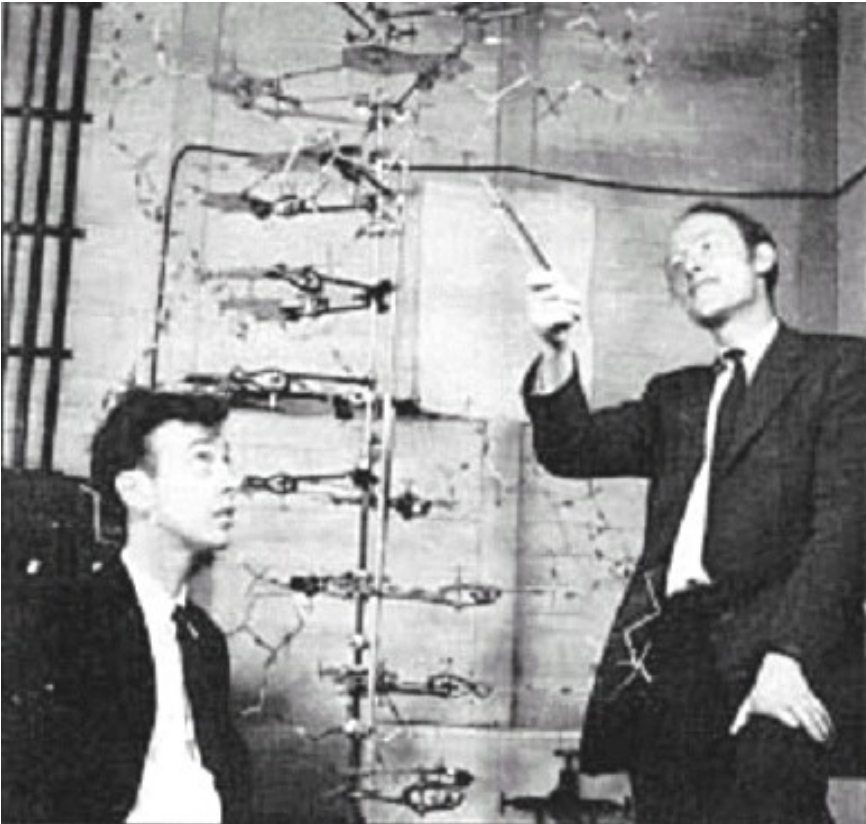
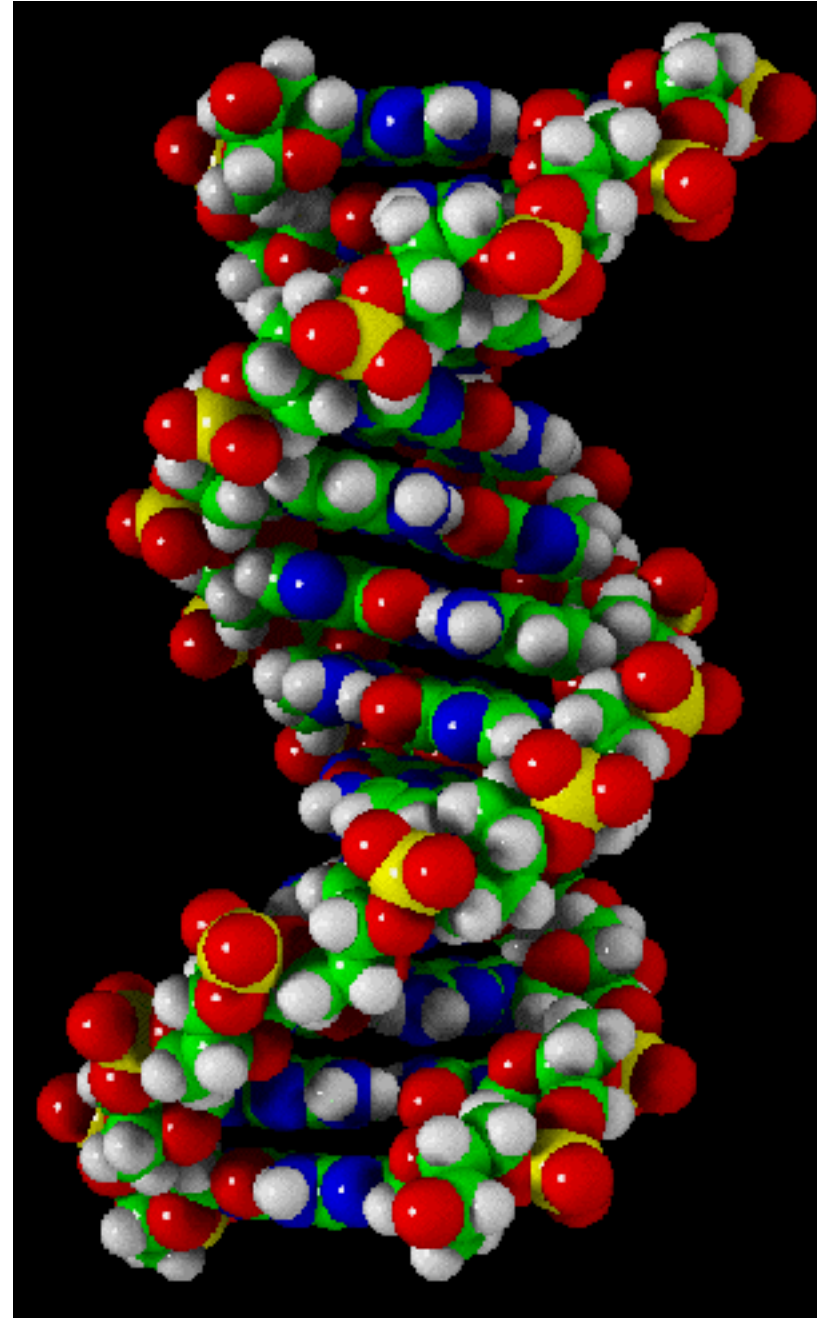


DNA



La scoperta della struttura del DNA avvenne alla Cambridge University nel **1953**, da parte dell'americano **James D. Watson**, ed un inglese, **Francis H. Crick**. Il loro modello per la struttura del DNA era principalmente basato su studi di diffrazione dei raggi X, ottenuti da Maurice Wilkins e Rosalind Franklin.

ACIDI NUCLEICI



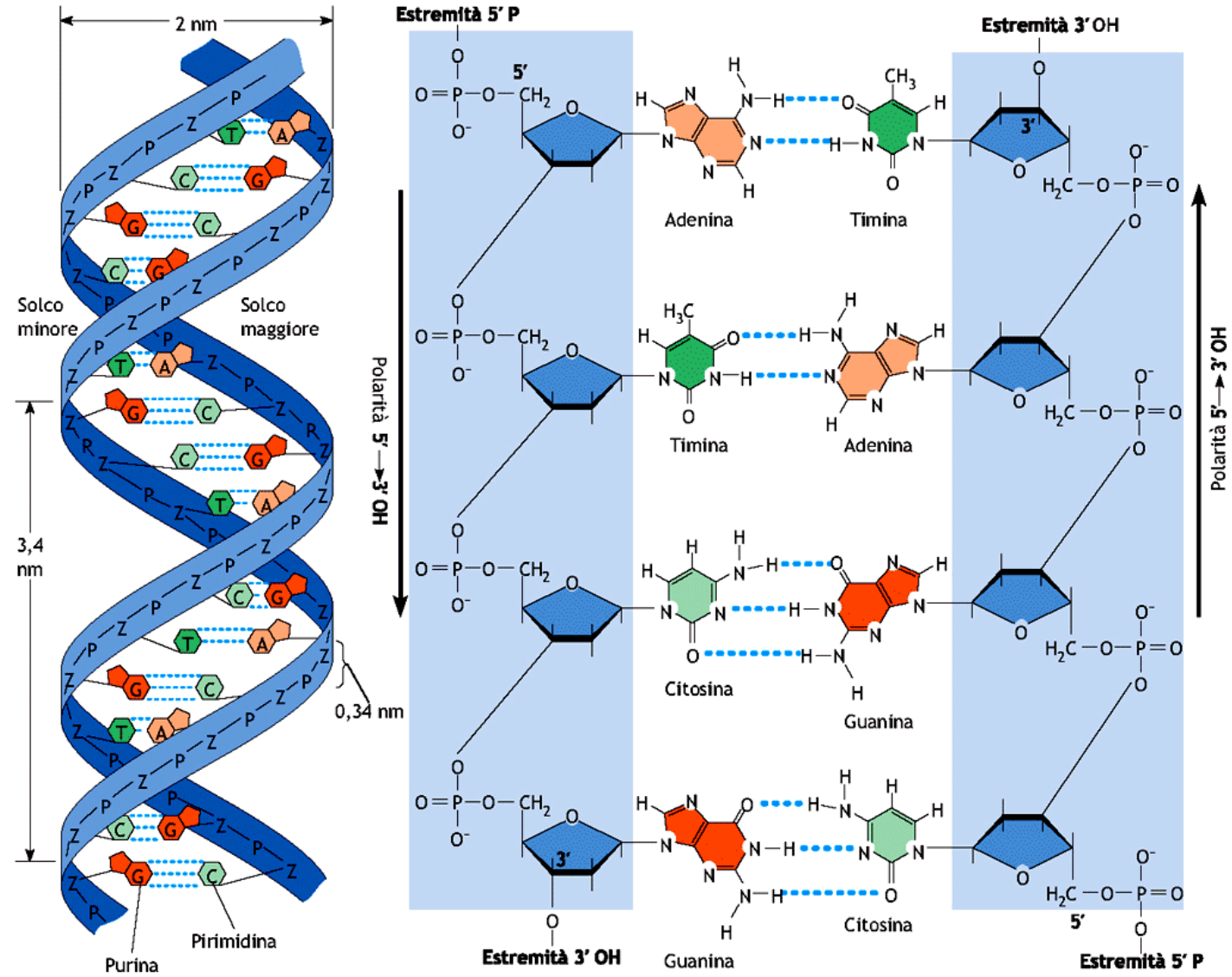
ACIDI NUCLEICI

DNA

Le coppie di basi sono distanti 0.34 nm. Un giro completo (360°) della doppia elica richiede 3.4 nm, cioè 10 coppie di basi.

Il diametro della doppia elica è di 2 nm.

La doppia elica presenta due solchi: un **solco maggiore** ed un **solco minore**.



La struttura laterale del DNA è composta da unità ripetute ed alternate di gruppi fosfato e di 2-deossiribosio

Figura 1.51 Le due eliche del DNA sono complementari e antiparallele. I legami idrogeno che si instaurano fra le basi complementari sono indicati dalle linee tratteggiate in blu. Gli accoppiamenti canonici nel DNA prevedono le coppie A=T e C=G. Nei tratti a doppia elica dell'RNA, la coppia A=T è sostituita dalla coppia A=U. Inoltre, le due eliche (che hanno polarità 5'P → 3'OH) decorrono in direzione opposta (antiparallelismo).

