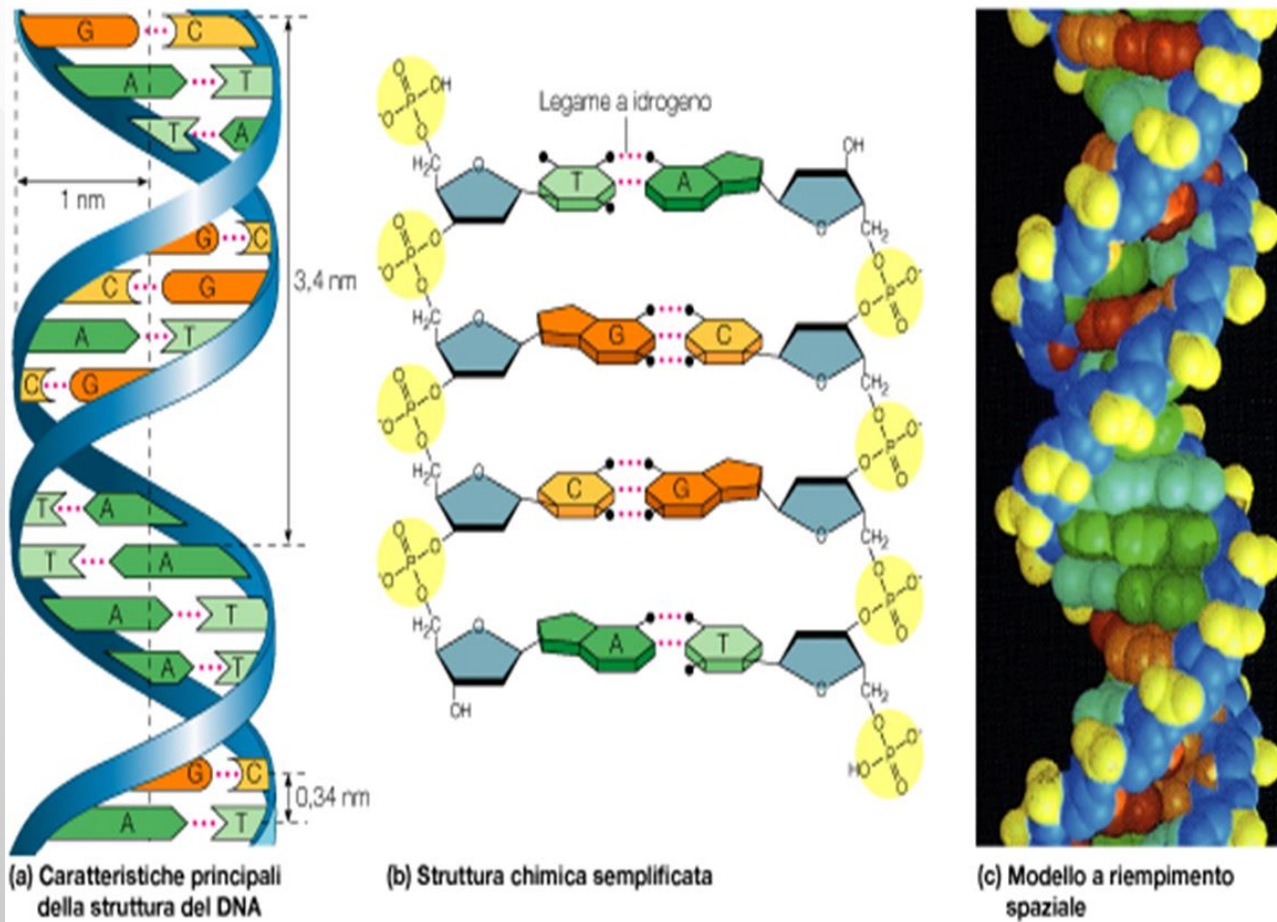
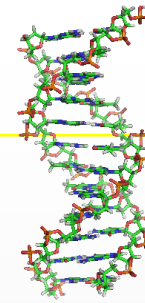


# Struttura e replicazione del DNA



# Breve storia del DNA

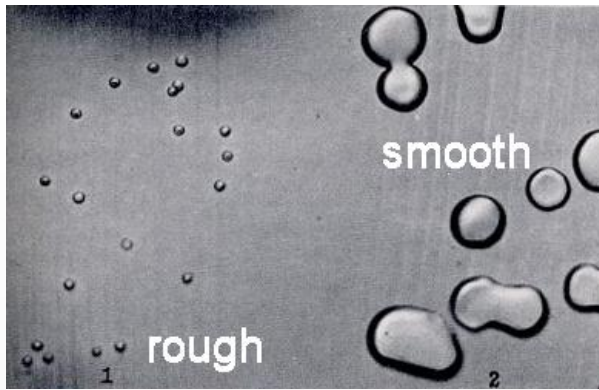
(da Mendel al sequenziamento del genoma umano)



- 1865. **Gregor Mendel** descrive le "unità di eredità"
- 1869. F. Miescher isola la "nucleina" (DNA) dalle cellule germinali di trota.
- 1903. W. Sutton propone l'ipotesi che i cromosomi contengano materiale genetico
- 1908. **T.H. Morgan** avanza l'ipotesi che i geni possano mutare, in base a studi su *Drosophila*
- 1927. H. Muller scopre che i raggi X provocano mutazioni nei cromosomi
- 1928. **F. Griffith** scopre il "principio trasformante"
- 1941. G. Beadle e W. Tatum propongono l'ipotesi "un gene - un enzima"
- 1944. O. Avery, C. MacLeod e M. McCarty dimostrano che il DNA è il cosiddetto "principio trasformante" scoperto da F. Griffith
- 1952. A. Hershey e M. Chase dimostrano che il DNA contiene materiale genetico
- 1953. Scoperta della struttura a doppia elica del DNA da parte di J. D. Watson e F. Crick
- 1960. Scoperta dell'RNA messaggero
- 1966. Identificazione completa del codice genetico da parte di M. Nirenberg e S. Ochoa
- 1973. Clonazione dei geni eucariotici in vettori plasmidici
- 1976. J. Gurdon ottiene la prima clonazione di un vertebrato (un anfibio)
- 1977. **Metodo di F. Sanger per il sequenziamento del DNA: primo genoma virale sequenziato**
- 1984. Inizio del Progetto Genoma Umano, con durata prevista di 20 anni
- 1993. **Prima prova di terapia genica nell'uomo**
- 1995. **Primo genoma di un organismo vivente completamente sequenziato** (l'archeobatterio *Methanocaldococcus jannaschii*)
- 1997. Prima clonazione di un mammifero (la pecora "Dolly")
- 2001. **Sequenziamento (più o meno completo) del genoma umano**  
(F. Sanger et al., HGP; J. Craig Venter et al., Celera Genomics)

