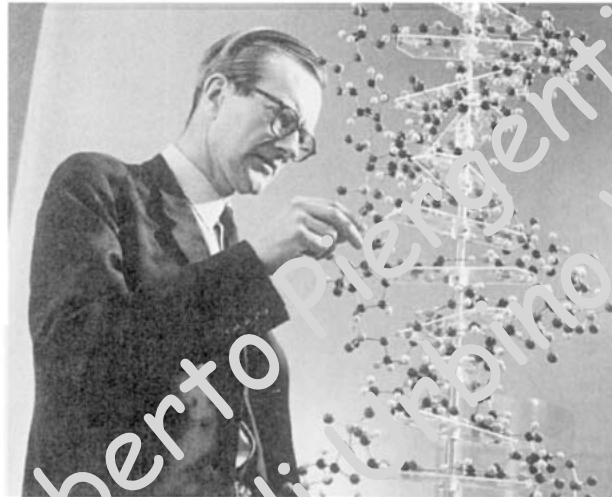
- ✓ La quantità di pirimidine (T+C) è sempre uguale alla quantità di purine (A+G);
- ✓ la quantità di Adenina è sempre uguale a quella di Timina e la quantità di Guanina è sempre uguale a quella di Citosina;
- ✓ **ma** la quantità di A+T non è necessariamente uguale a G+C; questo rapporto varia nei vari organismi!

Figura 2.13

Analisi del DNA mediante diffrazione dei raggi X. (a) Rosalind Franklin e Maurice H. F. Wilkins (fotografato nel 1962, quando ricevette il Premio Nobel insieme a Watson e Crick). (b) Lo schema di diffrazione dei raggi X del DNA che Watson e Crick utilizzarono per sviluppare il loro modello a doppia elica. Le aree scure che formano una figura ad X al centro della fotografia indicano la natura ad elica del DNA. Le mezzelune scure in alto ed in basso nella fotografia indicano la distanza di 0,34 nm tra le coppie di basi.

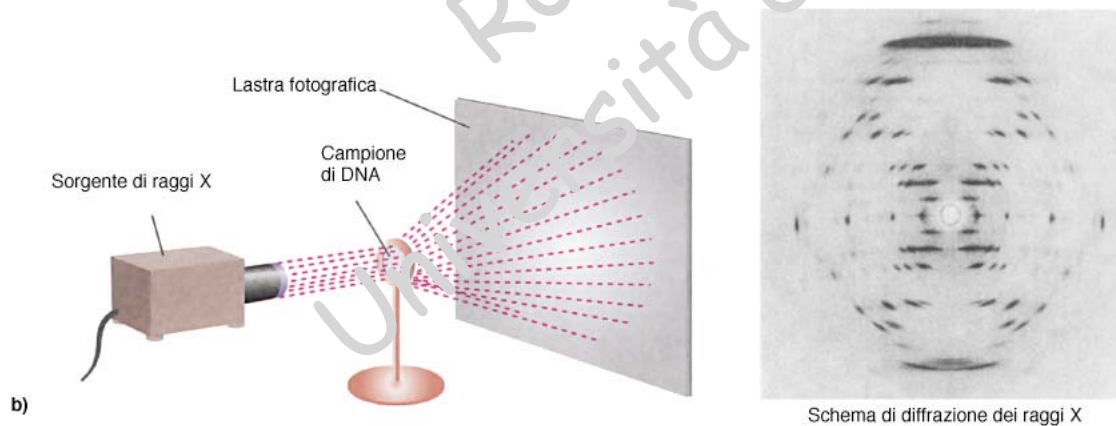


a)



I dati di Wilkins e Franklin

Wilkins e Franklin, tramite studi con la diffrazione a raggi X, determinarono che il DNA è una molecola lunga e sottile, elicoidale, composta da due parti simili tra loro e parallele.



b)

Schema di diffrazione dei raggi X

Watson & Crick (1953)



"Crick and Watson are very different. Watson is now a very able, effective administrator. In that respect he represents the American entrepreneurial type very well. Crick is very different: brighter than Watson, but he talks a lot, and so he talks a lot of nonsense."

**Erwin Chargaff,
oral history interview,
American Philosophical
Society, Spring, 1972.**

Le basi azotate formano legami idrogeno

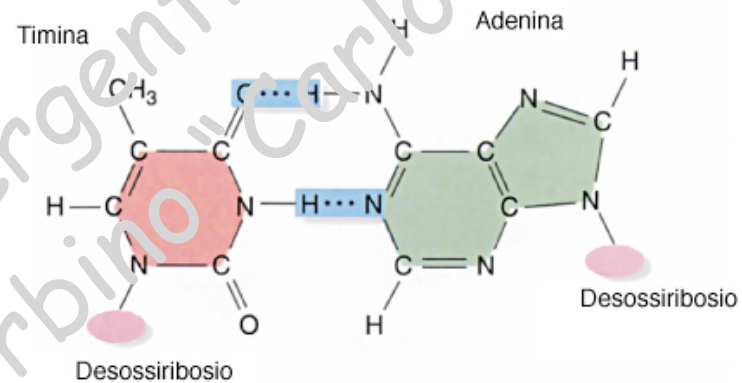
Questo perché sugli atomi di O ed N si forma una parziale carica negativa (atomi fortemente elettronegativi rispetto a C ed H) mentre su H si forma una parziale carica positiva. Se gli atomi vengono a trovarsi alla distanza giusta, le cariche opposte cominciano ad interagire.

Figura 2.15

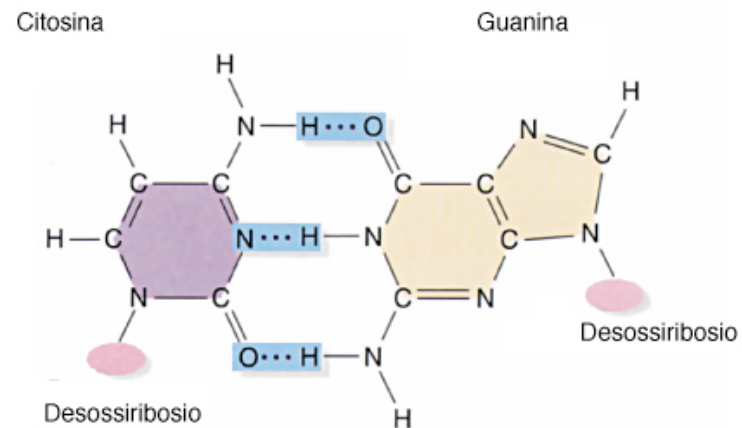
Struttura delle coppie complementari delle basi del DNA.

In entrambi i casi una purina si appaia con una pirimidina. (a) Le basi adenina e timina, che si appaiano mediante due legami idrogeno. (b) Le basi guanina e citosina, che si appaiano mediante tre legami idrogeno.

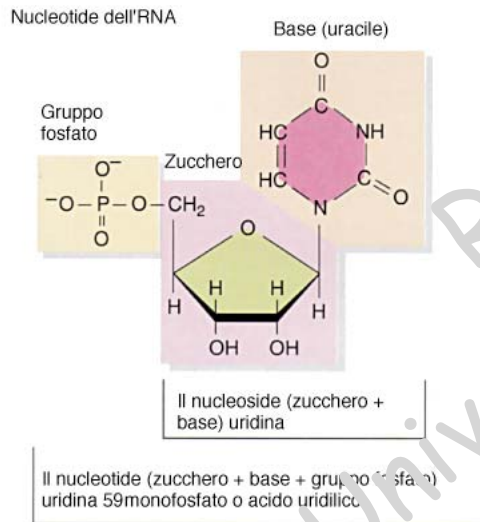
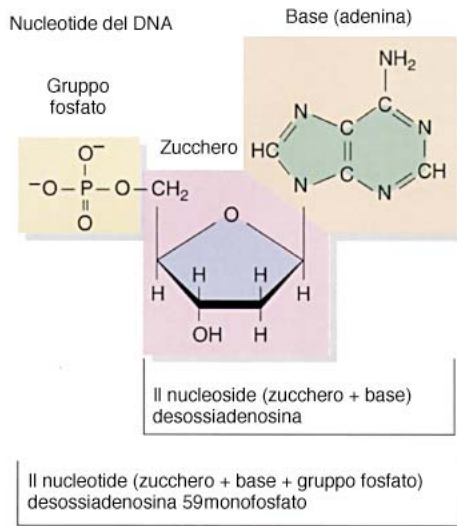
a) Coppia di basi adenina-timina (doppio legame idrogeno)