LA CELLULA PROCARIOTICA

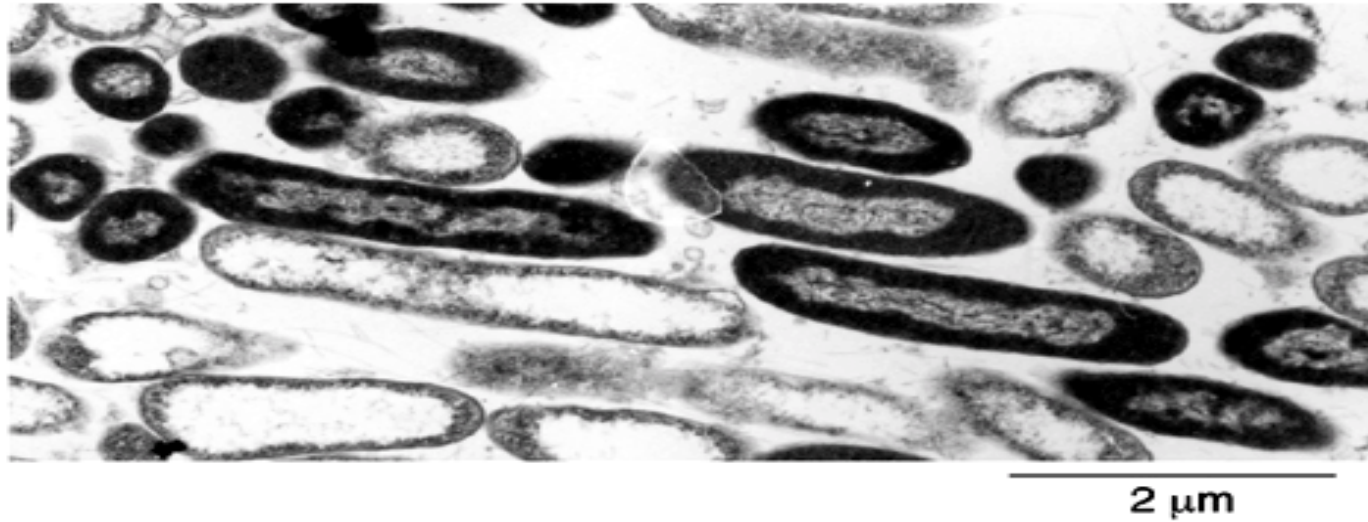
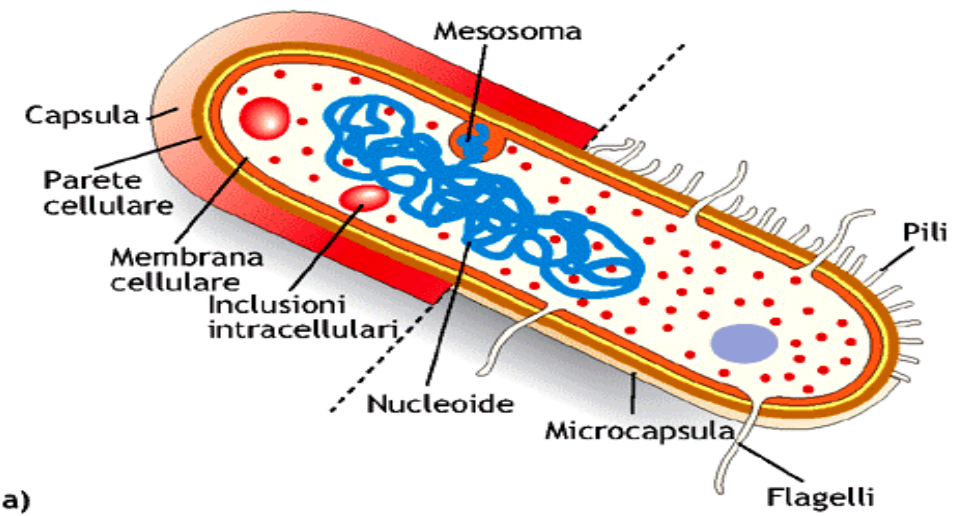
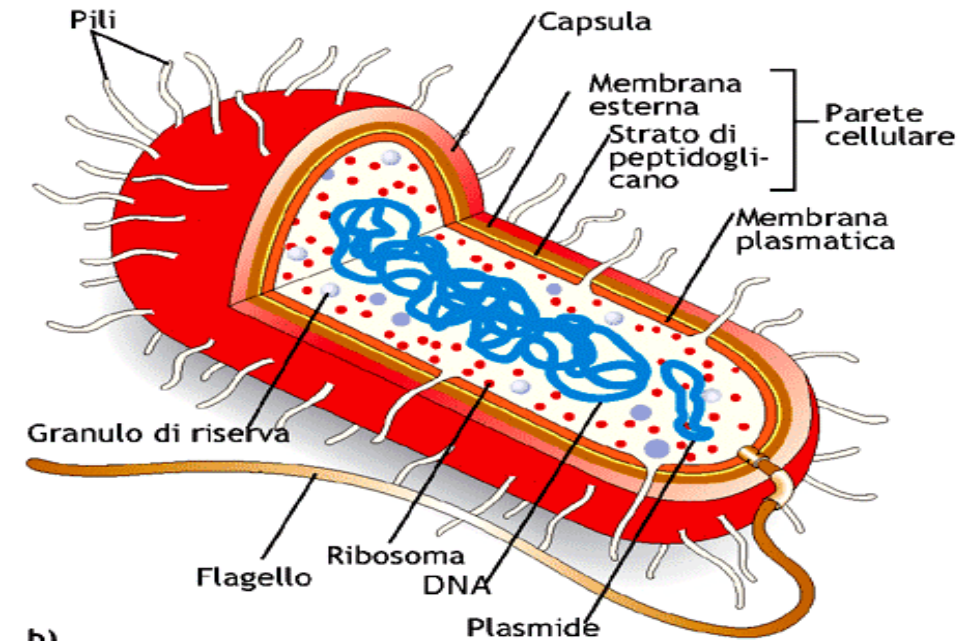


Figura 2.9 I batteri sono cellule molto semplici. Cellule batteriche osservate al microscopio elettronico a trasmissione in sezione longitudinale e trasversale. Da notare l'estrema semplicità di organizzazione. Il DNA della cellula si trova nelle zone a colorazione chiara. (Foto Di Bella).



a)



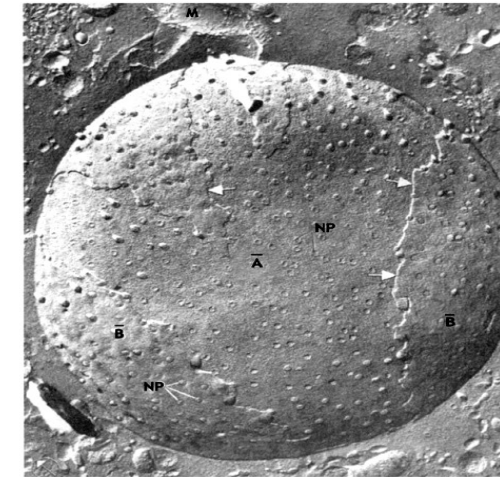
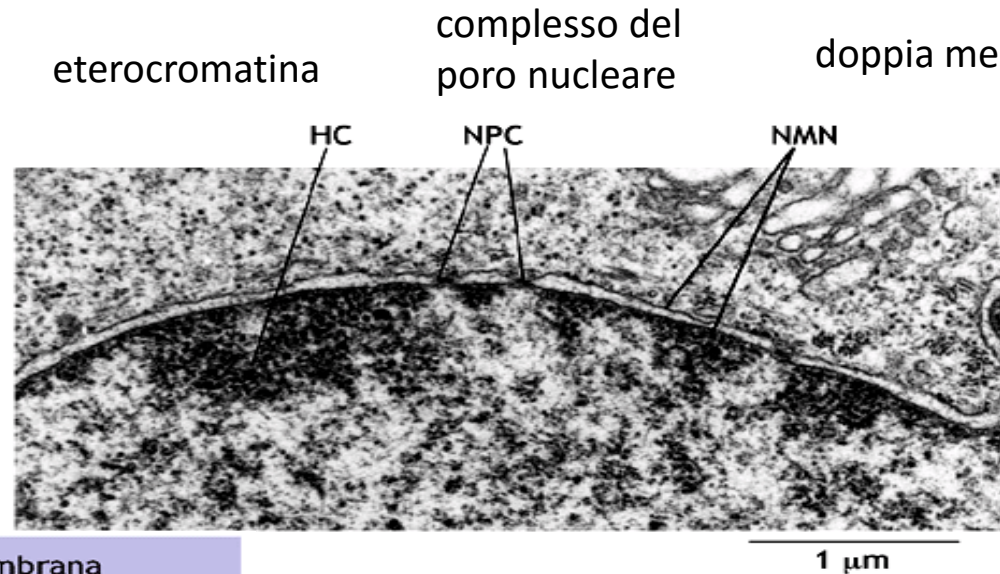
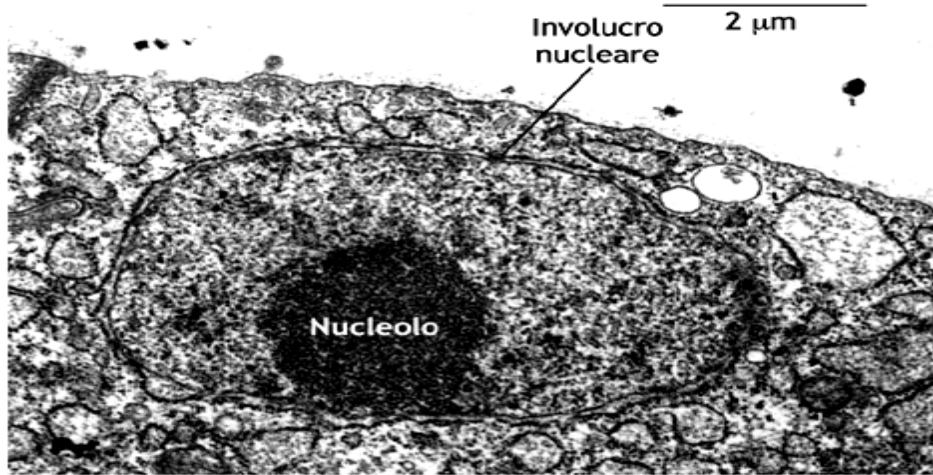
b)

Figura 2.11 Schema delle principali strutture riscontrabili in una generica cellula batterica. (a) A sinistra della linea tratteggiata sono indicate le strutture di un batterio provvisto di capsula batterica e privo di appendici; a destra della linea tratteggiata è mostrata una cellula batterica con pili e flagelli. (b) Spaccato di una cellula batterica con pili e flagello.