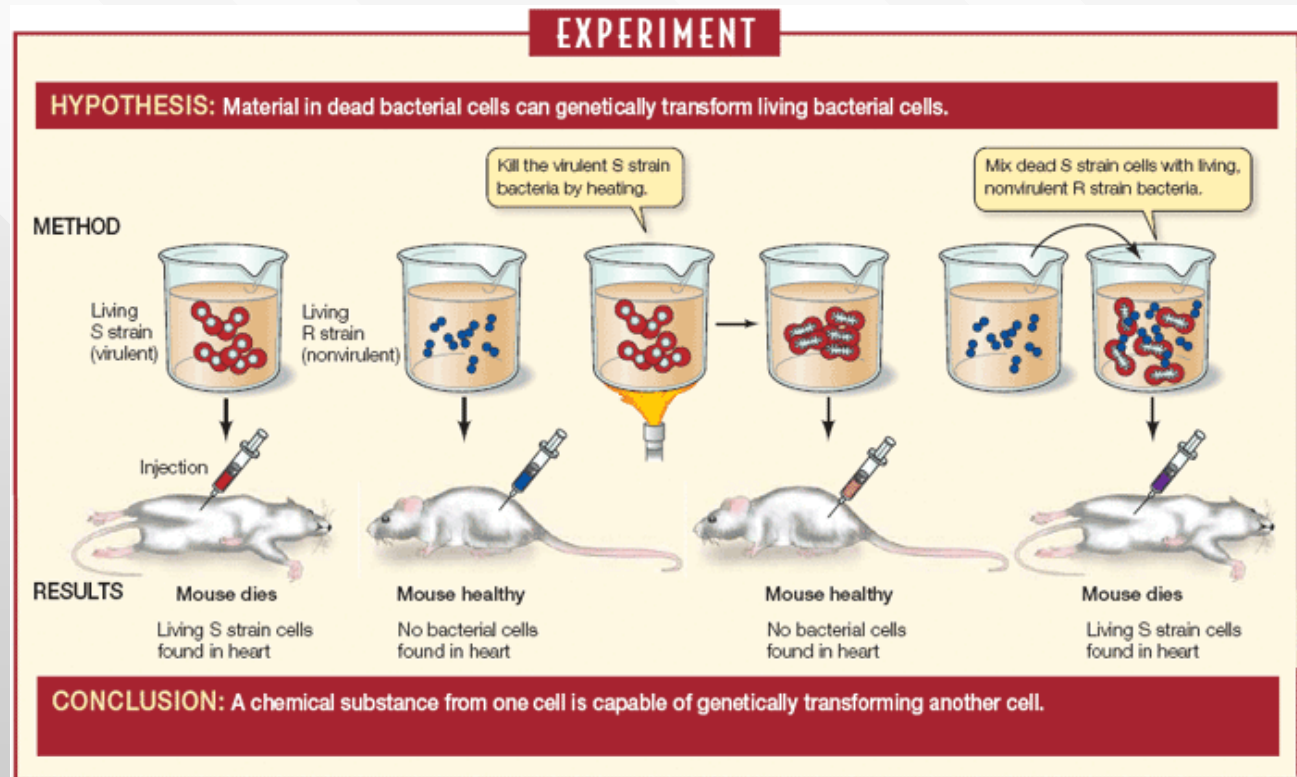


Frederick Griffith  
(1879-1941)



Esperimento di F. Griffith (1928)  
su *Streptococcus pneumoniae*  
(Eubacteria Firmicutes)

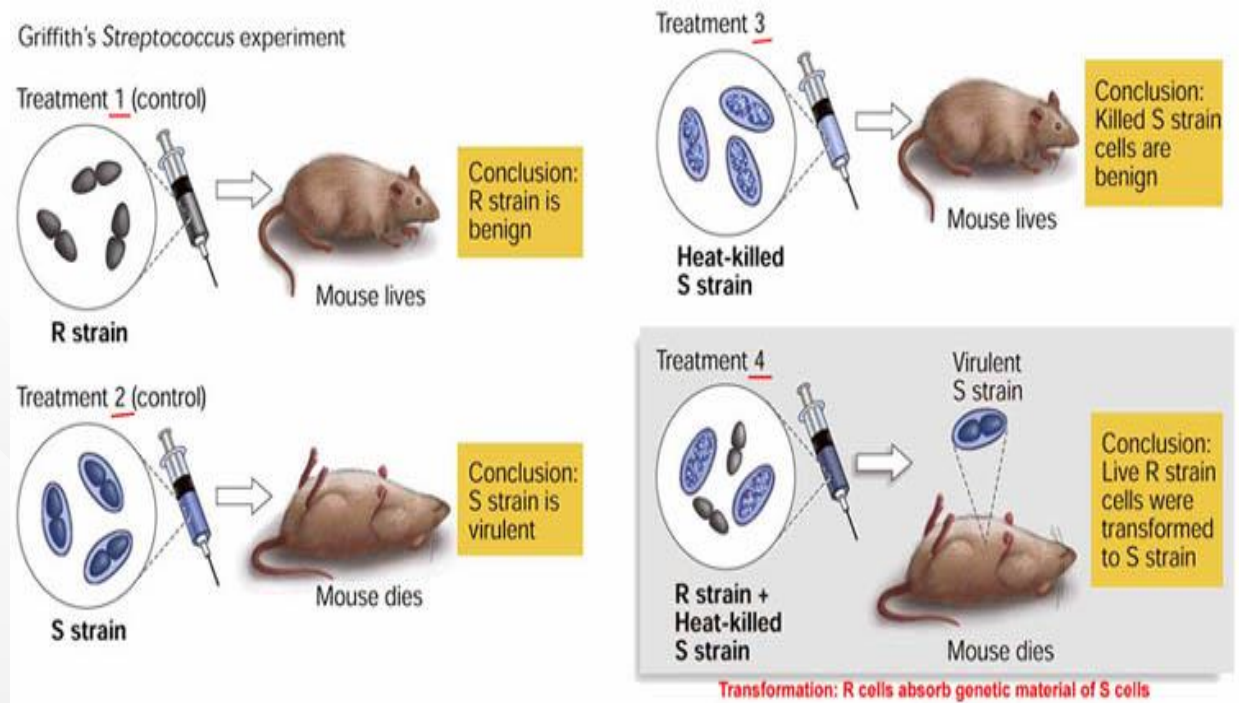
Pneumococchi R (rough), innocui  
Pneumococchi S (smooth), **mortali**



Fonti:  
Sadava et al., 2014; 2019

Gli pneumococchi R vivi, mescolati agli pneumococchi S uccisi con il calore, producevano **pneumococchi S vivi e mortali**

## Il “principio trasformante” di F. Griffith



The S form of Type I has been produced from the R form of Type II, and the R form of Type I has been transformed into the S form of Type II.