a) Coppia di basi guanina-citosina (triplo legame idrogeno)



a) Nucleotidi del DNA e dell'RNA



b) Catena polinucleotidica di DNA

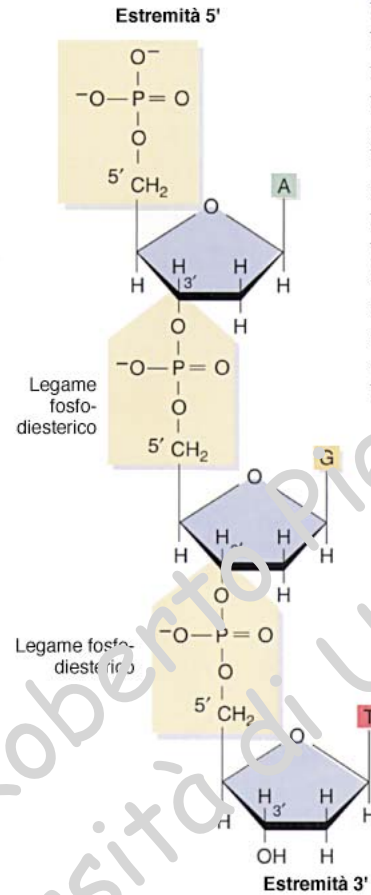


Figura 2.11

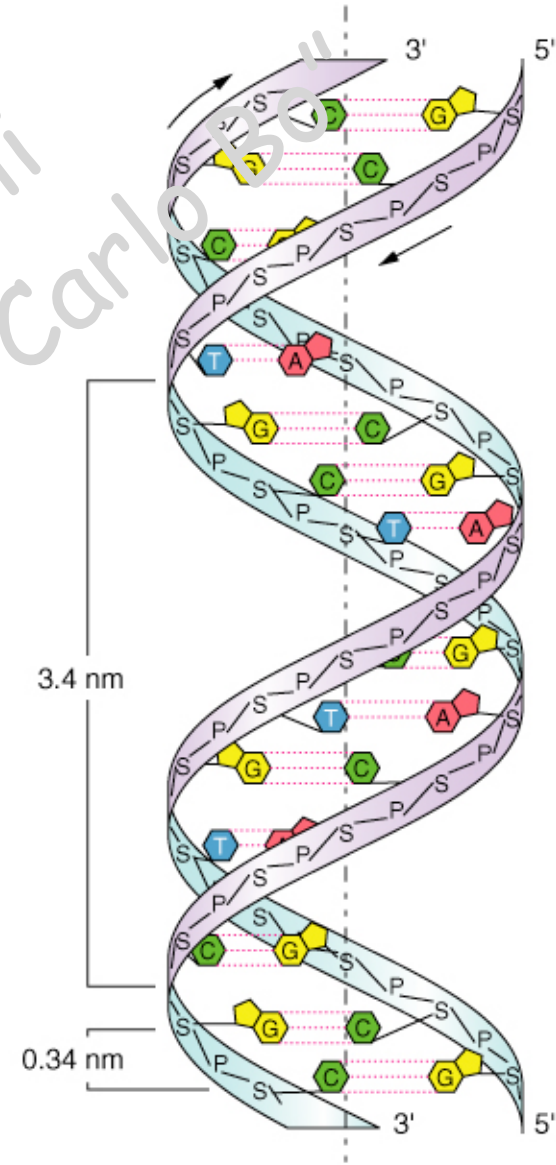
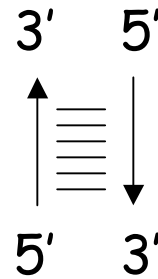
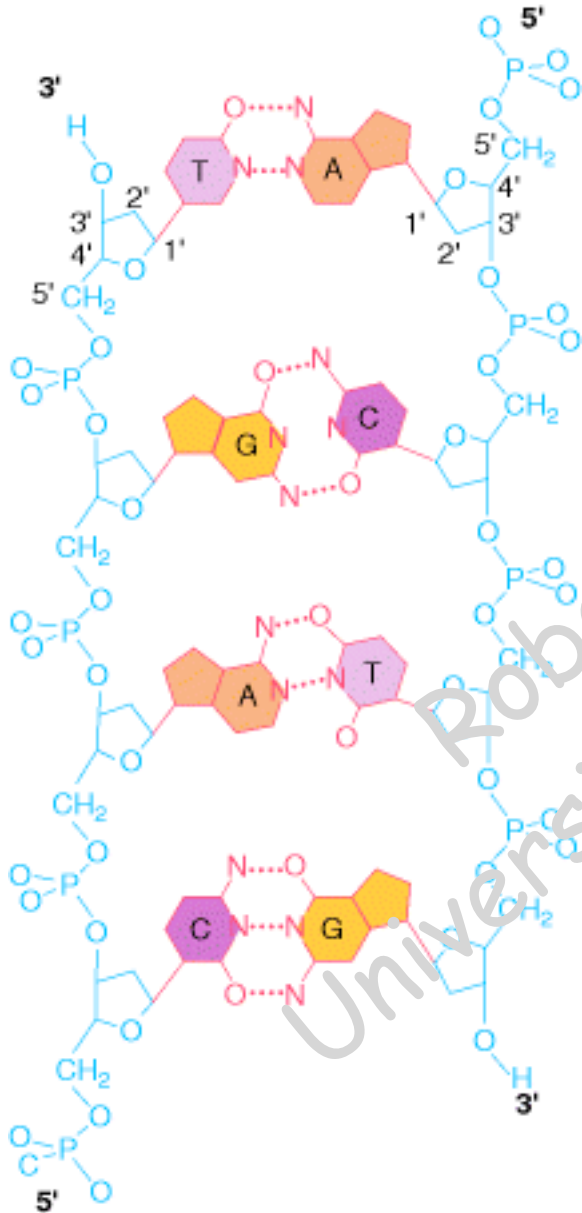
La struttura chimica di DNA ed RNA. (a) Strutture fondamentali dei nucleosidi (zucchero più base) e dei nucleotidi (zucchero più base più gruppo fosfato) del DNA e dell'RNA. In figura, i gruppi fosfato sono arancioni, gli zuccheri rossi e le basi marroni. (b) Un segmento di una catena polinucleotidica, in questo caso un singolo filamento di DNA. Le molecole di desossiribosio sono legate mediante legami fosfo-diesterici tra il carbonio 3' di uno zucchero e il carbonio 5' dello zucchero successivo.