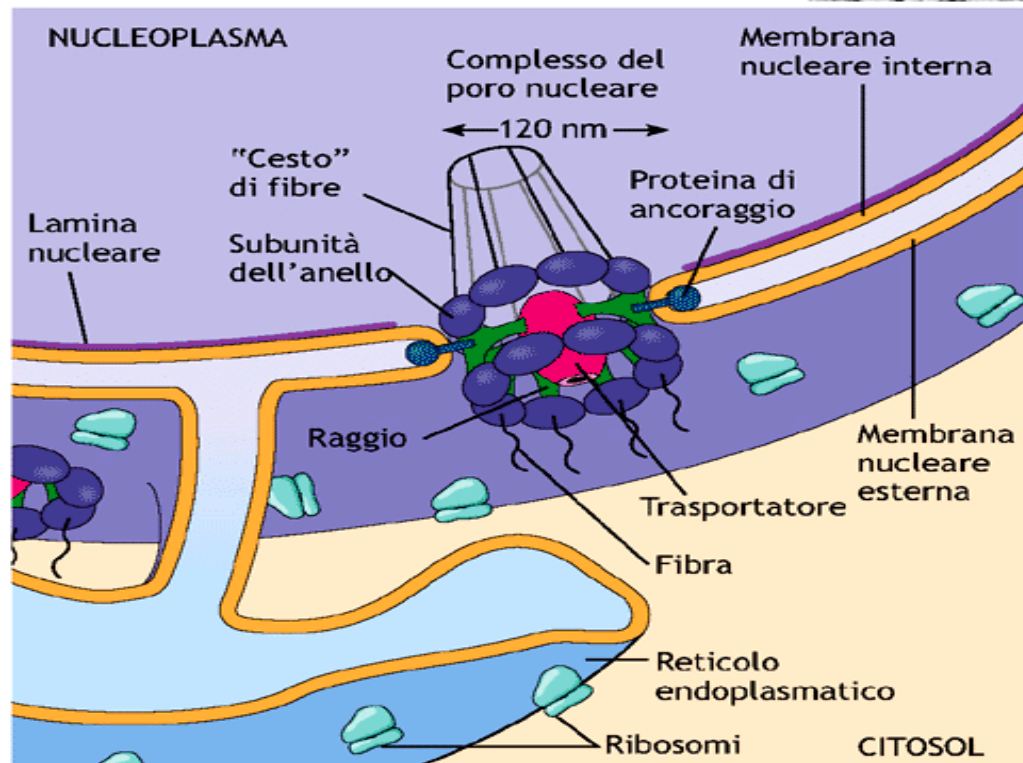
LE MEMBRANE BIOLOGICHE

è interrotta

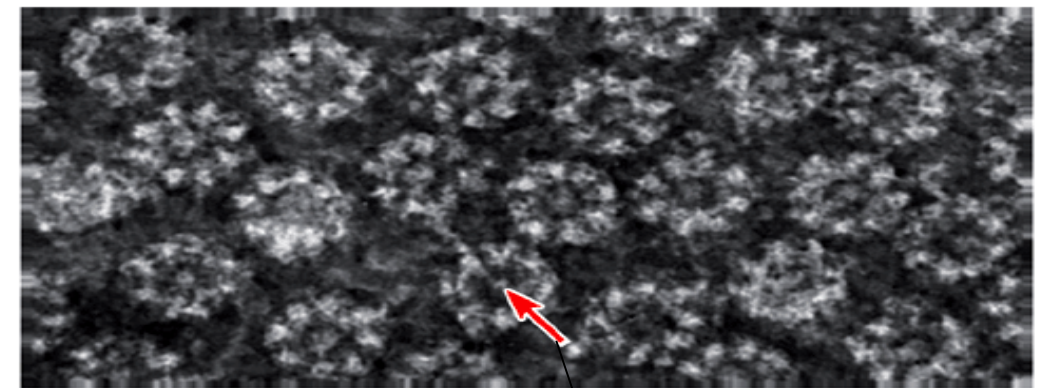
La membrana nucleare



Pori nucleari:
strutture
ottagonali

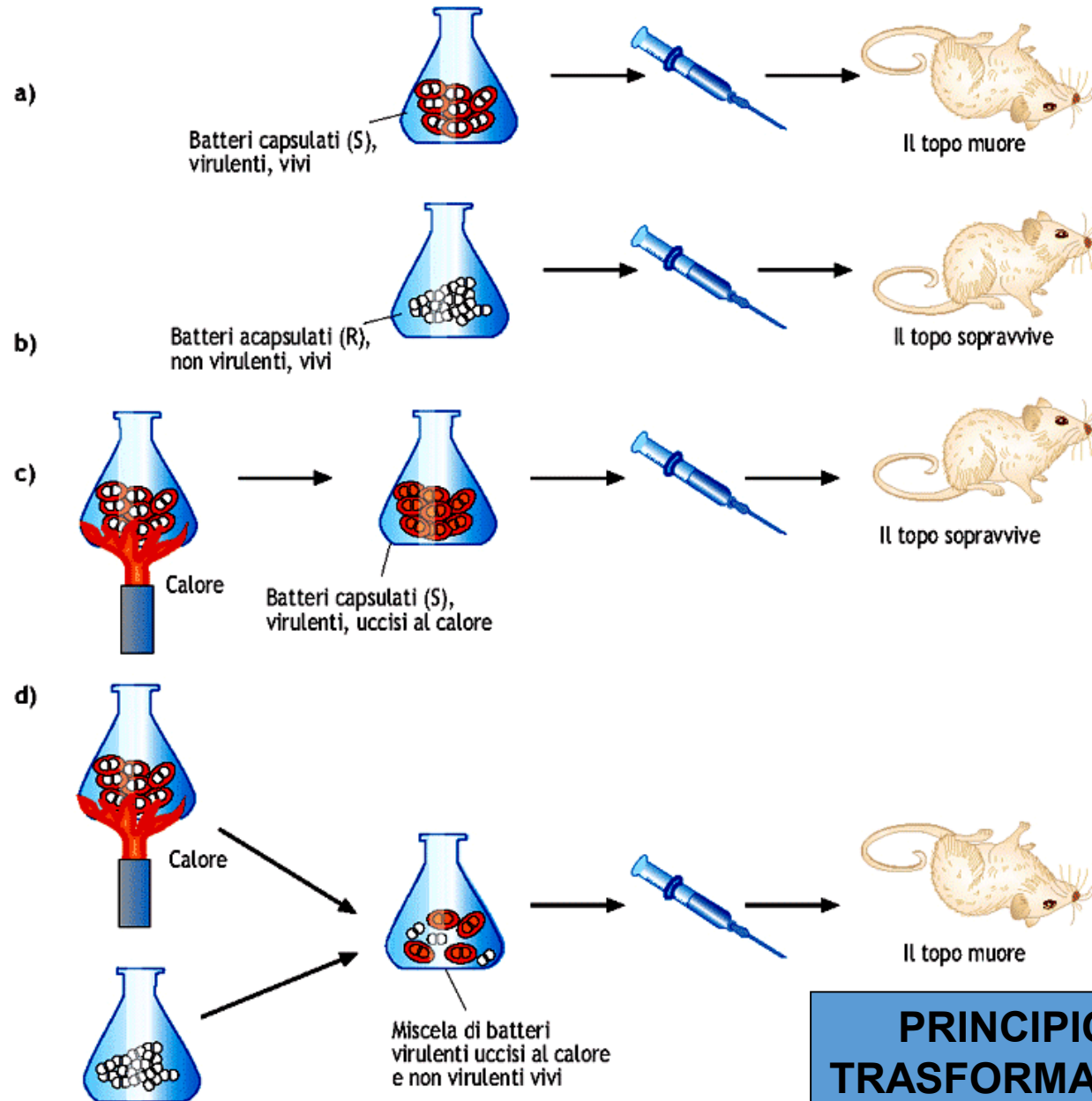


Continuità della m.n.
con quella del RER



ACIDI NUCLEICI

Il DNA è il depositario dell'informazione genetica.



Esperimento di Griffith, 1928.

Nonostante il DNA fosse noto sin dal 1869, la sua identificazione come materiale genetico è avvenuta solo nel 1944 ed è intimamente legata agli studi sulla virulenza del microrganismo, il *Diplococcus pneumoniae*, o più semplicemente pneumococco, che causa la polmonite nei mammiferi. I pneumococchi possono esistere in 2 varietà:

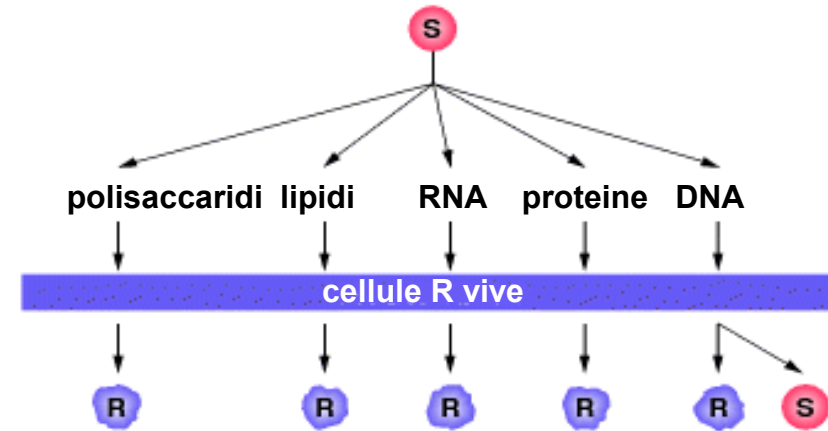
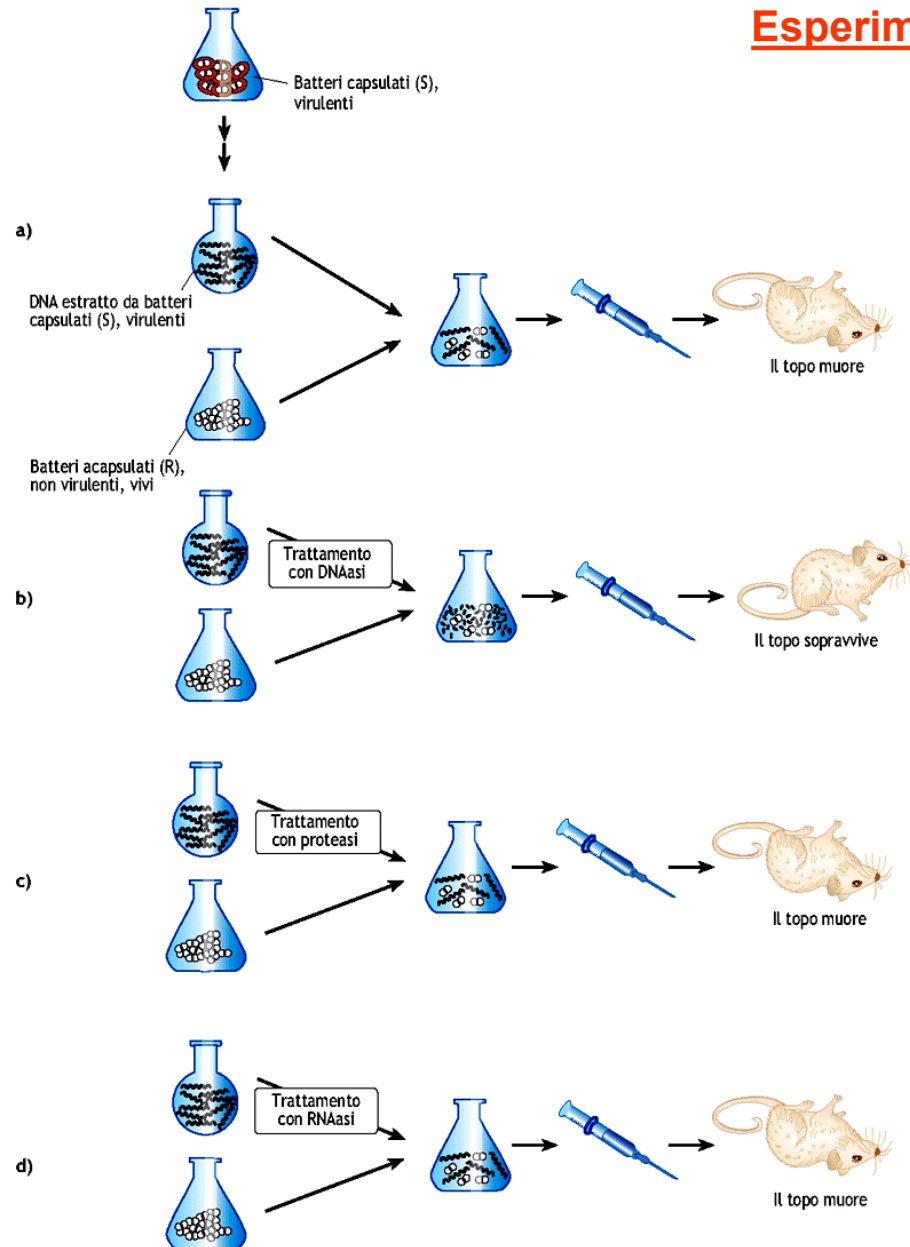
- 1) **virulenti (ceppo S)**, provvista di una capsula polisaccaridica di rivestimento che ne impedisce la fagocitosi;
- 2) **non virulenti (ceppo R)**, sprovvista di capsula.