Griffith attribuì i risultati dei suoi esperimenti ad un “principio trasformante” che non riuscì ad identificare: morì nel 1941 nel suo laboratorio durante un bombardamento aereo su Londra, insieme al collega William Scott

Fonte: Griffith F., J. Hygiene 27: 113-159, 1928

VOLUME XXVII

JANUARY, 1928

No. 2

### THE SIGNIFICANCE OF PNEUMOCOCCAL TYPES.

BY FRED. GRIFFITH, M.B.

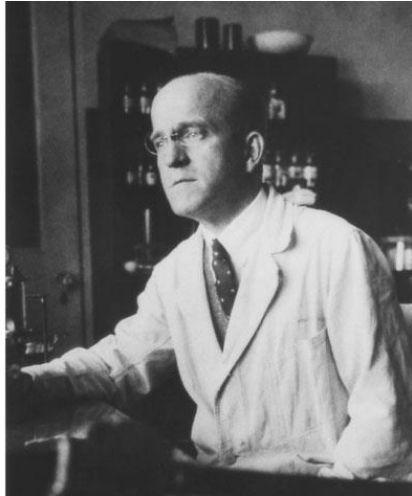
(*A Medical Officer of the Ministry of Health.*)

(*From the Ministry's Pathological Laboratory.*)

#### CONTENTS.

	PAGE
I. OBSERVATIONS ON CLINICAL MATERIAL . . . . .	113
Types in Lobar Pneumonia . . . . .	114
Variety of Types in Sputum from the same Case . . . . .	114
A Rough Virulent Strain . . . . .	117
A Strain agglutinating specifically with two different Group IV Sera . . . . .	119

Il “principio trasformante” scoperto da Griffith fu in seguito identificato da O. Avery, C. McLeod e M. McCarty (1944):  
**si trattava dell’acido deossiribonucleico, meglio noto come DNA**



**STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES**

**INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III**

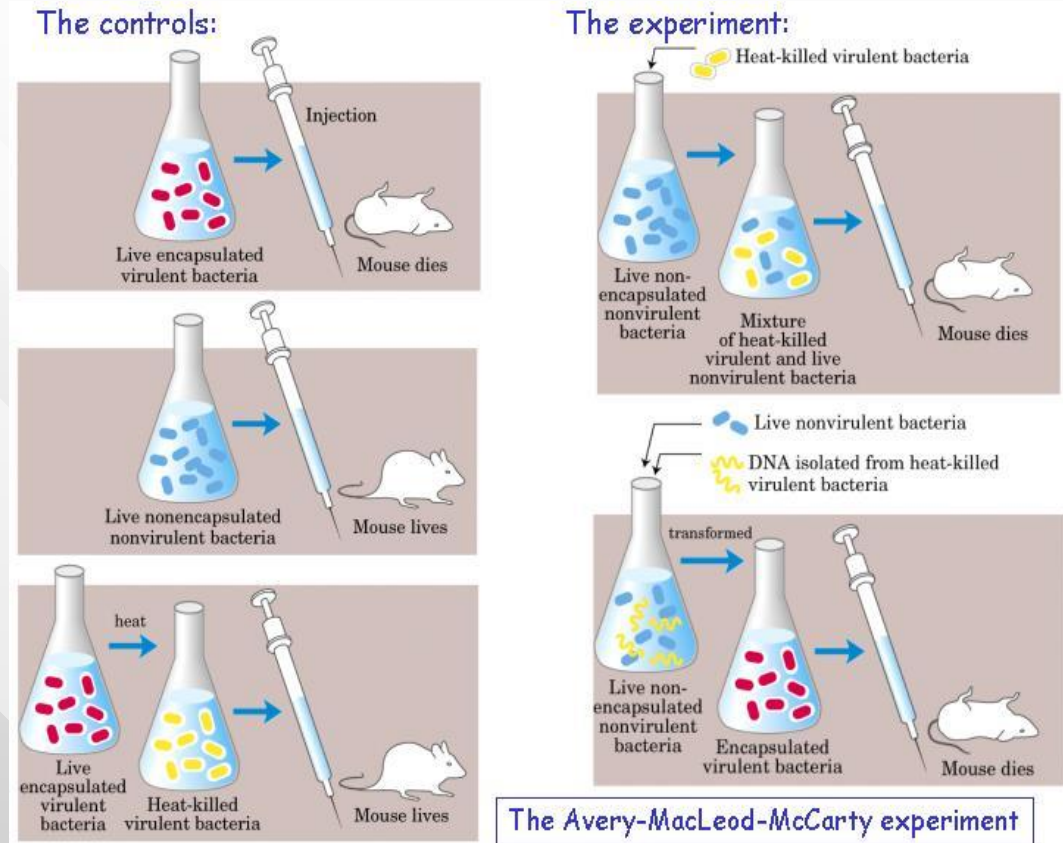
BY OSWALD T. AVERY, M.D., COLIN M. MACLEOD, M.D., AND MACLYN McCARTY,\* M.D.

(From the Hospital of The Rockefeller Institute for Medical Research)

PLATE 1

(Received for publication, November 1, 1943)

Biologists have long attempted by chemical means to induce in higher organisms predictable and specific changes which thereafter could be transmitted in series as hereditary characters. Among microorganisms the most striking example of inheritable and specific alterations in cell structure and function that can be experimentally induced and are reproducible under well defined and adequately controlled conditions is the transformation of specific types of *Pneumococcus*. This phenomenon was first described by Griffith (1) who succeeded in transforming an attenuated and non-encapsulated (R) variant derived from one specific type into fully encapsulated and virulent (S) cells of a heterologous specific type. A typical instance will suffice to illustrate the techniques originally used and serve to indicate the wide variety of transformations that are possible within the limits of this bacterial species.