I legami tra basi azotate, zucchero e acido fosforico

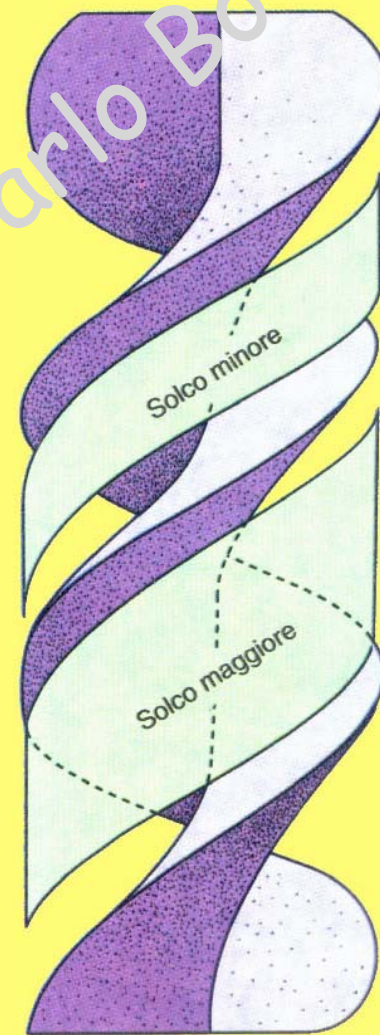
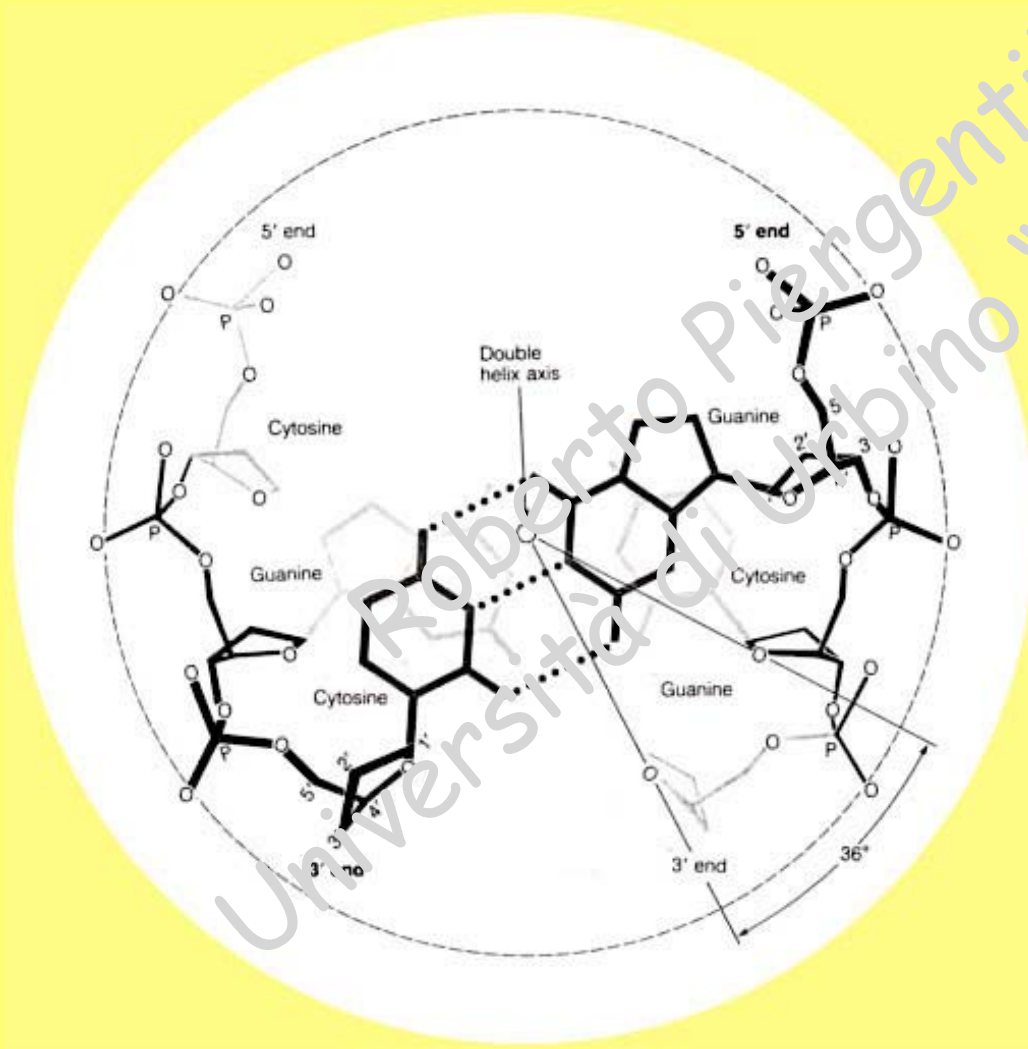
Organizzazione strutturale del

DNA

Il DNA è una
doppia elica
costituita da due
catene
polinucleotidiche
avvolte a spirale
e antiparallele.

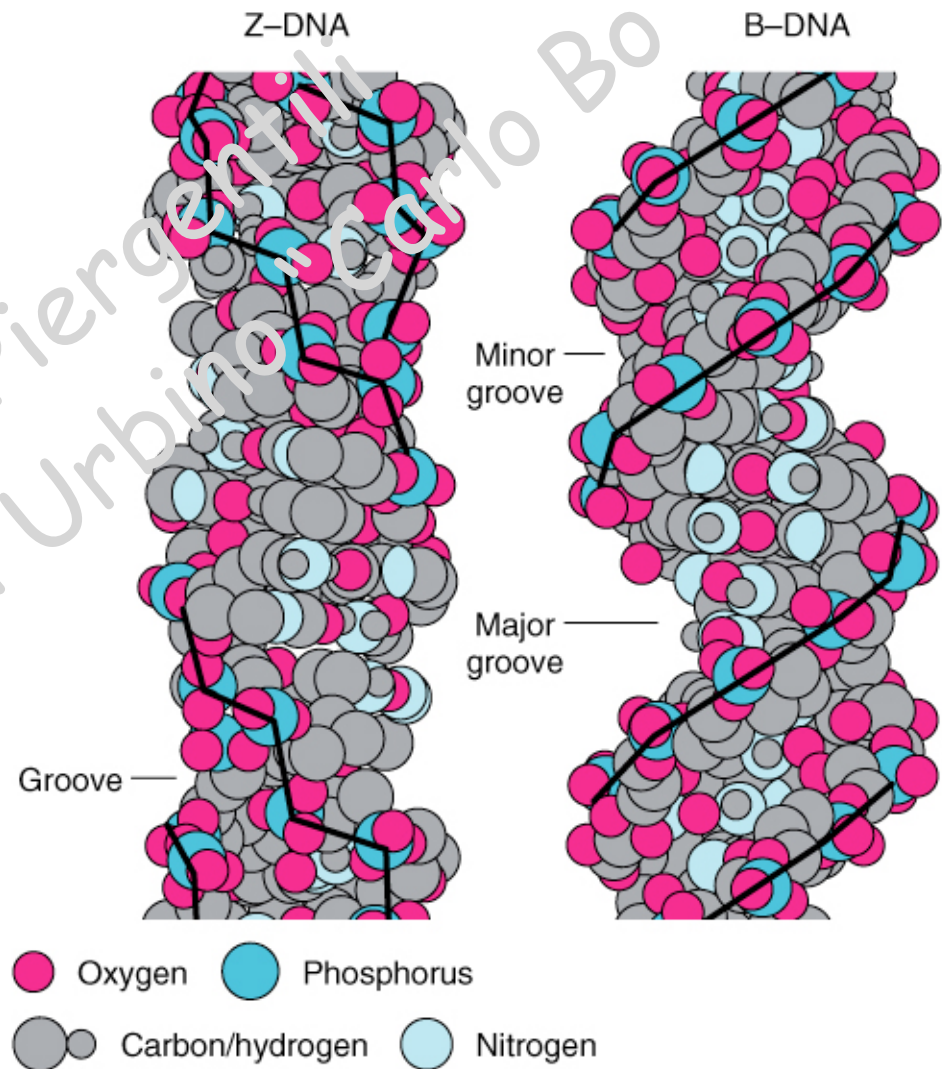
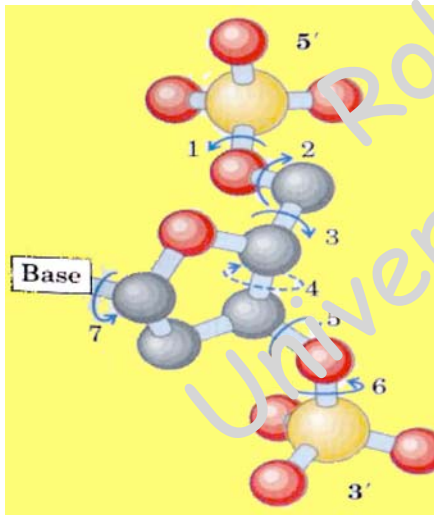


Solco maggiore e solco minore



Altre strutture del DNA

La grande flessibilità degli atomi attorno ai legami covalenti permette al DNA di assumere forme molteplici secondo le "circostanze ambientali".



Altre strutture del DNA

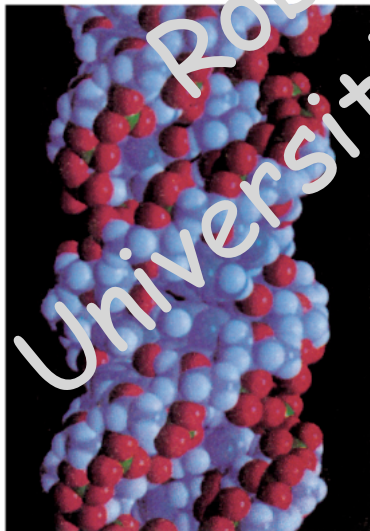
Tabella 2.3 Proprietà dell'A-DNA, del B-DNA e dello Z-DNA.