**PRINCIPIO
TRASFORMANTE**

ACIDI NUCLEICI

Il DNA è il depositario dell'informazione genetica.

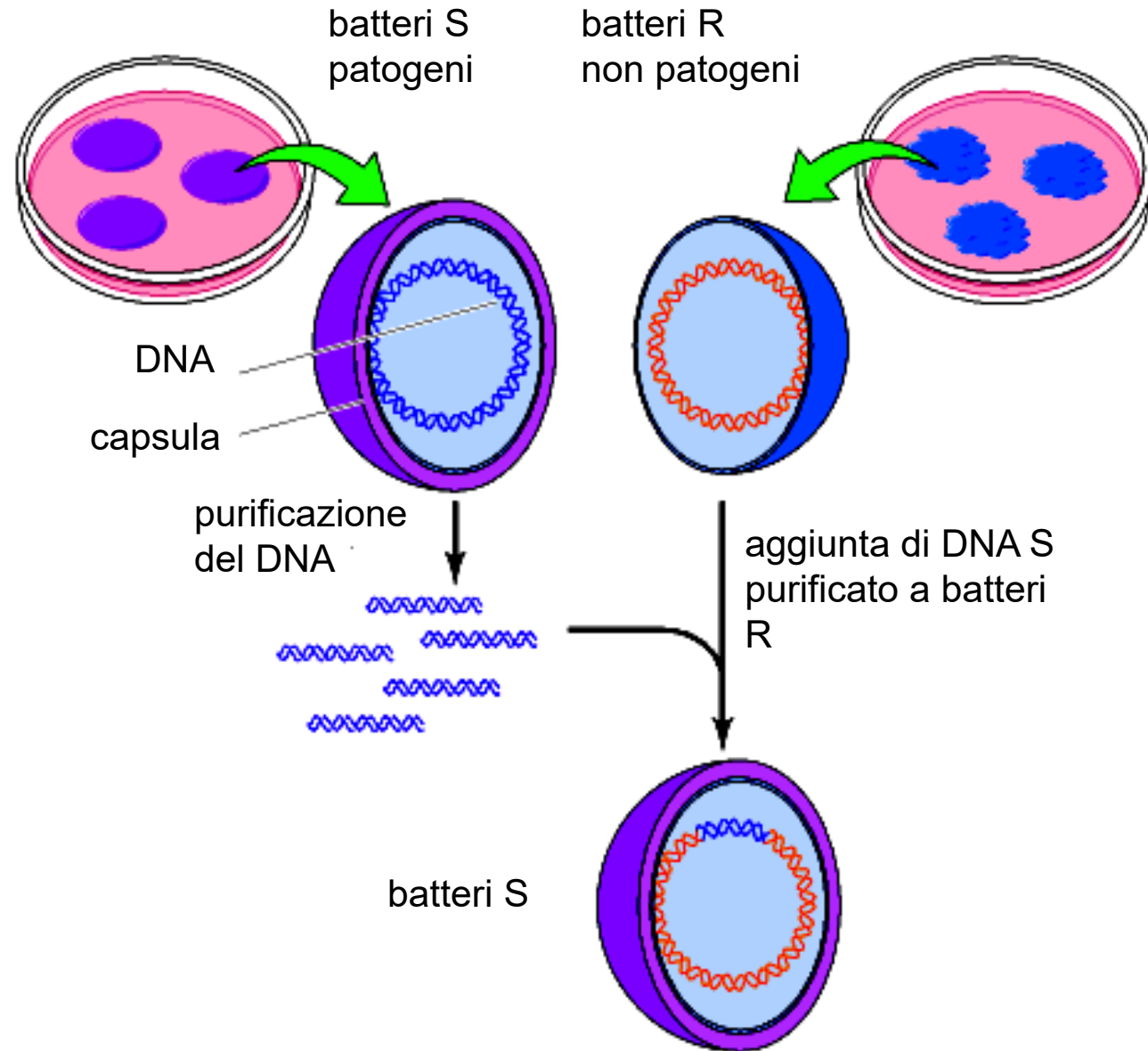
Esperimento di O. Avery, C. MacLeod, M. McCarty, 1944



Stabilirono che il principio trasformante era il DNA, purificandolo da estratti batterici e al tempo stesso dimostrando che l'attività del principio trasformante veniva eliminata dalla digestione enzimatica del DNA ma non dalla digestione delle proteine.

ACIDI NUCLEICI

Il DNA è il depositario dell'informazione genetica.

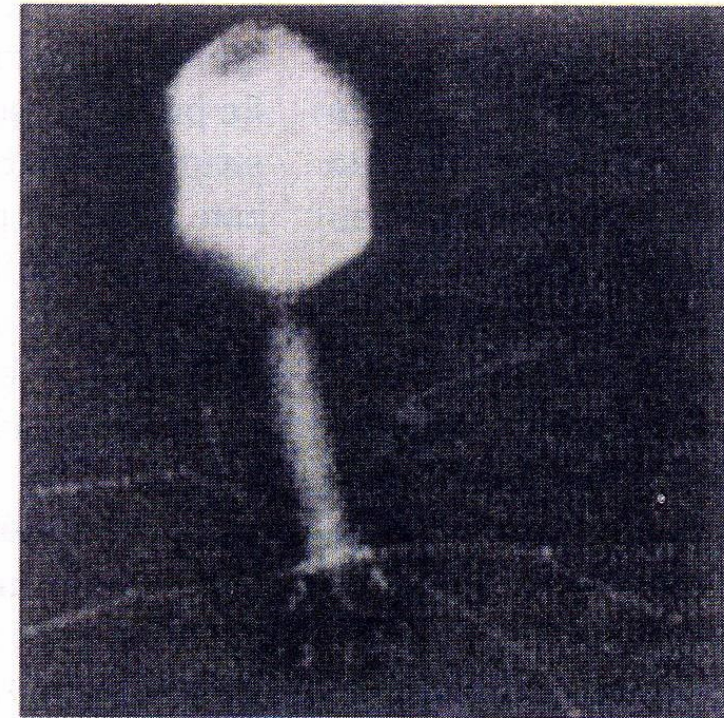
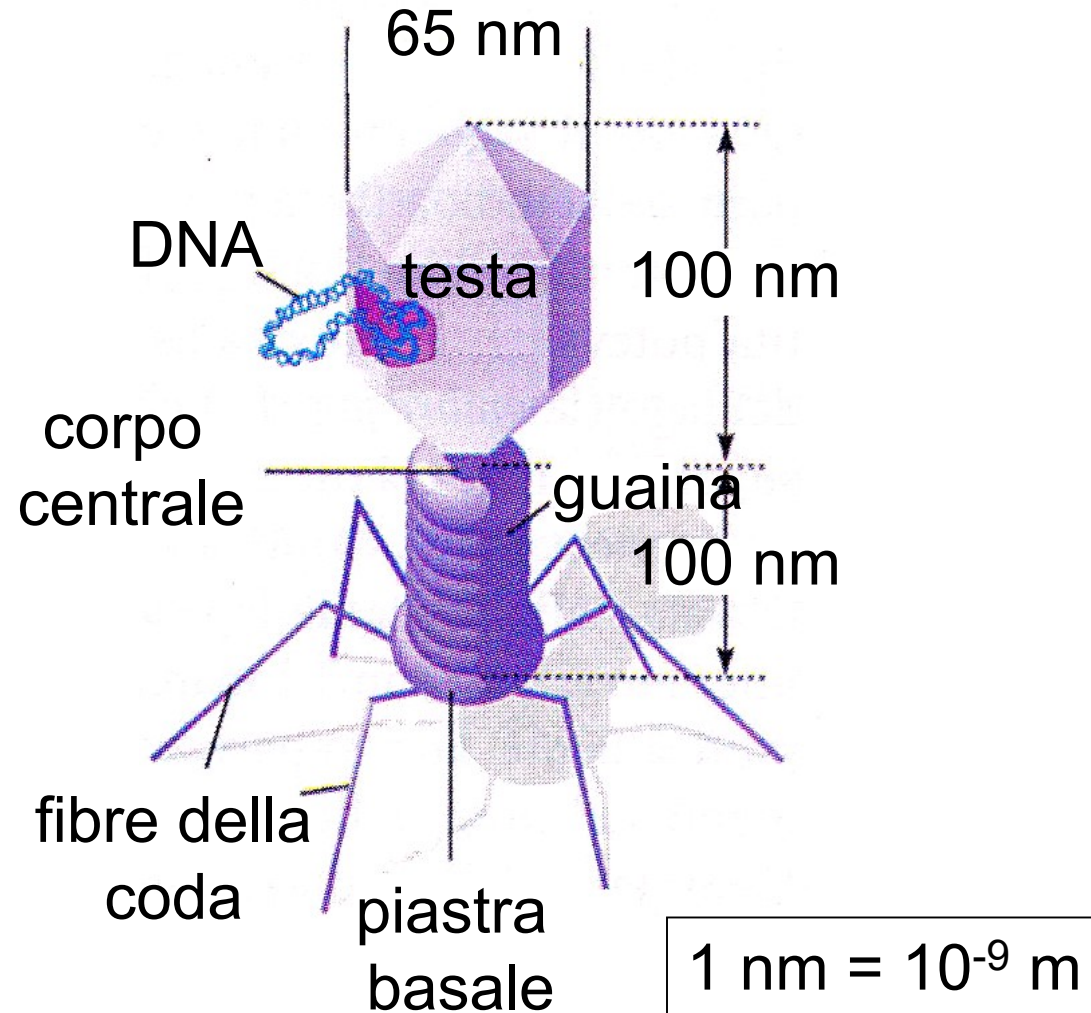


ACIDI NUCLEICI

Il DNA è il depositario dell'informazione genetica.

Esperimento di Hershey e Chase, 1953

Alfred Harshey e Martha Chase stavano studiando nel 1953 un batteriofago chiamato T2.