Fonti: Avery et al., J. Exp. Med. 79: 137-158, 1944  
 Sadava et al., 2014; 2019

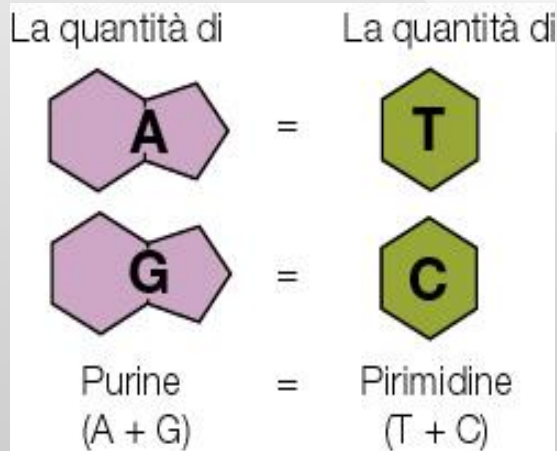
# La “regola di Chargaff” (1949)



Erwin Chargaff (1905-2002)

Studiando la composizione del DNA, Erwin Chargaff, un biochimico americano di origine austriaca, aveva notato una curiosa caratteristica:

→ il DNA isolato da organismi diversi conteneva **sempre** una quantità di **adenina uguale** a quella di **timina**, ed una quantità di **guanina uguale** a quella di **citosina**



Filmato

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

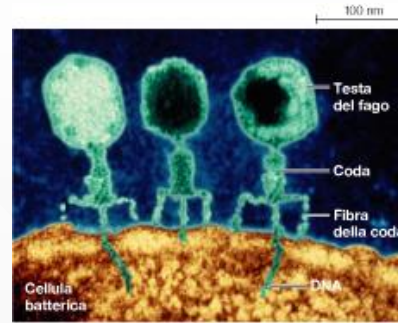
Source	Adenine to Guanine	Thymine to Cytosine	Adenine to Thymine	Guanine to Cytosine	Purines to Pyrimidines
Ox	1.29	1.43	1.04	1.00	1.1
Human	1.56	1.75	1.00	1.00	1.0
Hen	1.45	1.29	1.06	0.91	0.99
Salmon	1.43	1.43	1.02	1.02	1.02
Wheat	1.22	1.18	1.00	0.97	0.99
Yeast	1.67	1.92	1.03	1.20	1.0
<i>Hemophilus 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).

# Esperimenti di Alfred Hershey e Martha Chase sul batteriofago T2, virus del batterio *Escherichia coli* (1952)



Dopo avere permesso ai batteriofagi di infettare cellule di *E. coli*, separarono i capsidi dalle cellule infettate ed osservarono che **all'interno delle cellule era rimasto il materiale marcato con  $^{32}\text{P}$**

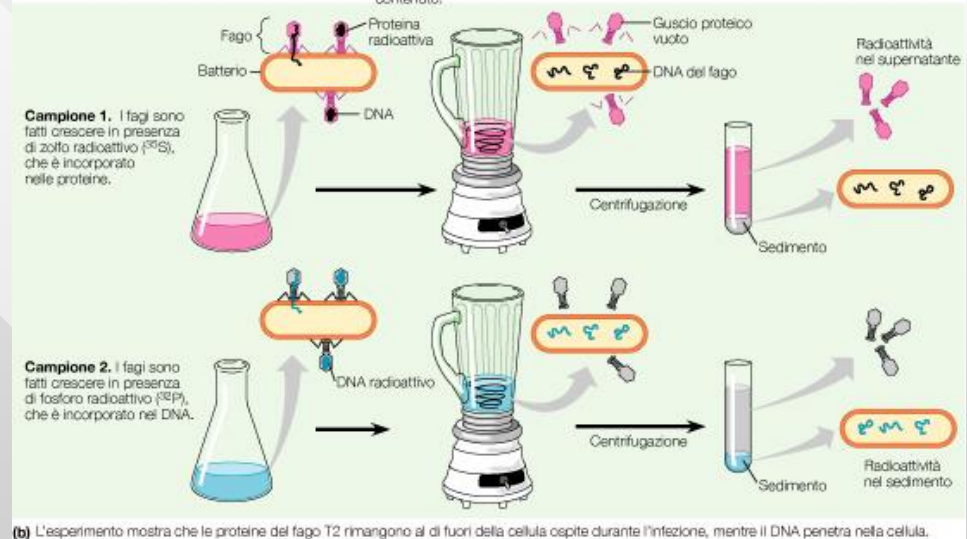


(a) I T2 e i fagi simili utilizzano le loro code per aderire alla cellula ospite e iniettarvi il proprio materiale genetico (TEM).

Hershey e Chase **marcarono i batteriofagi con isotopi radioattivi:**

$^{35}\text{S}$  per le proteine del capside (nell'amminoacido cisteina) e  $^{32}\text{P}$  per il DNA (nel fosfato)

- 1 Miscela di batteri e fagi marcati radioattivamente. I fagi infettano le cellule batteriche.
- 2 Mediante un frullatore vengono separati i fagi rimasti al di fuori dei batteri, dalle cellule e dal loro contenuto.
- 3 La miscela è centrifugata in modo che i batteri formino un sedimento sul fondo della provetta.
- 4 Misurazione della radioattività nel sedimento e nel supernatante.



**Quindi la molecola in grado di trasmettere l'infezione del batteriofago era il DNA (e non le proteine)**



James D. Watson, Francis Crick e il modello del DNA:  
**l'inizio della biologia molecolare**

Fonte: Sadava et al., 2014

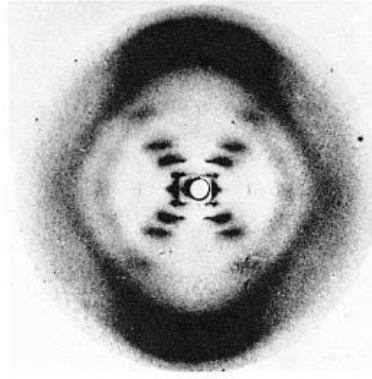


## Rosalind Elsie Franklin (1920-1958)

...avrebbe dovuto condividere con J.D.Watson, F. Crick e M. Wilkins il Premio Nobel nel 1962, ma non ebbe alcun riconoscimento



(a) Rosalind Franklin



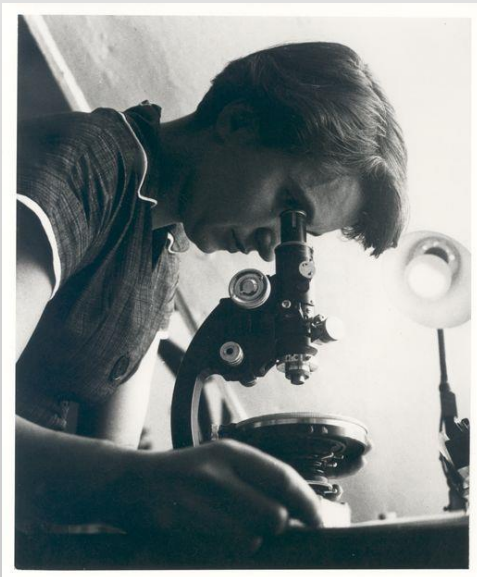
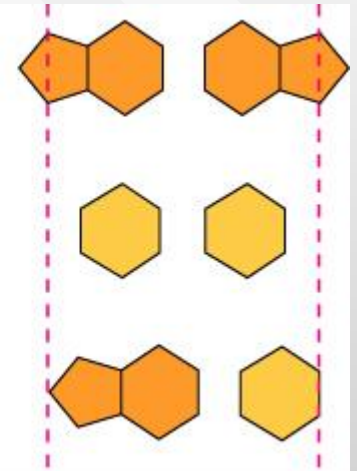
(b) La fotografia della dif frazione ai raggi X del DNA di Rosalind Franklin