Proprietà	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
Direzione dell'elica	Destrosa	Destrosa	Sinistrorsa
Paia di basi per giro dell'elica	10,9	10,0	12,0
Morfologia generale	Corto e largo	Prismatico e sottile	Allungato e sottile
Solco maggiore	Estremamente stretto e molto profondo	Largo e di profondità intermedia	Appiattito sulla superficie dell'elica
Solco minore	Molto largo e poco profondo	Stretto e di profondità media	Estremamente stretto e molto profondo
Posizione dell'asse dell'elica	Solco maggiore	Attraverso le coppie di basi	Solco minore
Diametro dell'elica	2,2 nm	2,0 nm	1,8 nm

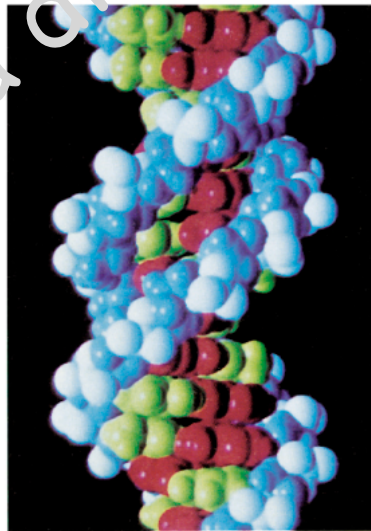
Figura 2.16

Modelli spaziali di diverse forme del DNA. (a) A-DNA. (b) B-DNA. (c) Z-DNA.

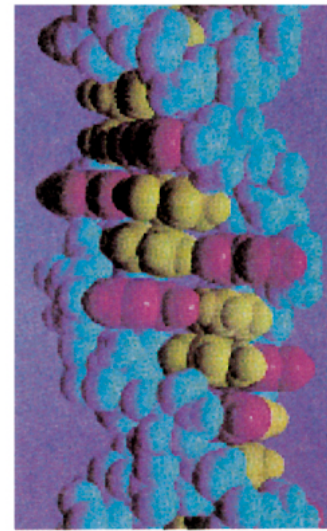
a)



b)

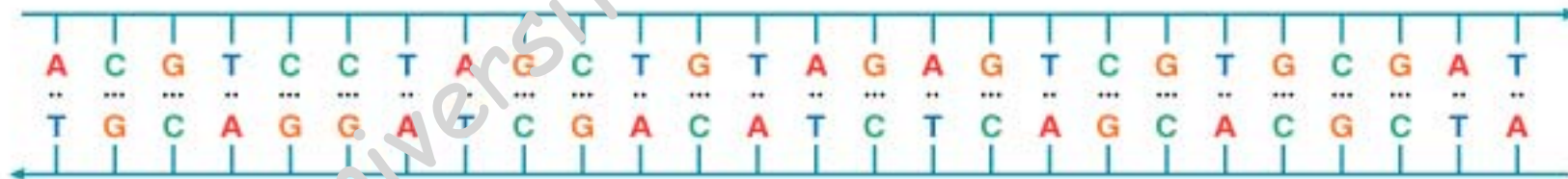


c)



Come si duplica il DNA?

Come accennarono nel loro lavoro Watson e Crick, la struttura stessa del DNA suggeriva come avveniva la sua trasmissione da una generazione all'altra. Grazie alla complementarità delle basi azotate nel formare legami idrogeno, queste potevano in qualche modo *dirigere* la sintesi di nuovo DNA indicando la sequenza con cui aggiungere le basi della doppia elica neoformata.



Copyright 2000 John Wiley and Sons, Inc.

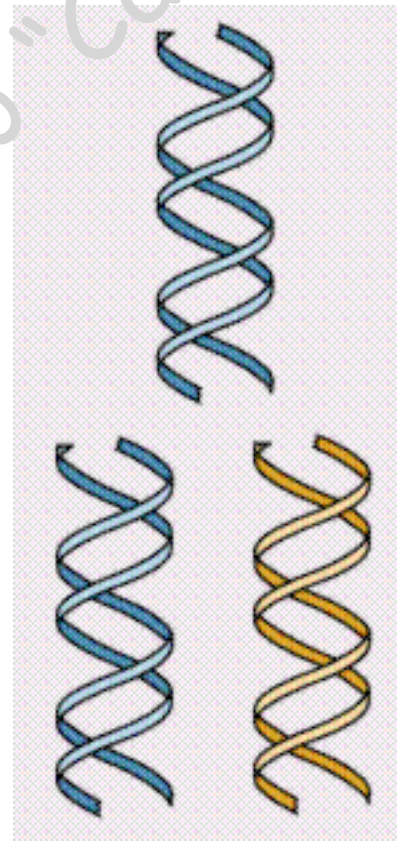
Tuttavia esistono vari modi per raggiungere tale scopo...

La replicazione del DNA

IPTESI 1: REPLICAZIONE CONSERVATIVA

Doppia elica di DNA
parentale

Molecole di DNA dopo
un ciclo replicativo

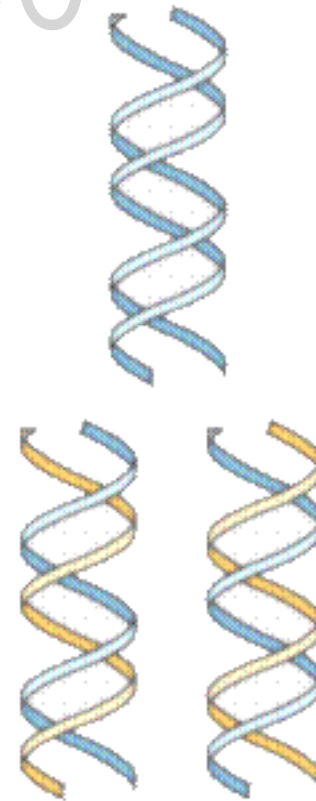


La replicazione del DNA

IPOTESI 2: REPLICAZIONE SEMICONSERVATIVA

Doppia elica di DNA
parentale

Molecole di DNA dopo
un ciclo replicativo

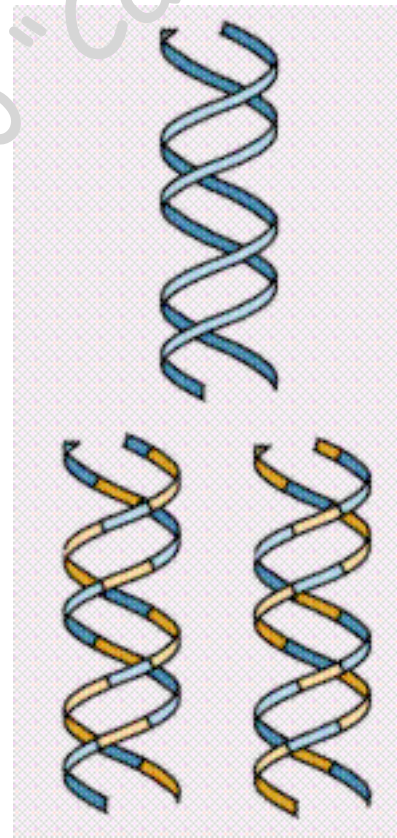


La replicazione del DNA

IPOTESI 3: REPLICAZIONE DISPERSIVA

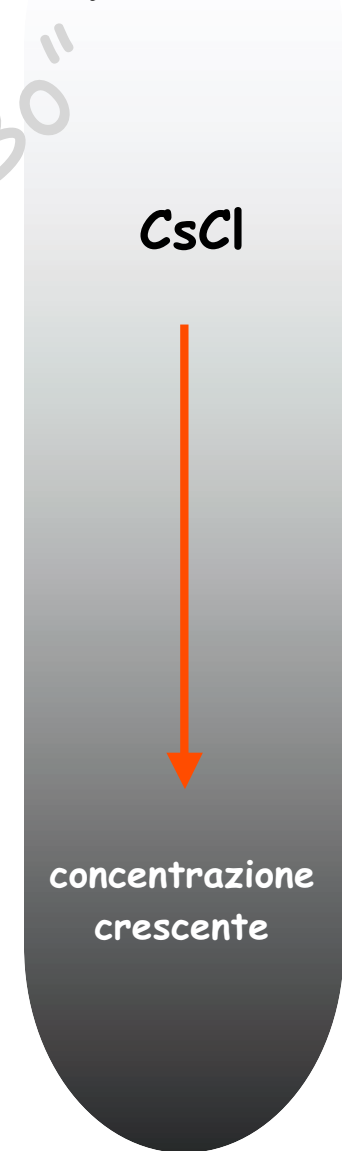
Doppia elica di DNA
parentale

Molecole di DNA dopo
un ciclo replicativo



Meselson e Stahl (1958)