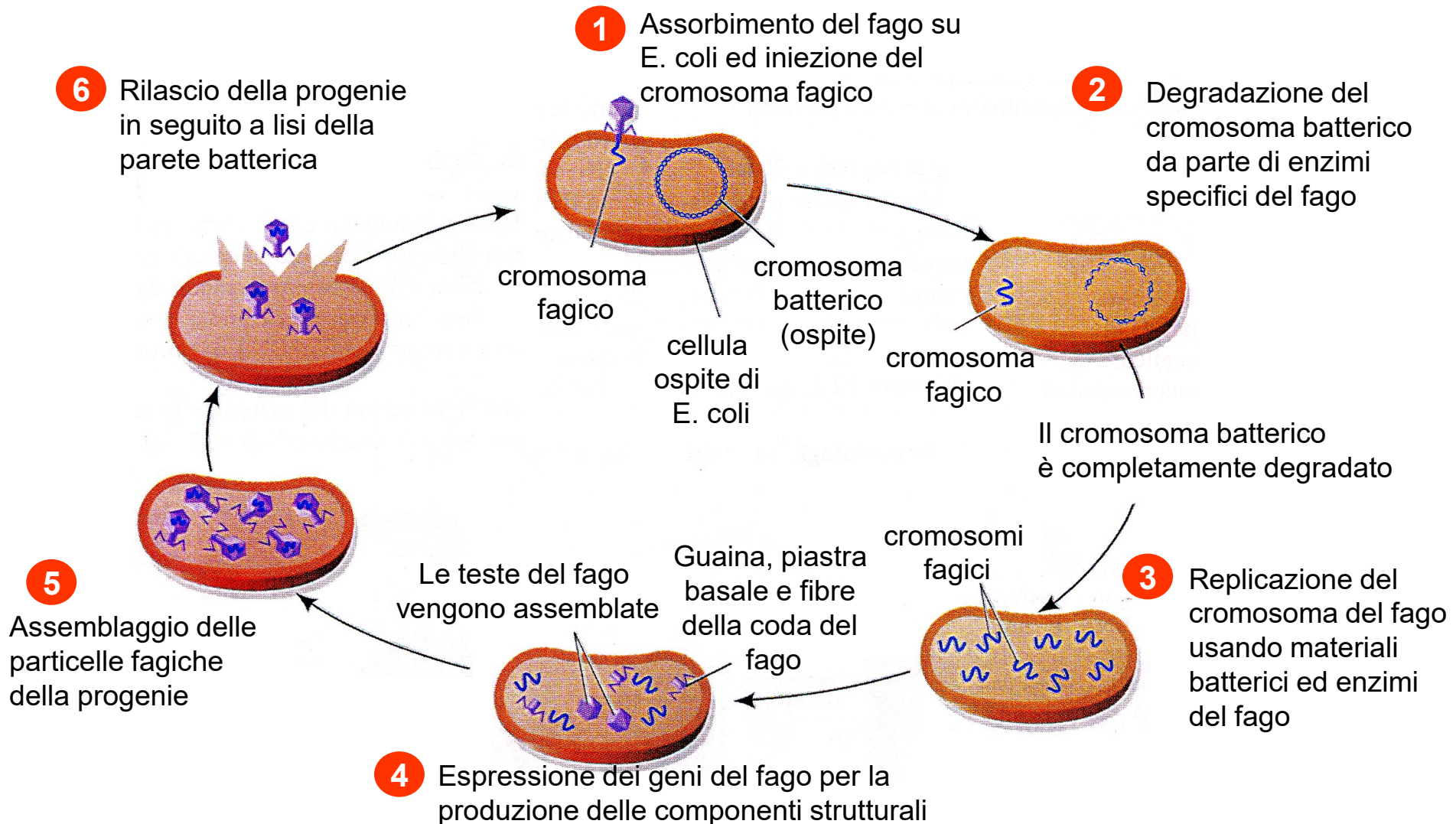


Fotografia al M.E. del batteriofago T2

ACIDI NUCLEICI

Il DNA è il depositario dell'informazione genetica.

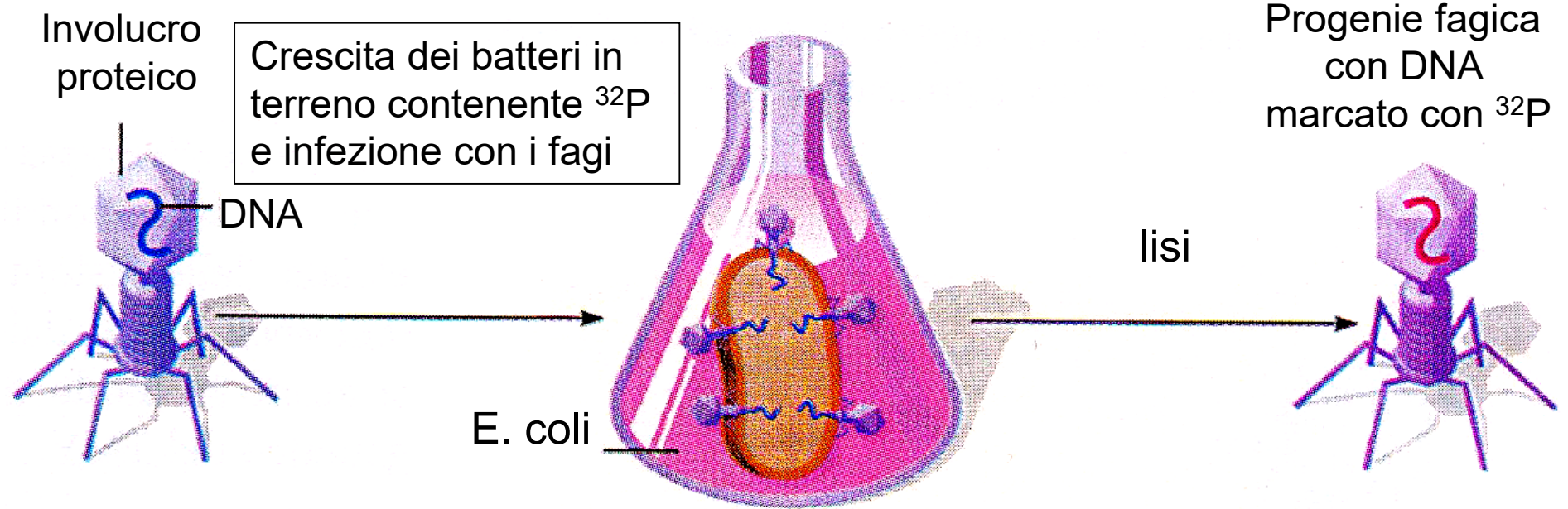
Hersey e Chase sapevano che il virus T2 era costituito soltanto da DNA e proteine e che il virus era in qualche modo capace di usare il proprio materiale genetico per riprogrammare la cellula ospite per farle produrre nuovi fagi. Tuttavia, non erano a conoscenza di quale dei due componenti, DNA o proteine, fosse la causa.



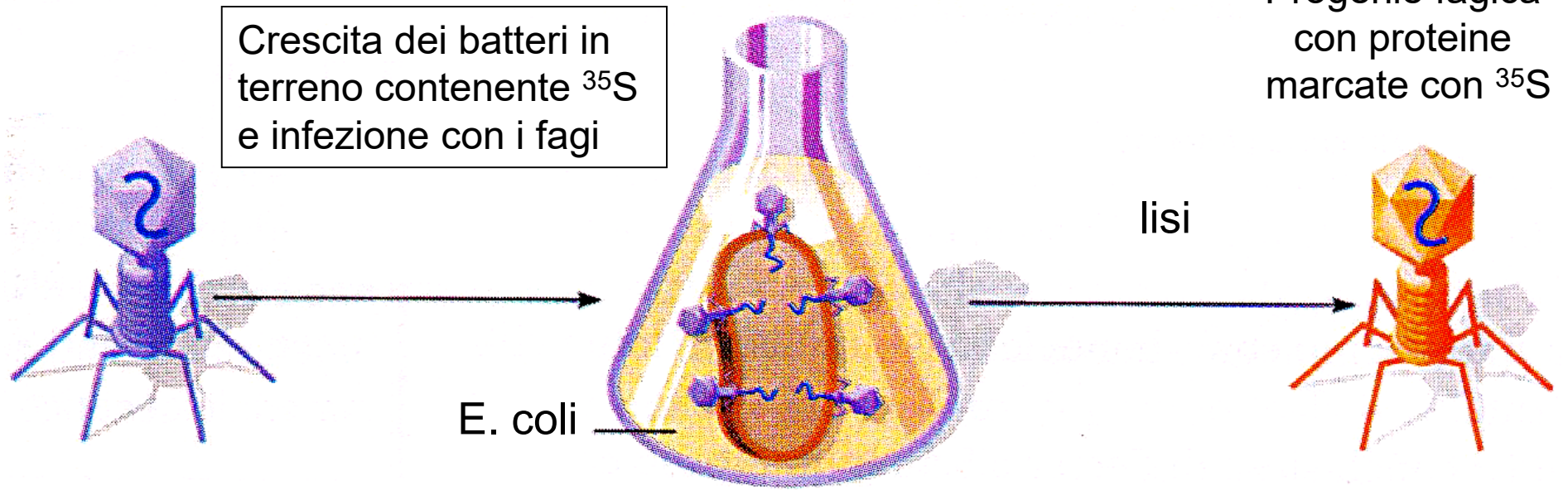
ACIDI NUCLEICI

Esperimento di Hershey e Chase, 1953

Il DNA è il depositario dell'informazione genetica.



Fago T2



ACIDI NUCLEICI

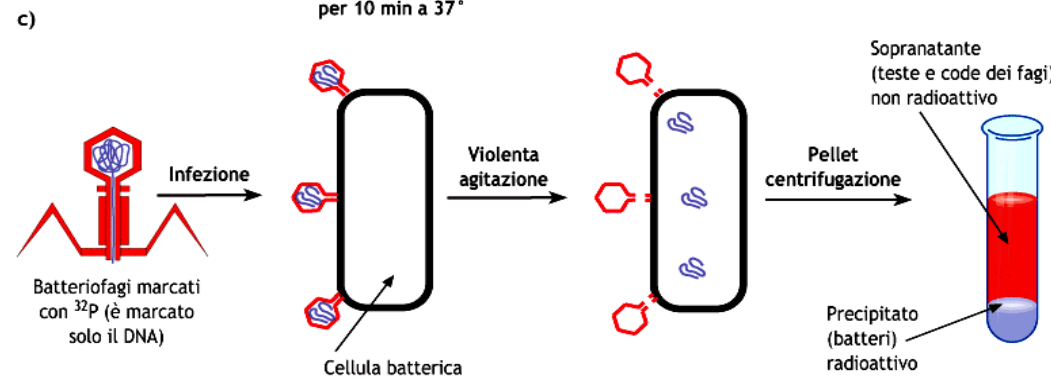
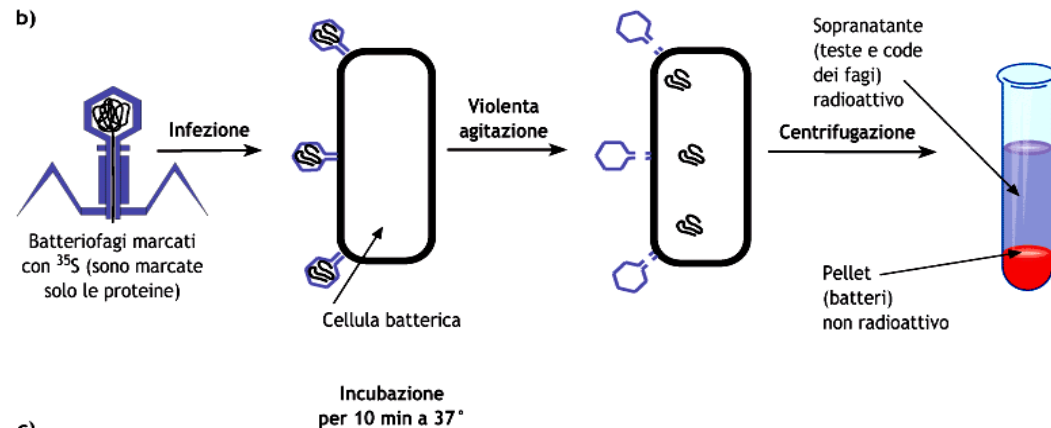
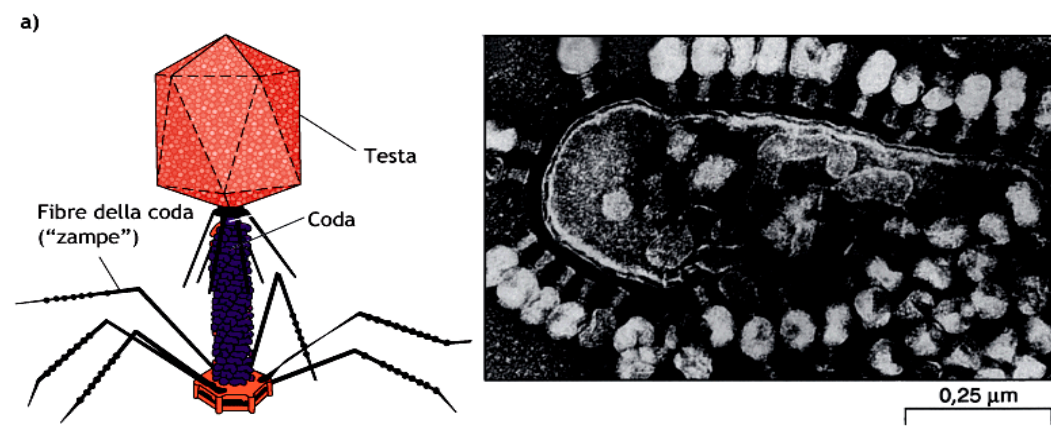
Il DNA è il depositario dell'informazione genetica.