Valente cristallografa presso il laboratorio di M. Wilkins a Cambridge, riuscì ad ottenere nel 1952 una eccezionale foto a raggi X (nota come **foto n. 51**) di un cristallo puro di DNA

Purina + purina: troppo larga

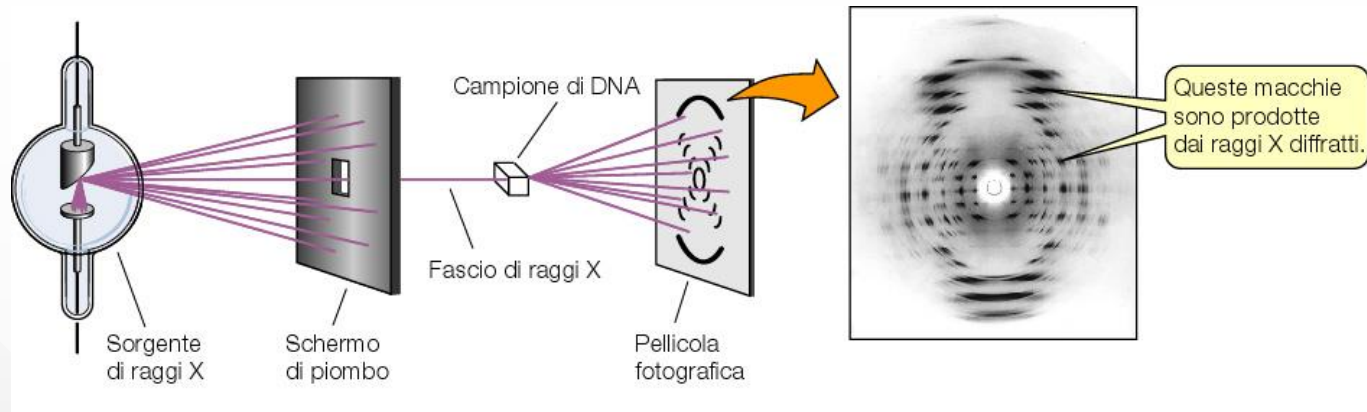
Pirimidina + pirimidina: troppo stretta

Purina + pirimidina: larghezza compatibile con i dati ai raggi X

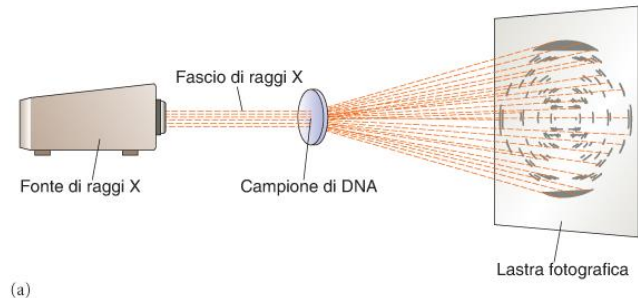
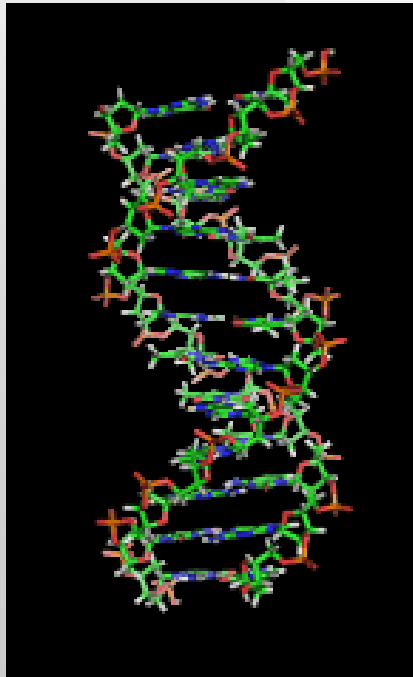


Rosalind Franklin morì nel 1958 (a soli 37 anni) per un tumore ovarico, con ogni probabilità provocato dall'**esposizione prolungata ai raggi X durante il suo lavoro**

## Il DNA a raggi X



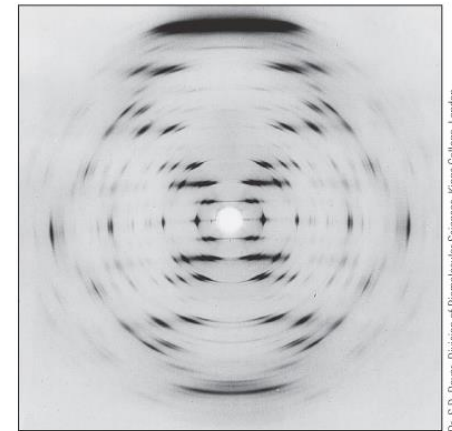
Basandosi sulla foto n. 51 ottenuta da Rosalind Franklin e sulla regola di Chargaff, **James Watson e Francis Crick costruirono il primo modello del DNA**



(a)

**FIGURA 11-4** Diffrazione ai raggi X del DNA.

(a) La tecnica di base. I ricercatori indirizzano un fascio ristretto di raggi X su di un singolo cristallo di DNA. Importanti evidenze relative alla struttura del DNA sono fornite da una dettagliata analisi matematica delle distanze tra i punti formati dai raggi X che colpiscono una lastra fotografica. (b) L'immagine di diffrazione ai raggi X del DNA utilizzata da Watson e Crick. L'andamento diagonale delle macchie nere che si allungano dalle 11 alle 5 e dall'1 alle 7, se paragonate alle lancette dell'orologio, suggerisce la struttura elicoidale del DNA. I riflessi allungati orizzontali al margine superiore ed inferiore della fotografia, indicano che le basi puriniche e pirimidiniche si impilano l'una sull'altra ogni 0.34 nm e sono disposte perpendicolarmente rispetto all'asse dell'elica.