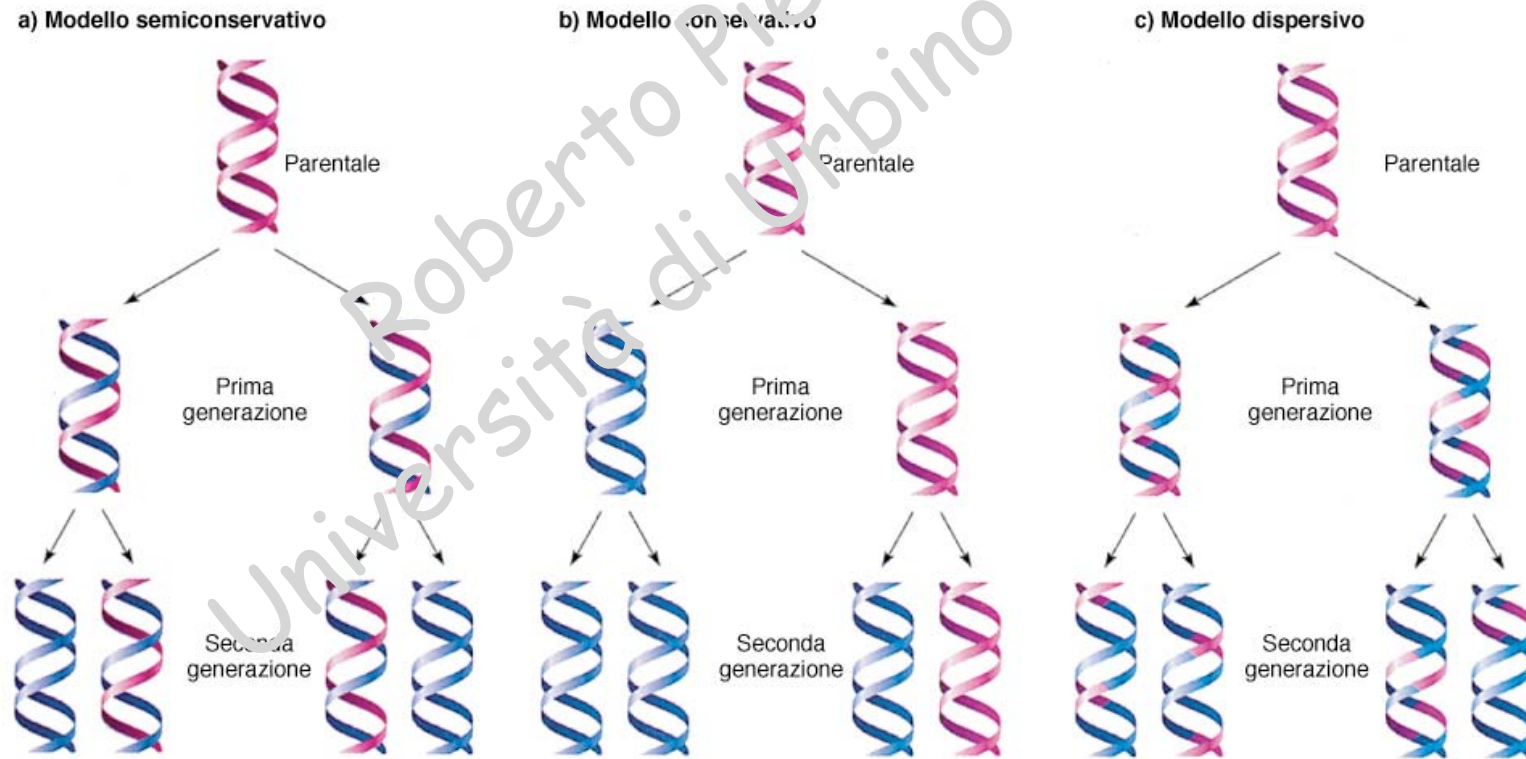
Grazie a quanto illustrato precedentemente, è possibile analizzare il comportamento del DNA attraverso vari cicli di replicazione. Come differenziare però il DNA? Meselson e Stahl idearono un sistema *in vivo* costruito in questo modo: fecero crescere *E. coli* in presenza di ^{15}N (isotopo pesante del normale ^{14}N atmosferico) per n generazioni, in modo che **tutto** il DNA del batterio incorporasse ^{15}N . Questo DNA *pesante* corre in modo diverso in un gradiente di cloruro di cesio, e forma una banda di altezza diversa rispetto al DNA "normale" (^{14}N), in corrispondenza del suo punto isostatico (*galleggiamento*). Analogamente, il DNA misto correrà in modo diverso da quello tutto pesante o tutto leggero, permettendo quindi di capire cosa è avvenuto.



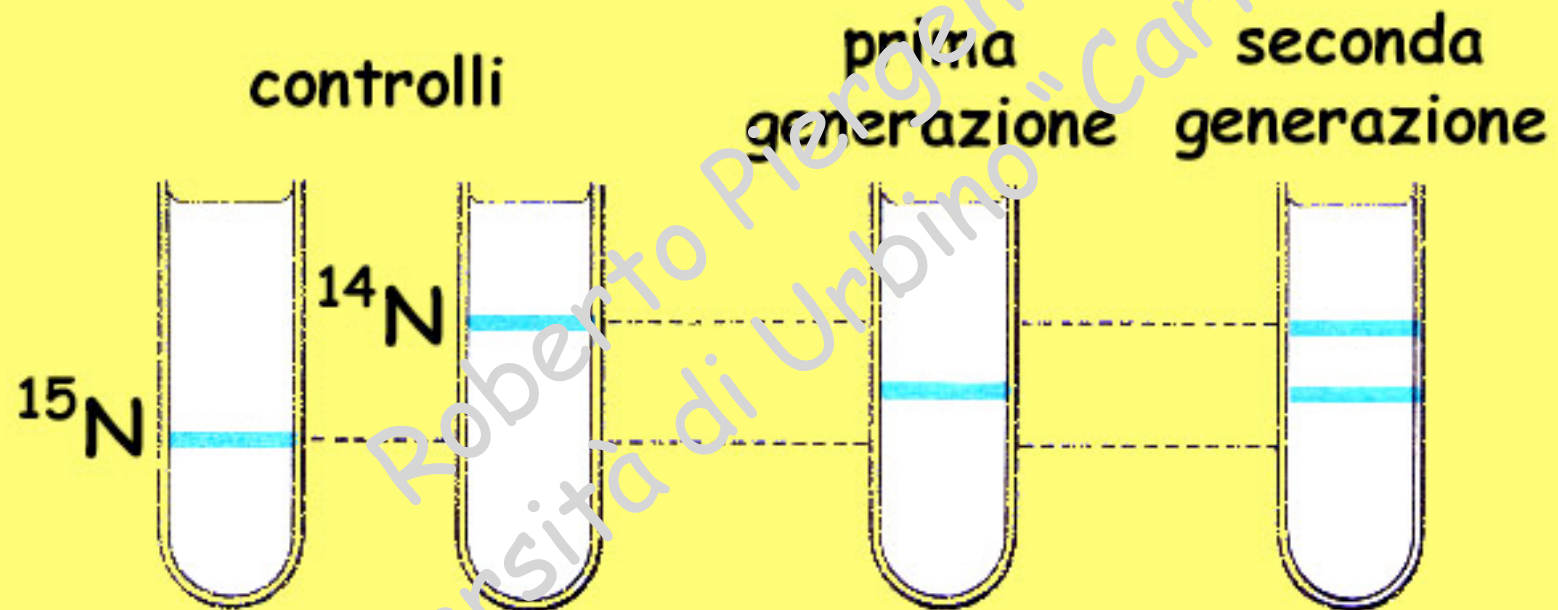
Tutti i modelli permettono di fare previsioni su più cicli replicativi

Figura 3.1

Tre modelli per la replicazione del DNA. (a) Il modello semiconservativo (il modello corretto). (b) Il modello conservativo. (c) Il modello dispersivo. I filamenti parentali sono mostrati in grigio e quelli neosintetizzati sono mostrati in rosso.



I risultati ottenuti

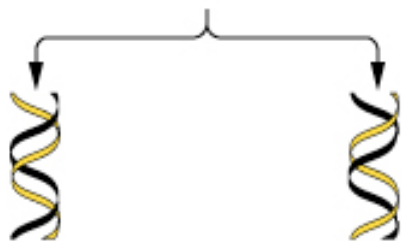


Il DNA si replica in maniera SEMICONSERVATIVA!