Esperimento di Hershey e Chase, 1953

Usarono gli isotopi radioattivi del fosforo e dello zolfo per marcare rispettivamente il DNA e le proteine virali. Ciò fu possibile in quanto le proteine virali sono ricche di zolfo ma mancano di gruppi fosfato, mentre il DNA presenta una situazione opposta.

Gli esperimenti mostrarono che solo il DNA virale entra nella cellula batterica e, inoltre, questa molecola deve contenere le informazioni capaci di indirizzare la cellula verso la produzione del DNA e delle proteine di tipo virale.

Un **isotopo** è un [atomo](#) di uno stesso [elemento chimico](#), e quindi con lo stesso [numero atomico](#) Z , ma con differente [numero di massa](#) A , e quindi differente [massa atomica](#) M . La differenza dei numeri di massa è dovuta ad un diverso numero di [neutroni](#) presenti nel nucleo dell'atomo a parità di numero atomico.

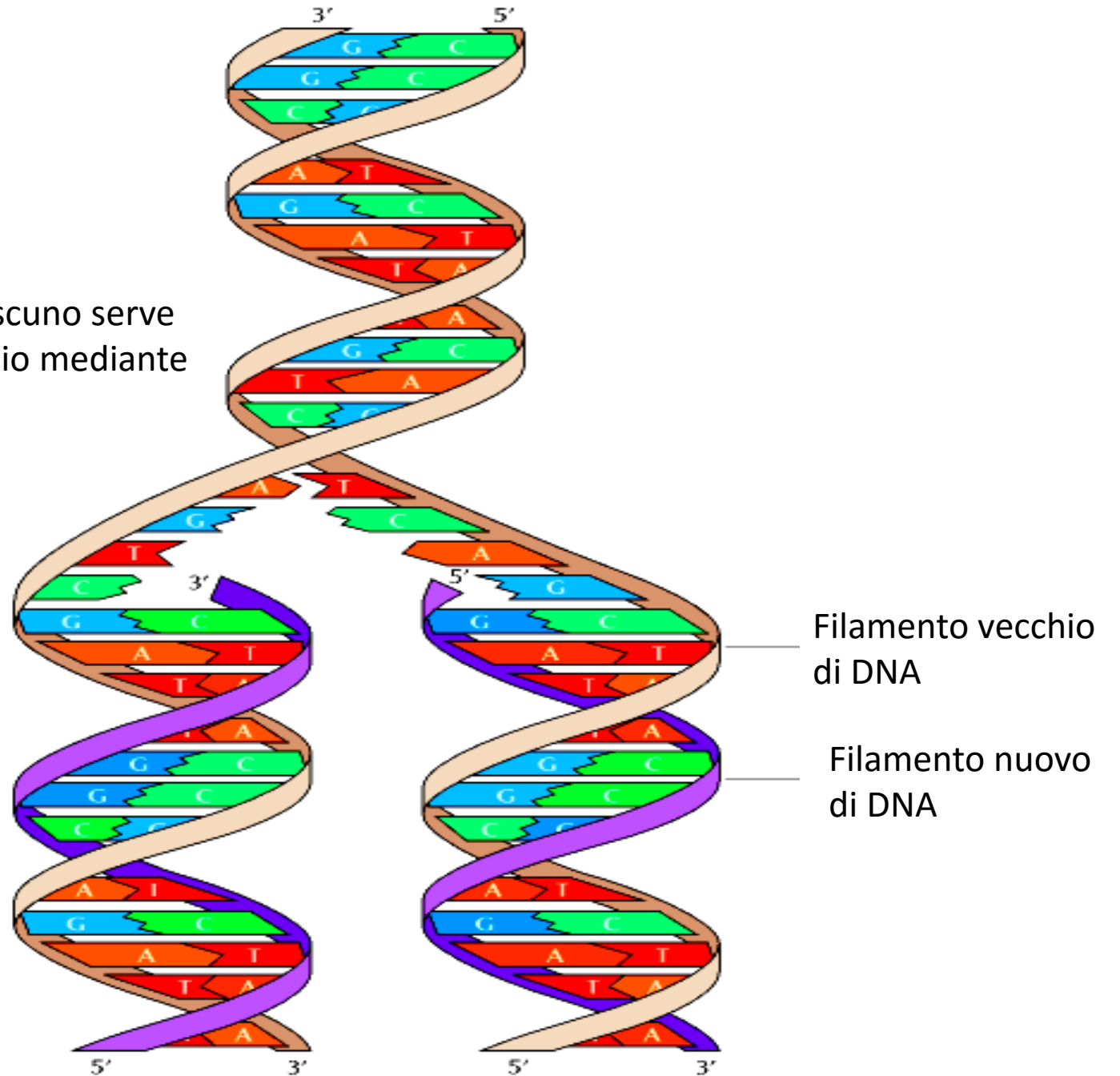


■ FIGURA 1.46 Esperimento di Hershey e Chase – dimostrazione che è il DNA del fago che viene inserito nel batterio nel momento dell'infezione. (a) Struttura di un fago della serie T4 e relativa immagine al ME; (b) infezione di batteri da parte di fagi che hanno le proteine del capsido marcate con ^{35}S . Dopo centrifugazione, il pellet che contiene i batteri non è radioattivo; (c) infezione di batteri da parte di fagi che hanno il DNA marcato con ^{32}P . Dopo centrifugazione, il pellet che contiene i batteri è radioattivo.

Replicazione del DNA

Replicazione semiconservativa del DNA.

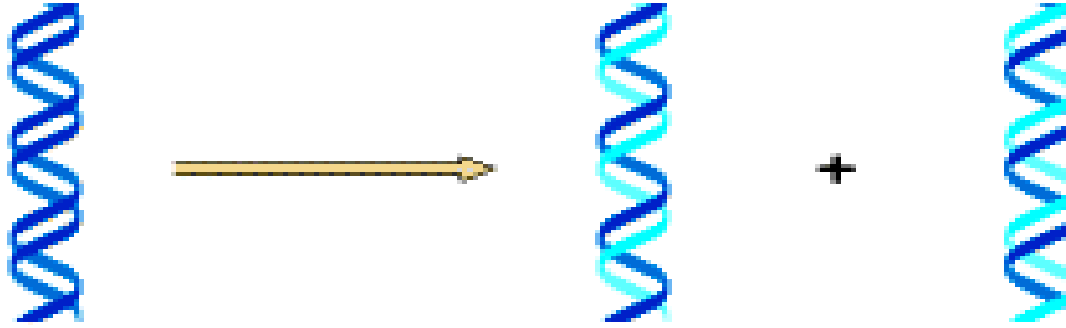
I due filamenti di DNA parentale si separano e ciascuno serve da stampo per la sintesi di un nuovo filamento figlio mediante accoppiamento delle basi.