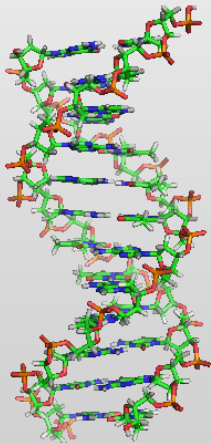


(b)

Watson e Crick scrissero su "Nature" nel 1953:

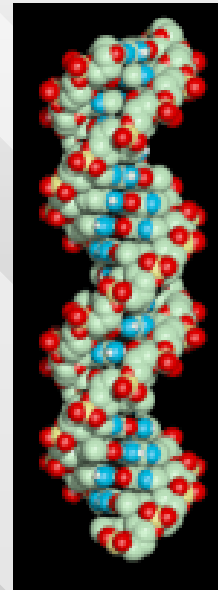
"It has not escaped our notice that the specific (base) pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material."

"Non ci è sfuggito il fatto che l'appaiamento specifico delle basi suggerisca un possibile meccanismo di copiatura del materiale genetico..."



Uno dei più famosi  
"understatement" della storia...

Fonte: Watson and Crick, Nature 1953



## MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS

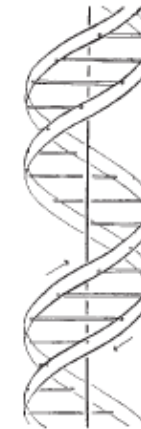
### A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid

WE wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.). This structure has novel features which are of considerable biological interest.

A structure for nucleic acid has already been proposed by Pauling and Corey<sup>1</sup>. They kindly made their manuscript available to us in advance of publication. Their model consists of three intertwined chains, with the phosphates near the fibre axis, and the bases on the outside. In our opinion, this structure is unsatisfactory for two reasons: (1) We believe that the material which gives the X-ray diagrams is the salt, not the free acid. Without the acidic hydrogen atoms it is not clear what forces would hold the structure together, especially as the negatively charged phosphates near the axis will repel each other. (2) Some of the van der Waals distances appear to be too small.

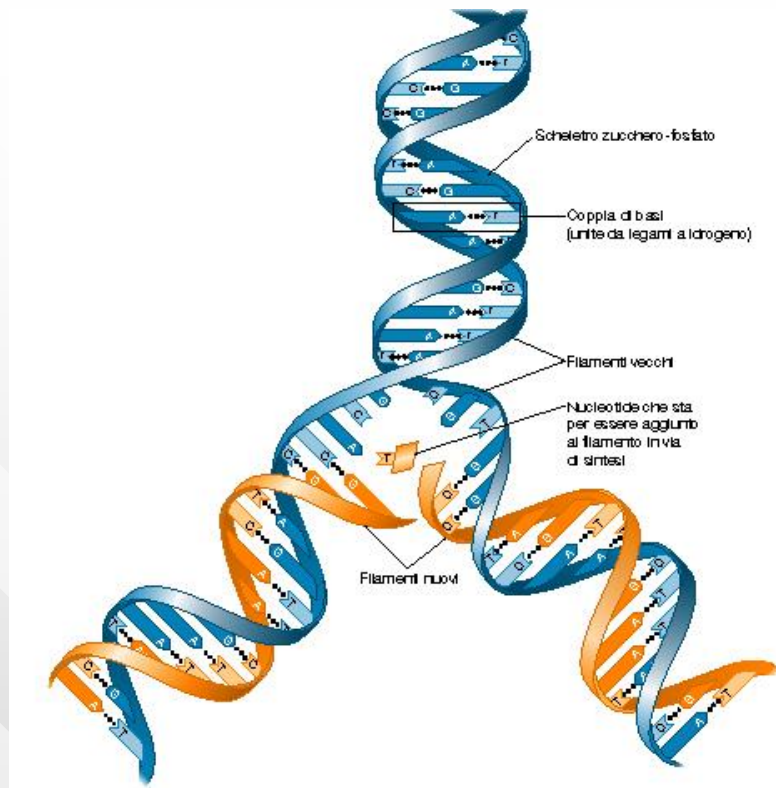
Another three-chain structure has also been suggested by Fraser (in the press). In his model the phosphates are on the outside and the bases on the inside, linked together by hydrogen bonds. This structure as described is rather ill-defined, and for this reason we shall not comment on it.

We wish to put forward a radically different structure for the salt of deoxyribose nucleic acid. This structure has two helical chains each coiled round the same axis (see diagram). We have made the usual chemical assumptions, namely, that each chain consists of phosphate diester groups joining  $\beta$ -D-deoxy-ribofuranose residues with 3',5' linkages. The two chains (but not their bases) are related by a dyad perpendicular to the fibre axis. Both chains follow right-handed helices, but owing to the dyad the sequences of the atoms in the two chains run in opposite directions. Each chain loosely resembles Furberg's<sup>2</sup> model No. 1; that is, the bases are on the inside of the helix and the phosphates on the outside. The configuration of the sugar and the atoms near it is close to Furberg's 'standard configuration', the sugar being roughly perpendicular to the attached base. There



This figure is purely diagrammatic. The two ribbons symbolize the two phosphate-sugar chains, and the horizontal rods the pairs of bases holding the chains together. The vertical line marks the fibre axis.

## Replicazione del DNA



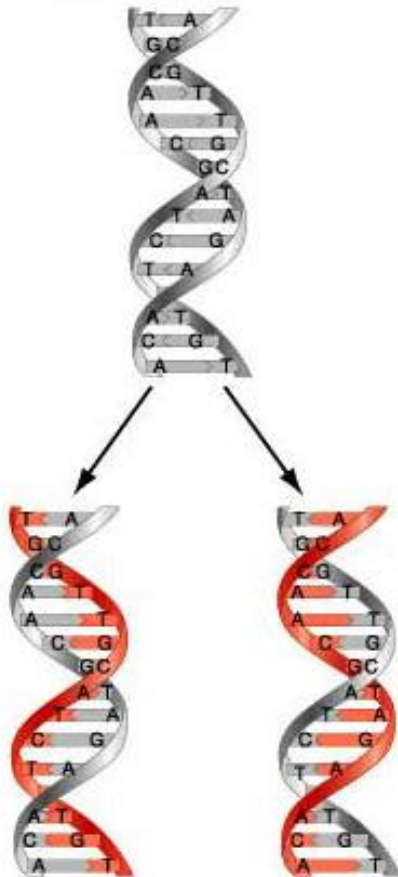
Il DNA ha una struttura a doppia elica ed il suo meccanismo di replicazione sembra ovvio, ma.... **come avviene effettivamente questo processo?**