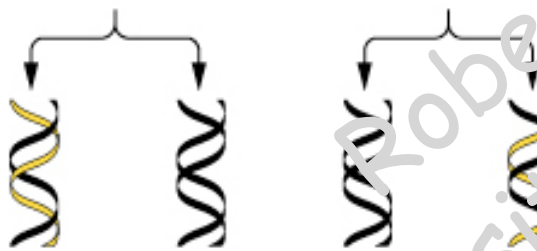
1 *E. coli* cells are grown on ^{15}N for several generations.



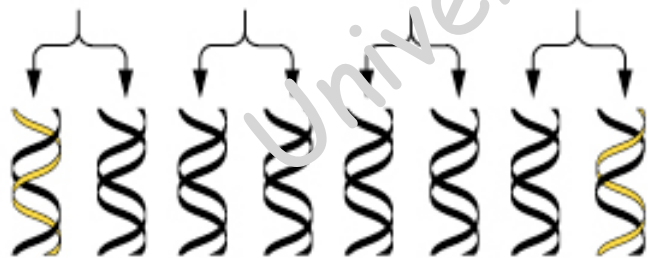
3 Cells are then transferred to medium containing ^{14}N for one generation.



5 For two generations.



7 For three generations.



2

DNA is extracted and analyzed by CsCl density gradient centrifugation.

4

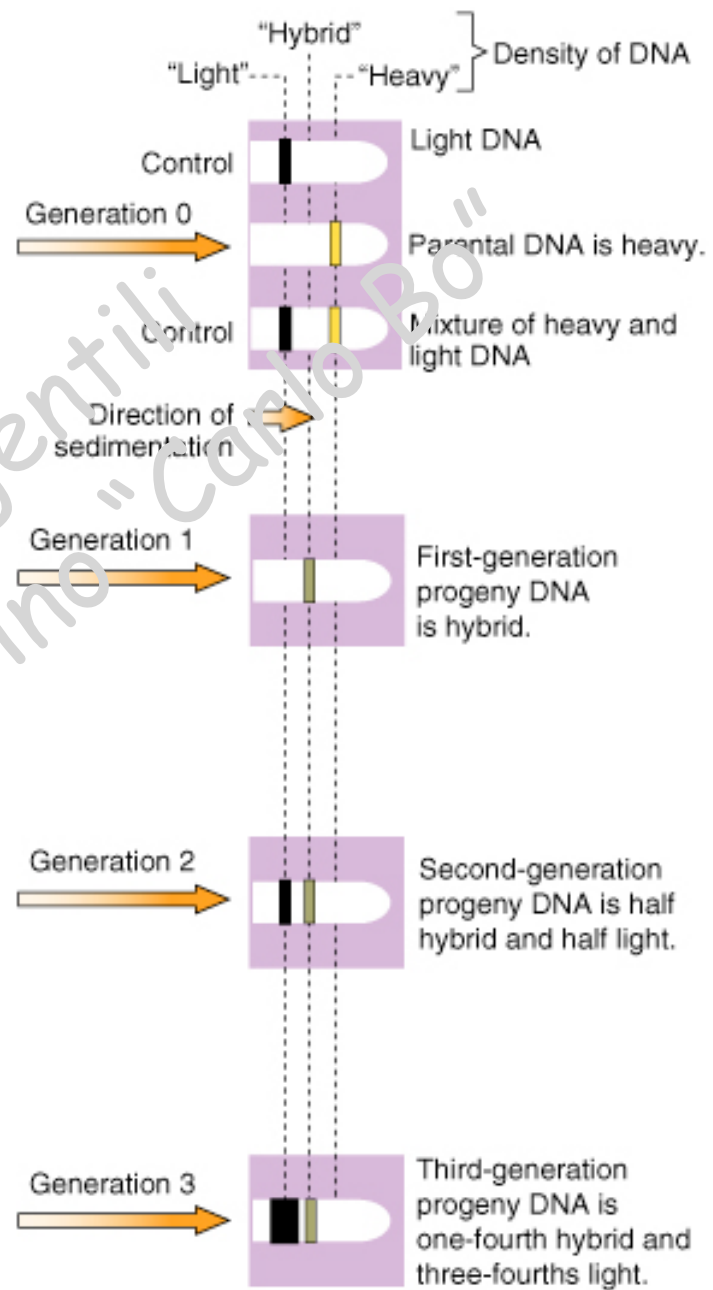
DNA is extracted and analyzed.

6

DNA is extracted and analyzed.

8

DNA is extracted and analyzed.



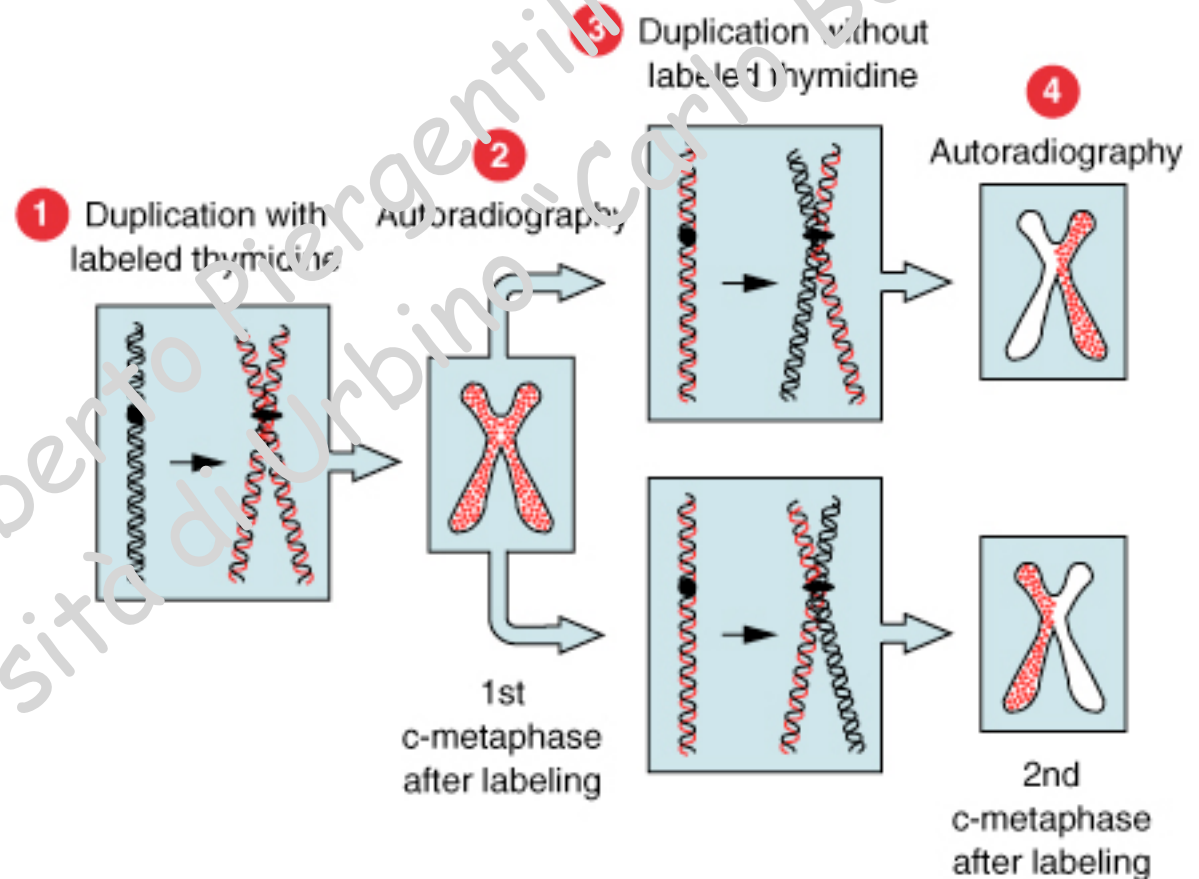
in vitro e in vivo

I risultati di Meselson e Stahl erano stati ottenuti su batteri tenuti forzatamente in presenza, per molte generazioni, di azoto pesante. Bisognava ancora dimostrare:

- che un sistema meno *invasivo* dava gli stessi risultati;
- che la replicazione semiconservativa è valida anche per gli eucarioti.