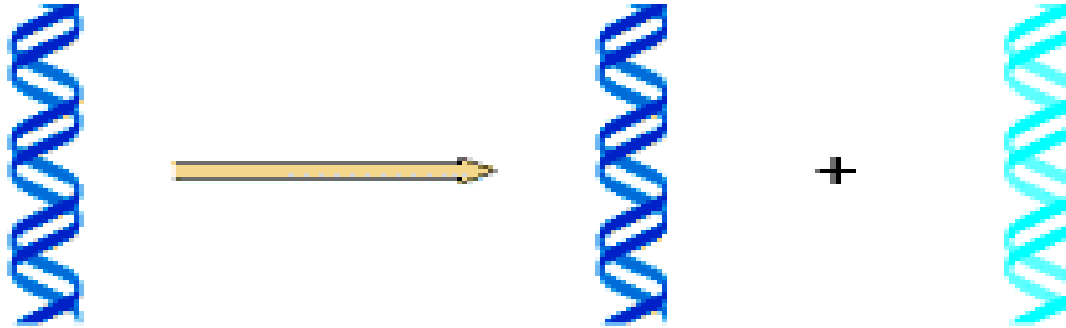
Replicazione del DNA

Modelli di replicazione del DNA

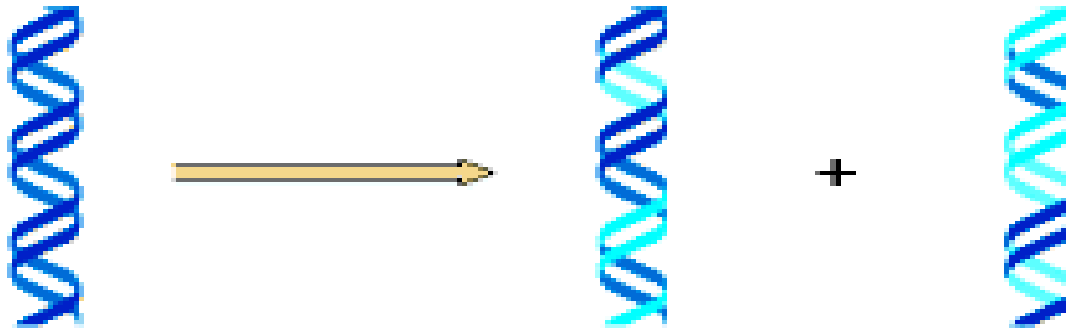
Semiconservativo



Conservativo



Dispersivo



Replicazione del DNA

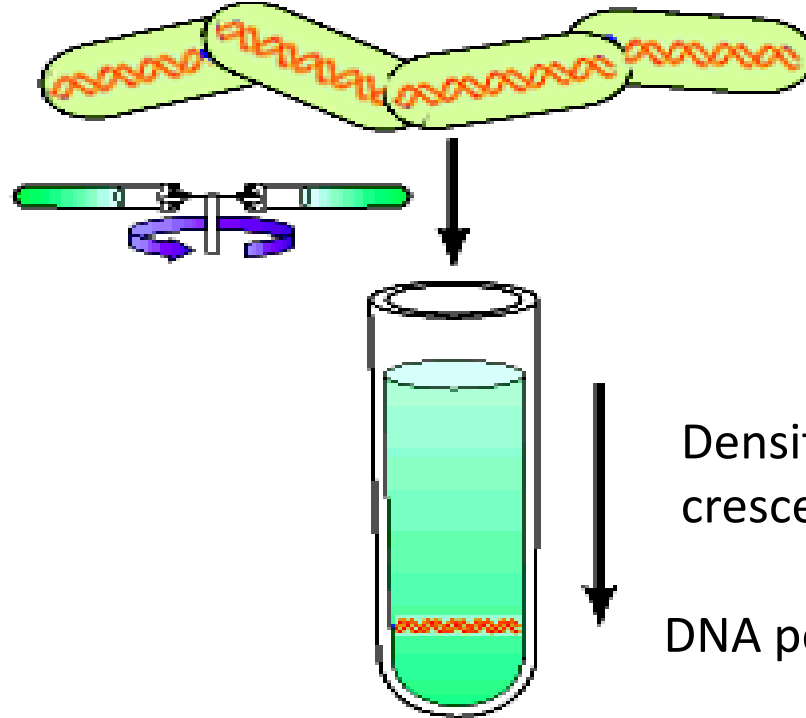
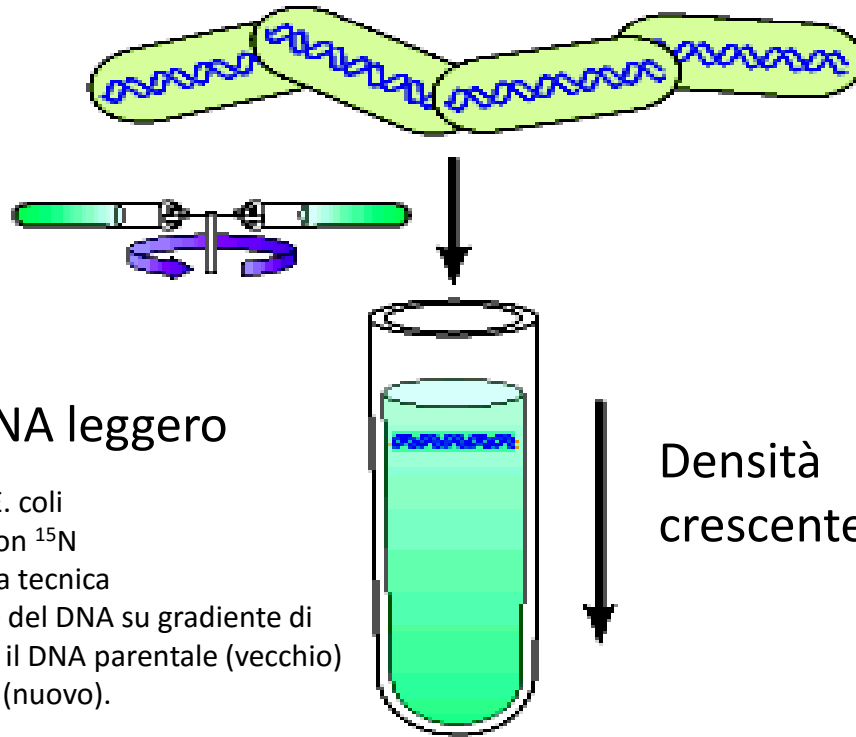
Esperimento di M. Meselson e F. Stahl, 1958

In questo esperimento il DNA venne marcato con isotopi che ne alteravano la densità.

Batteri cresciuti in un mezzo ^{14}N

Batteri cresciuti in un mezzo ^{15}N

E. coli

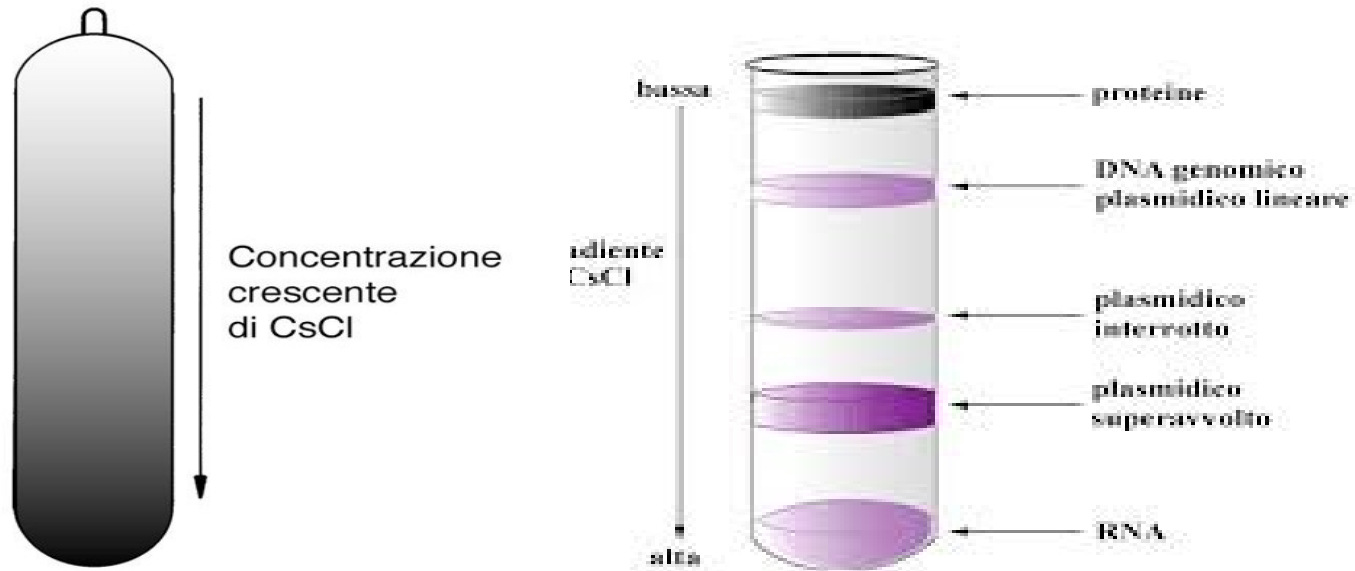


1. Modello sperimentale: E. coli
2. DNA di E. coli marcato con ^{15}N
3. Esperimento basato sulla tecnica dell'ultracentrifugazione del DNA su gradiente di densità per discriminare il DNA parentale (vecchio) dal DNA neosintetizzato (nuovo).

Estrazione del DNA
e centrifugazione
in una soluzione di CsCl

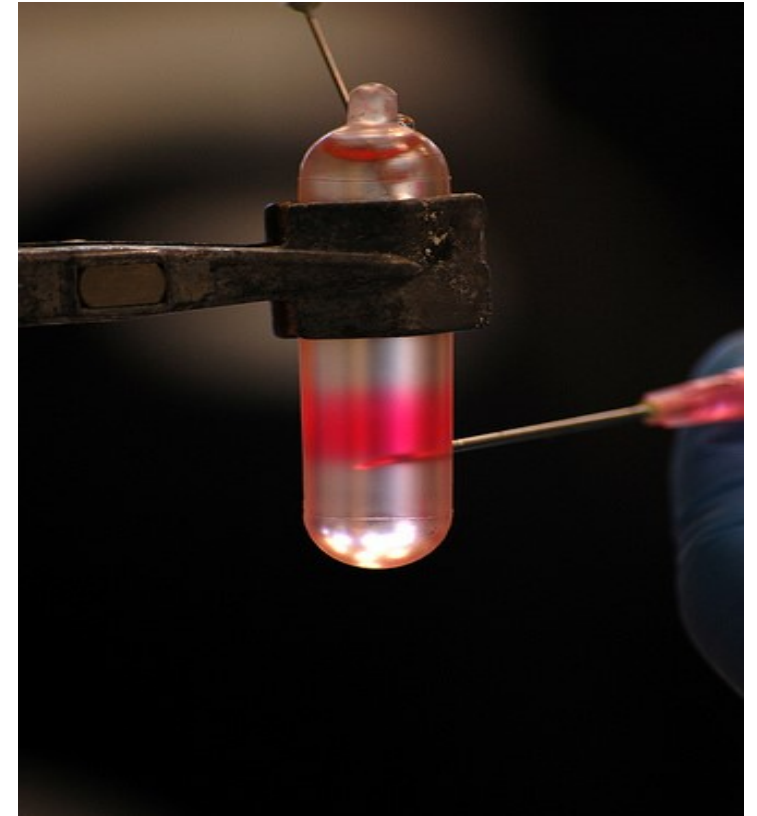
Estrazione del DNA
e centrifugazione
in una soluzione di CsCl

Gradiente di Cloruro di Cesio



T.A.

100000g
6M CsCl



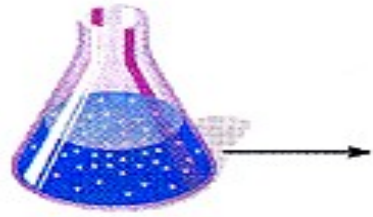
Esperimento di M. Meselson e F. Stahl, 1958

Coltura di E. coli

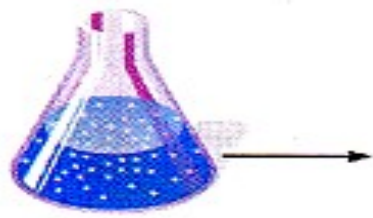
DNA in gradiente di CsCl



DNA pesante
($^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$)



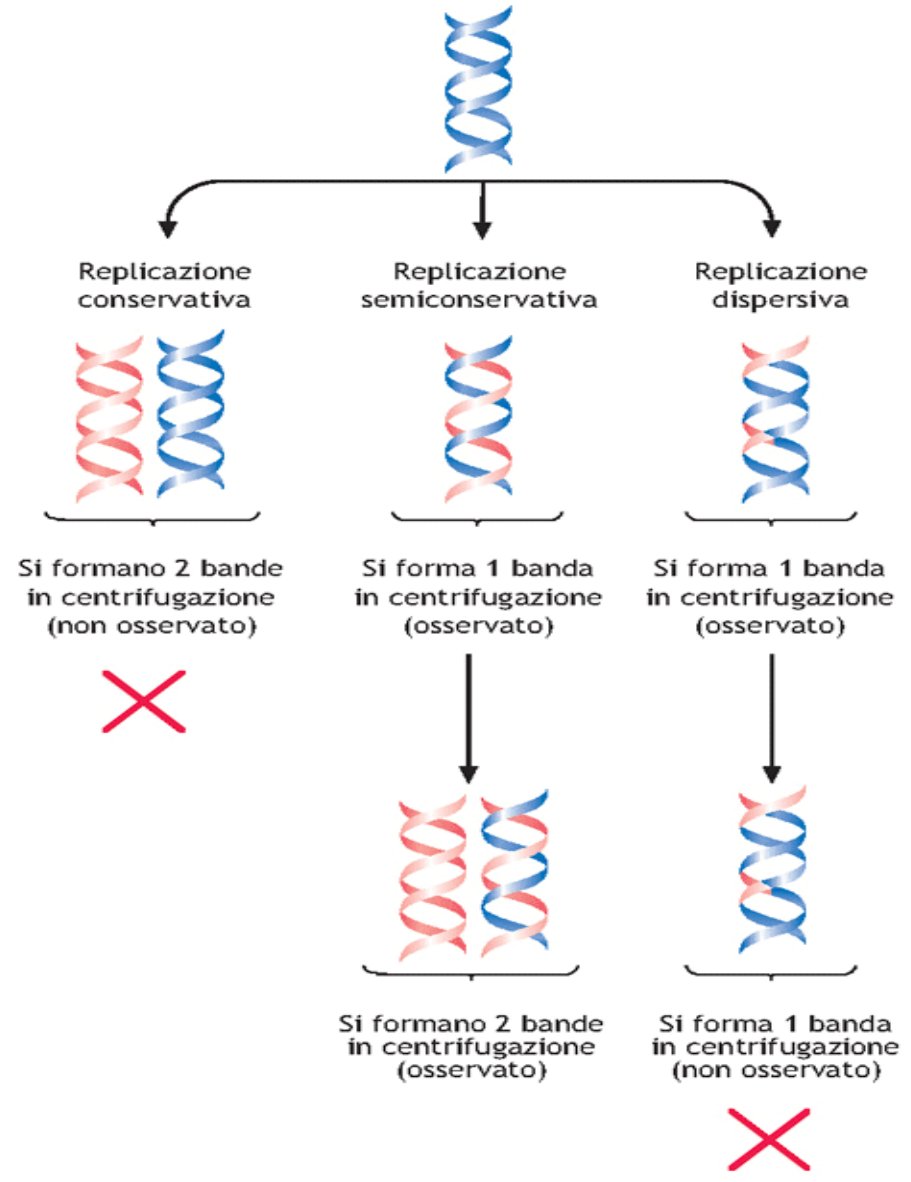
DNA pesante,
leggero
(ibrido $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)