In realtà è molto più complesso di quanto appaia a prima vista

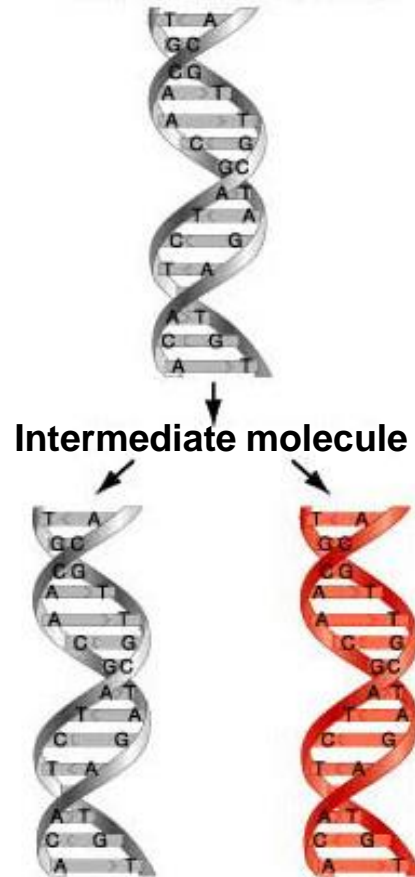
# Primo problema: il **modello di replicazione del DNA**

Inizialmente furono formulate **tre ipotesi**

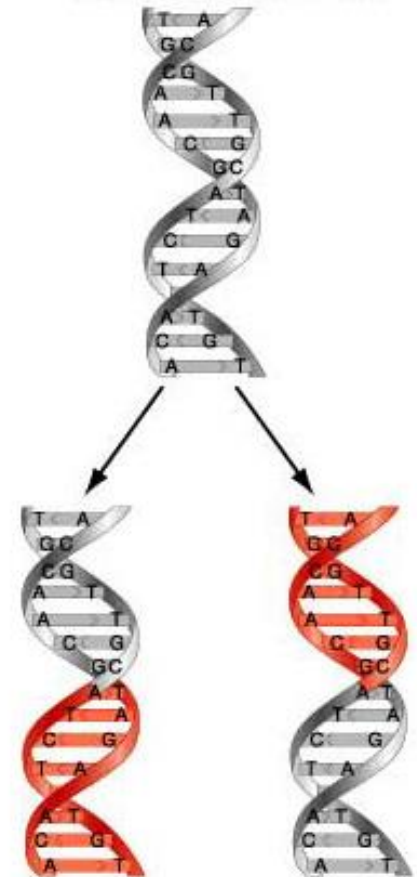
**(a) Hypothesis 1:  
Semi-conservative  
replication**



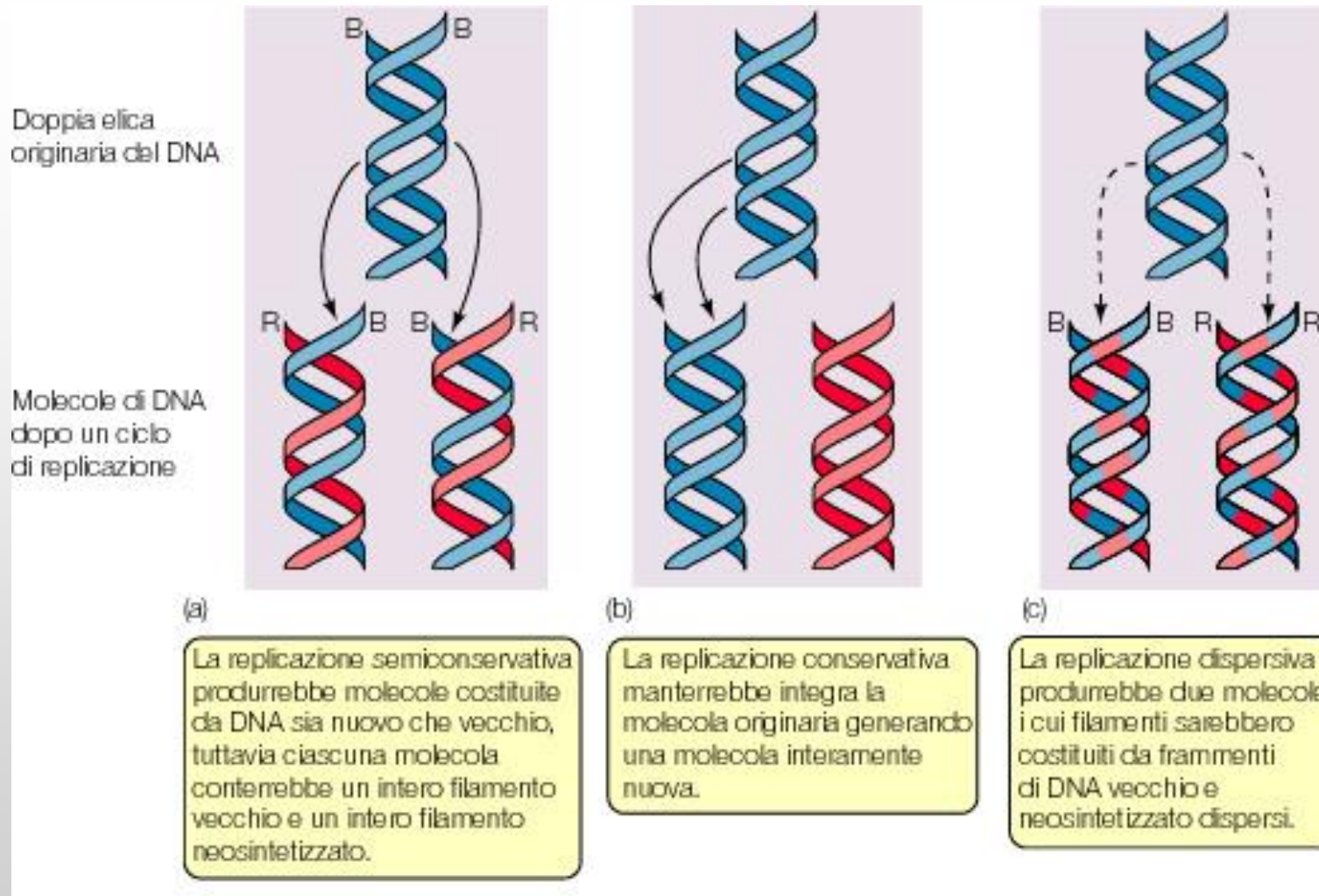
**(b) Hypothesis 2:  
Conservative replication**