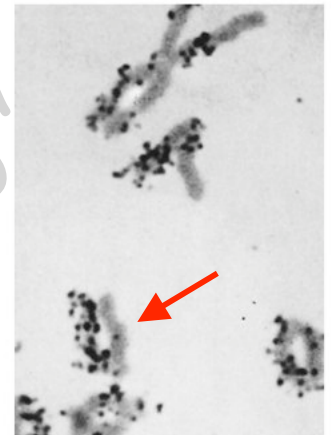
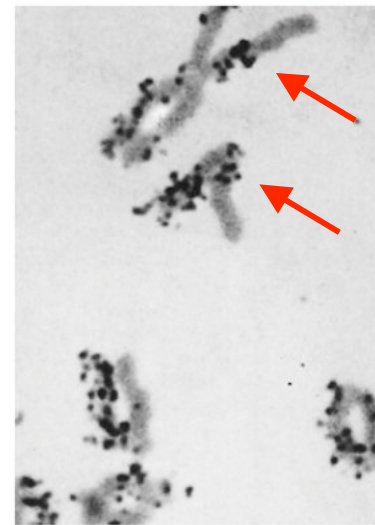
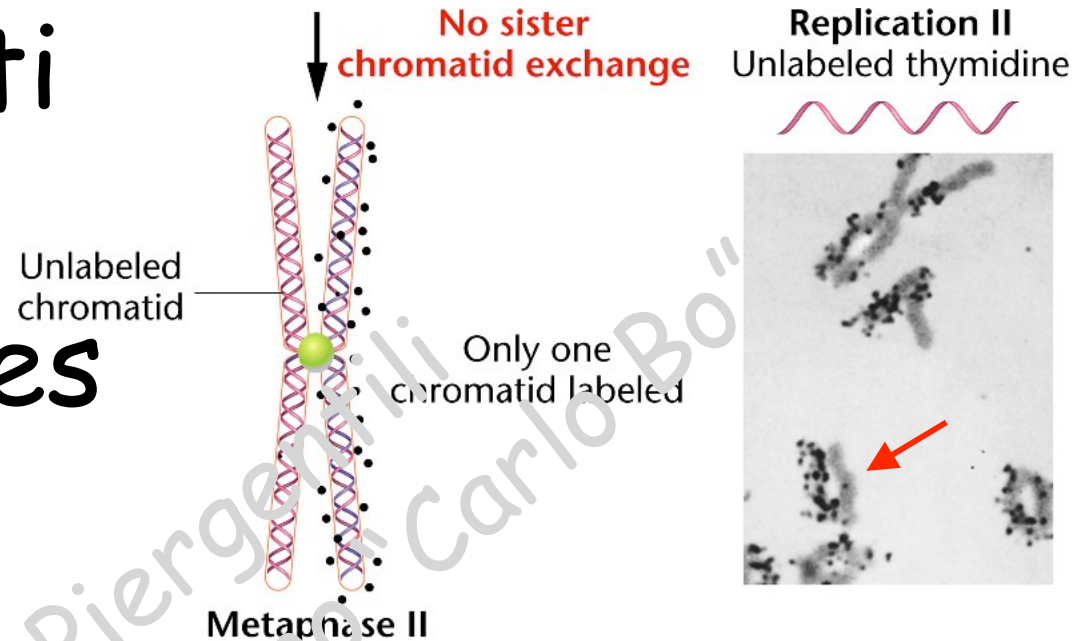
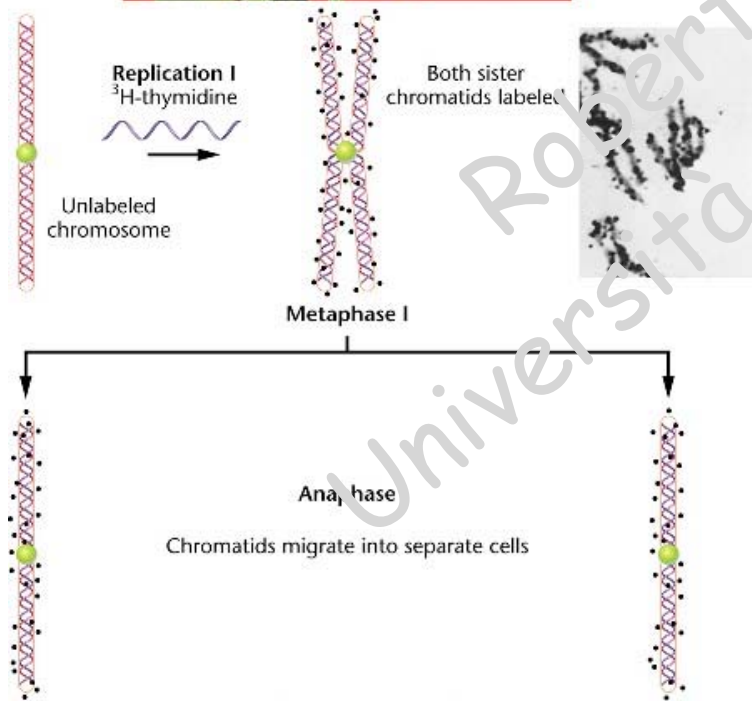
Taylor (1958)

Taylor dimostrò negli eucarioti che la replicazione del DNA è semiconservativa. Egli usò gli apici radicali delle piante (in attiva divisione), sincronizzò le cellule tramite colchicina e le colorò con ^3H - timidina, rivelata poi per autoradiografia.

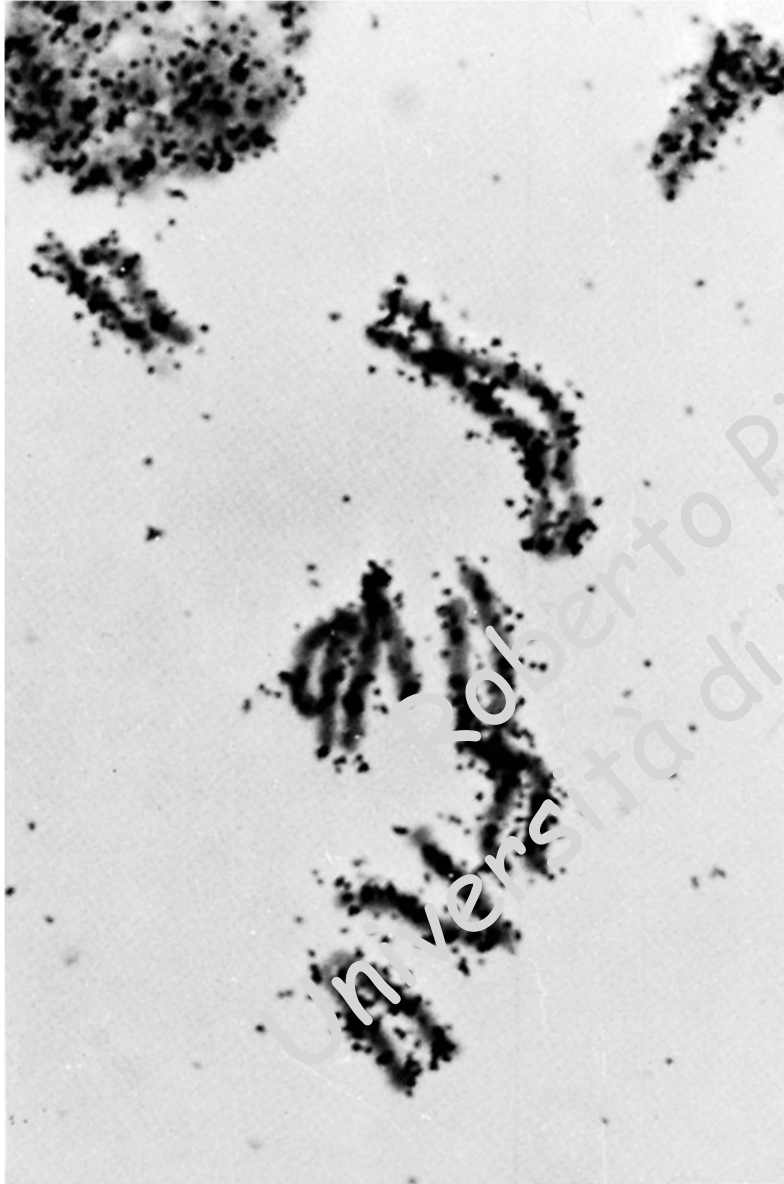


(c) Interpretation of the autoradiographs above in terms of semiconservative replication.