DNA pesante,
leggero
(ibrido $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)



DNA
leggero
($^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$)



Escherichia coli:
crescita in terreno
contenente ^{15}N
(banda "pesante")

Prima replicazione in
terreno contenente
 ^{14}N

Risultati attesi alla
I generazione
(banda "intermedia")

Seconda replicazione in
terreno contenente ^{14}N

Risultati attesi alla
II generazione
(banda "intermedia" +
banda "leggera")

Esperimento di M. Meselson e F. Stahl, 1958

Composizione del DNA

Inizio

Terreno
contenente ^{15}N



DNA in gradiente di CsCl



DNA pesante
($^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$)

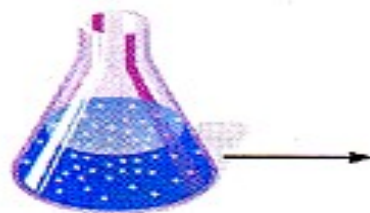
Continuazione della
crescita per una
generazione
in terreno ^{14}N



DNA pesante,
leggero
(ibrido $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)

Primo ciclo di replicazione

Continuazione
della crescita per una
seconda generazione



DNA pesante,
leggero
(ibrido $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)

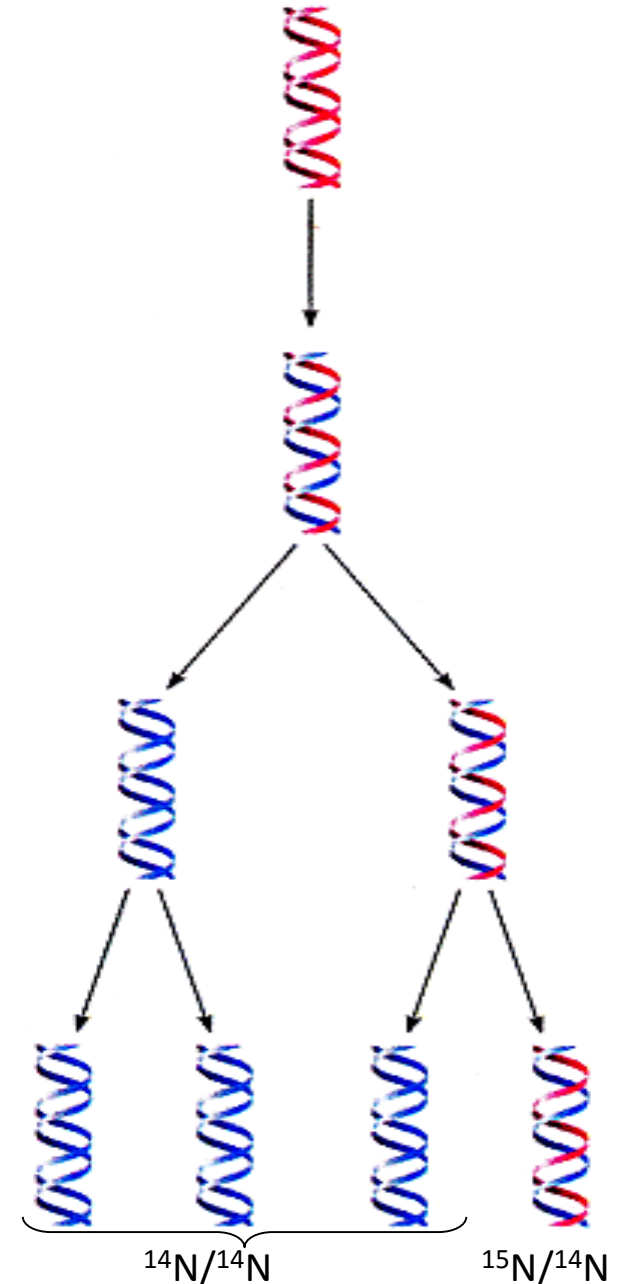
Secondo ciclo di replicazione

Continuazione
della crescita per una
terza generazione



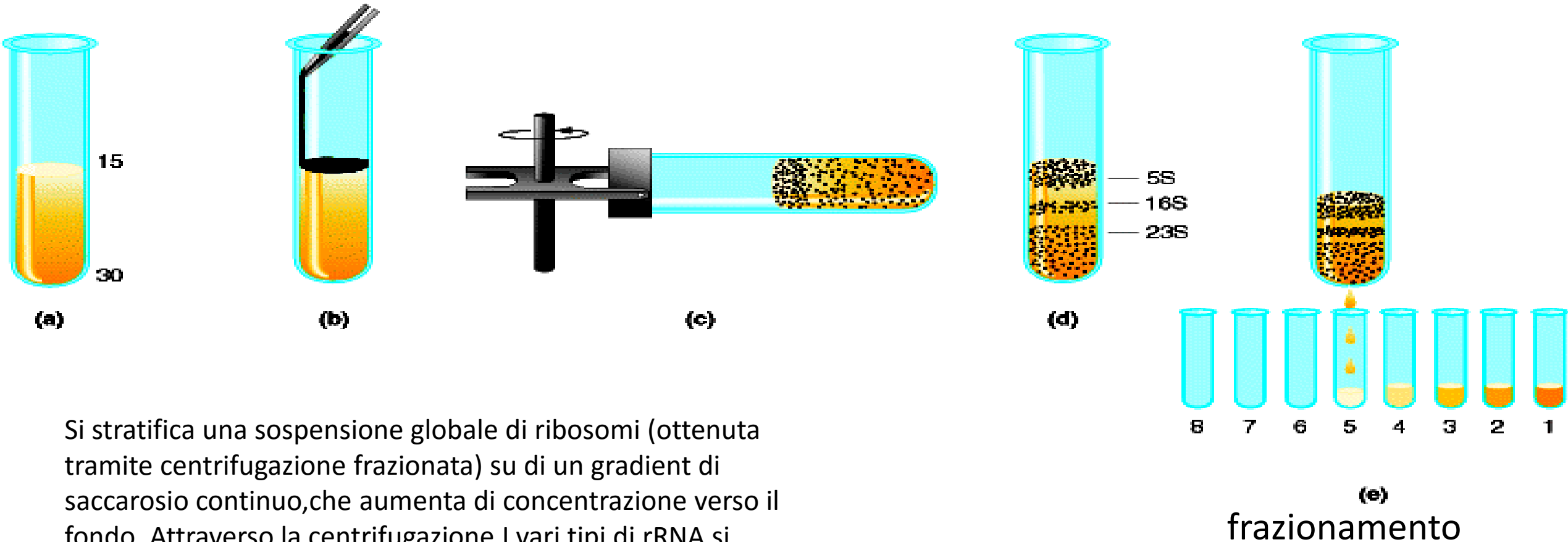
DNA
leggero
($^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$)

Terzo ciclo di replicazione



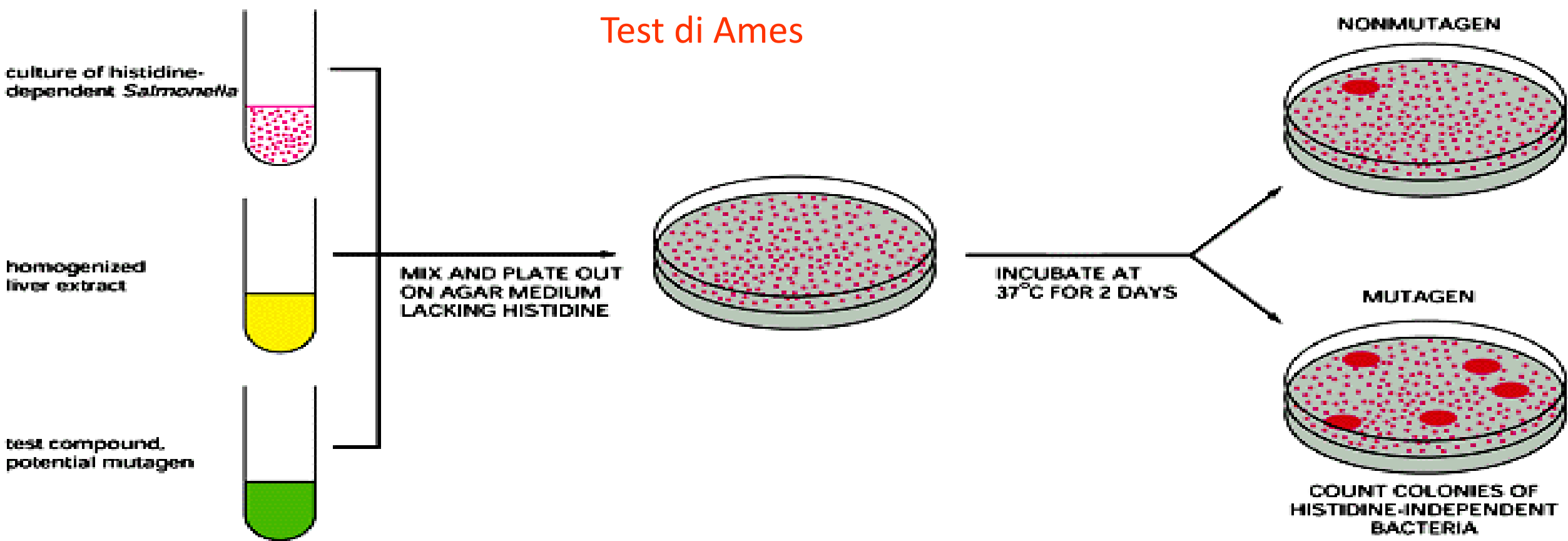
Frazionamento dei ribosomi

S = Svedberg coefficiente di sedimentazione



Si stratifica una sospensione globale di ribosomi (ottenuta tramite centrifugazione frazionata) su di un gradient di saccarosio continuo, che aumenta di concentrazione verso il fondo. Attraverso la centrifugazione i vari tipi di rRNA si separano in bande distinte a seconda del loro peso, e possono essere poi recuperate separatamente mediante il frazionamento

Test di Ames



Il test sfrutta le mutazioni batteriche per individuare sostanze chimiche potenzialmente pericolose

Il metodo standard per analizzare il potenziale mutageno della sostanza chimica si basa sulla rivelazione dell'aumento della frequenza di retromutazione (reversione) in ceppi batteri auxotrofi, in presenza del possibile mutageno

Non tutte sono direttamente in grado di indurre mutazioni, infatti alcuni sono cancerogeni indiretti e vengono definiti pro-cancerogeni, si tratta di composti che sono in grado di indurre tumori se subiscono modificazioni ad opera del metabolismo cellulare. Ecco perchè viene introdotto nel terreno di coltura un estratto di fegato di ratto. In modo tale da poter favorire la metabolizzazione e la trasformazione di sostanze pro-carcinogene in carcinogene; trasformazione che avviene ad opera degli enzimi del fegato.