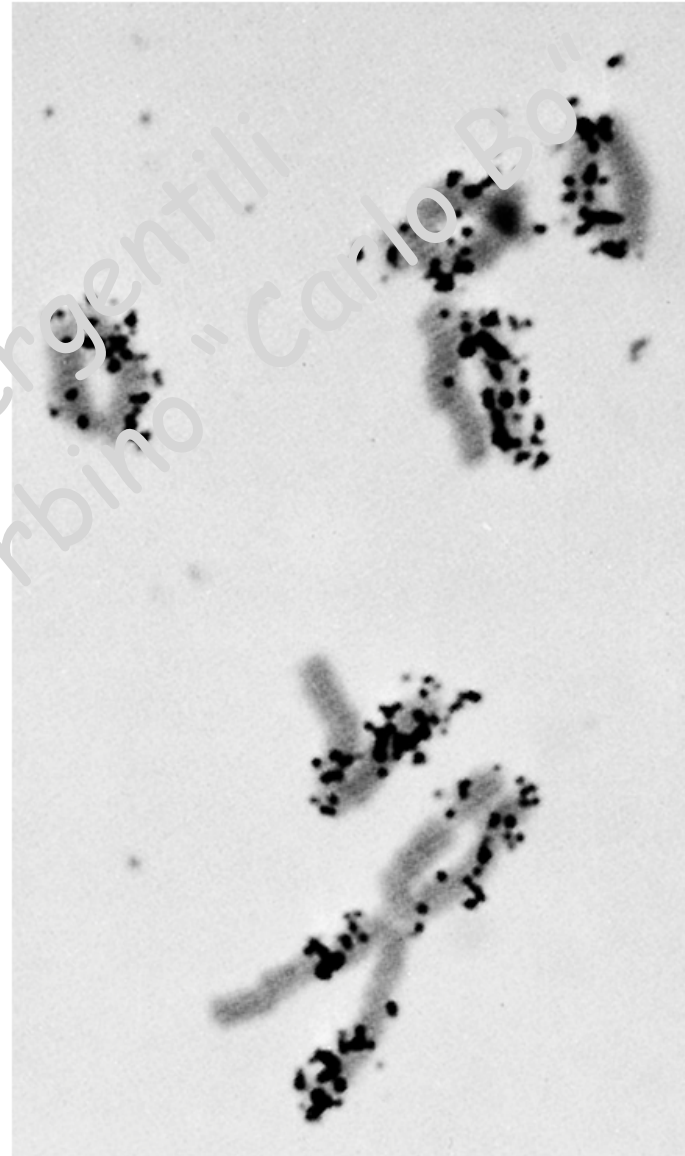
Gli esperimenti di Taylor, Woods e Hughes



Taylor (1958)



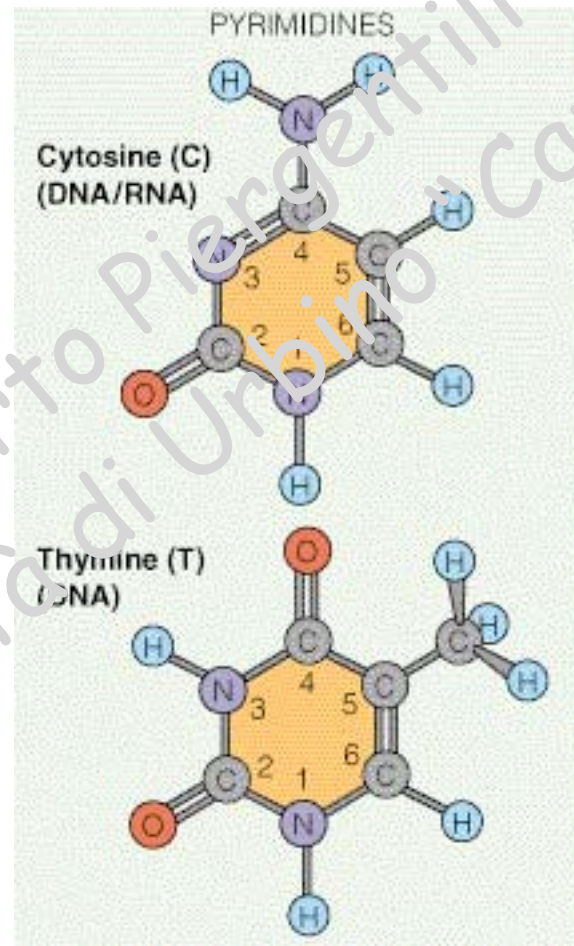
From J. H. Taylor, "The Replication and Organization of DNA in Chromosomes," *Molecular Genetics*, Par I. J. H.



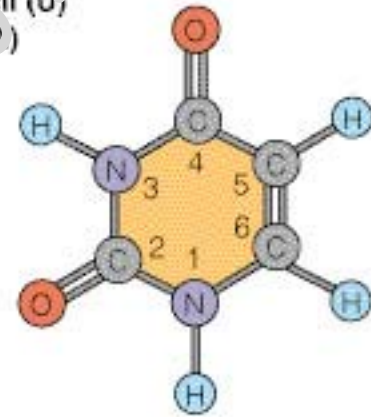
From J. H. Taylor, "The Replication and Organization of DNA in Chromosomes," *Molecular Genetics*, Par I. J. H.

L'uso della BrdU

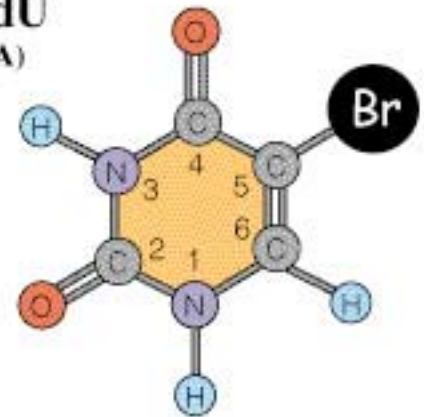
Lo stesso risultato si può ottenere anche tramite colorazioni alternative del DNA, come per esempio con la Bromo-deossi Uridina (BrdU). Questo "analogo di base" può sostituire nel DNA la timidina, fluoresce in maniera diversa e/o può essere rilevato con anticorpi specifici.



Uracil (U)
(RNA)

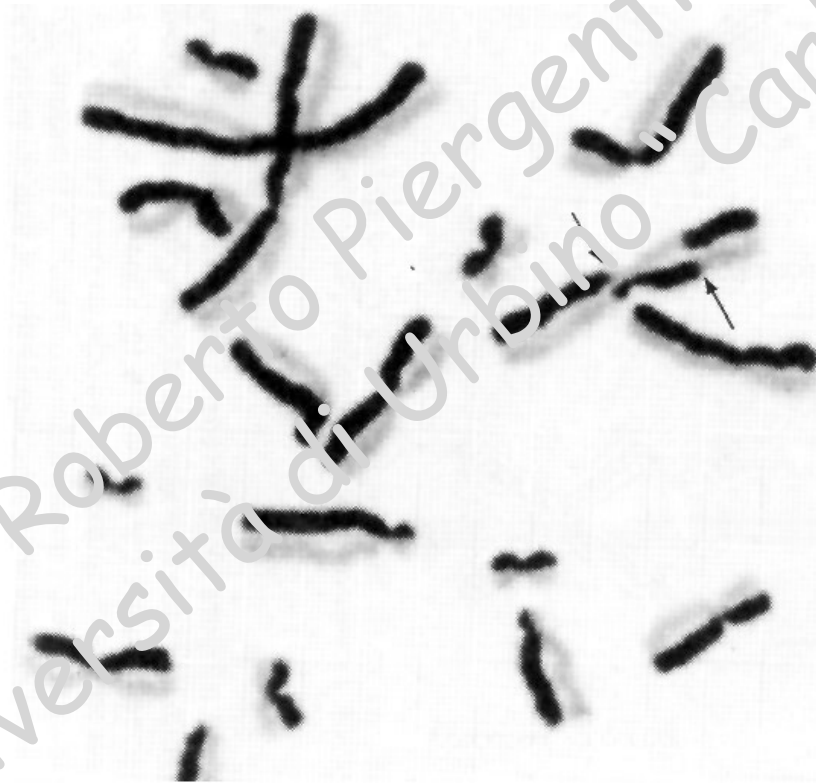


BrdU
(DNA)



Risultato citologico con BrdU

(cromosomi arlecchينو)



Tra l'altro, i cromosomi *arlecchino* forniscono la prova citologica del *crossing over* mitotico!