**(c) Hypothesis 3:  
Dispersive replication**



# Replicazione conservativa, semiconservativa e dispersiva

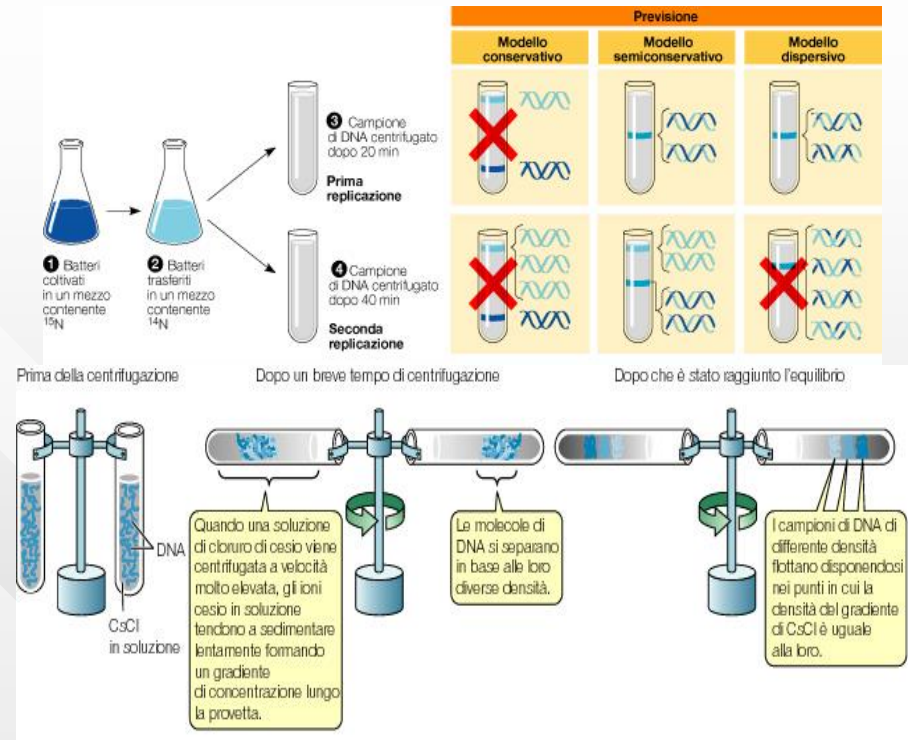


Oggi sappiamo che l'unica modalità corretta di replicazione è quella SEMICONSERVATIVA, **ma come è stata dimostrata la correttezza di questa ipotesi?**

# Prova della replicazione semiconservativa del DNA: i classici esperimenti di Matthew Meselson e Franklin Stahl (1958)



FIGURE 9-3. (Left) Matthew Meselson (b. 1930). (Right) Franklin W. Stahl (b. 1929). [Courtesy of M. Meselson.]



## THE REPLICATION OF DNA IN *ESCHERICHIA COLI*\*

By MATTHEW MESELSON AND FRANKLIN W. STAHL

GATES AND CRELLIN LABORATORIES OF CHEMISTRY,† AND NORMAN W. CHURCH LABORATORY OF CHEMICAL BIOLOGY, CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY, PASADENA, CALIFORNIA

Communicated by Max Delbrück, May 14, 1958

*Introduction.*—Studies of bacterial transformation and bacteriophage infection<sup>1-5</sup> strongly indicate that deoxyribonucleic acid (DNA) can carry and transmit hereditary information and can direct its own replication. Hypotheses for the mechanism of DNA replication differ in the predictions they make concerning the distribution among progeny molecules of atoms derived from parental molecules.<sup>6</sup>

Radioisotopic labels have been employed in experiments bearing on the distribution of parental atoms among progeny molecules in several organisms.<sup>6-9</sup> We anticipated that a label which imparts to the DNA molecule an increased density might permit an analysis of this distribution by sedimentation techniques. To this end, a method was developed for the detection of small density differences among

Meselson e Stahl usarono cellule di *E. coli* cresciute in un mezzo di coltura in cui i precursori delle basi del DNA erano marcati con l'isotopo dell'azoto <sup>15</sup>N (azoto "pesante")

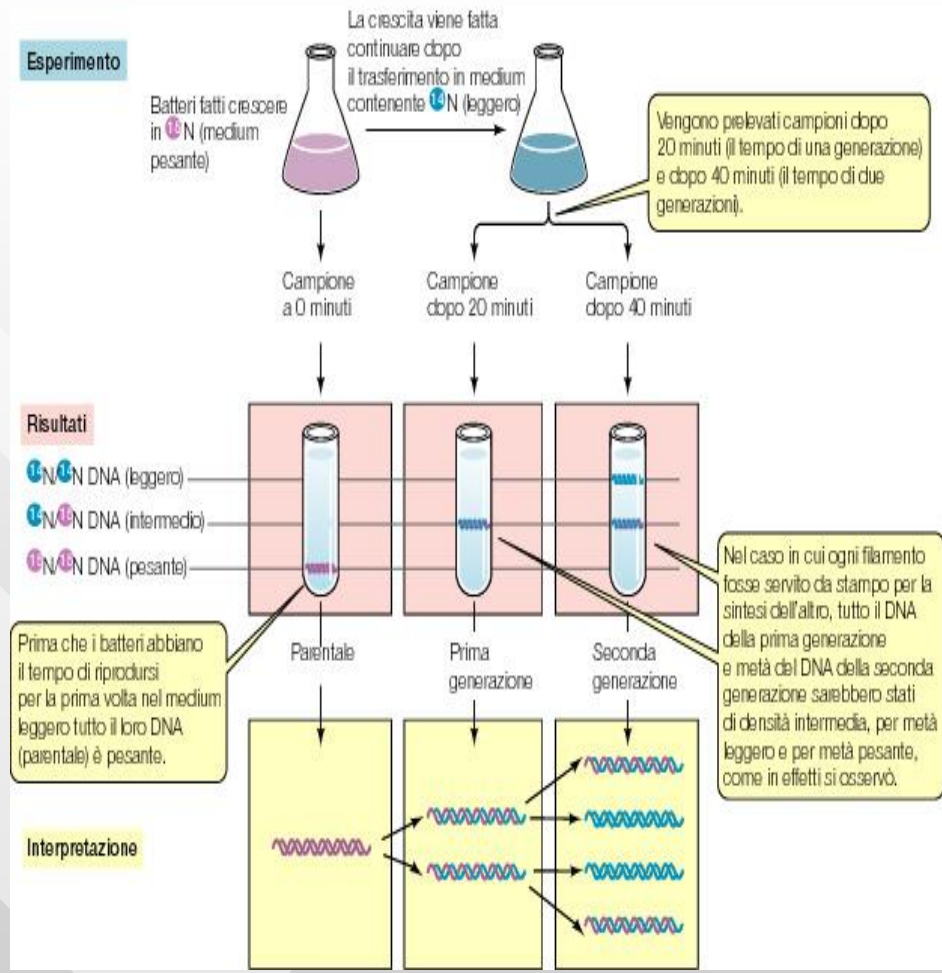
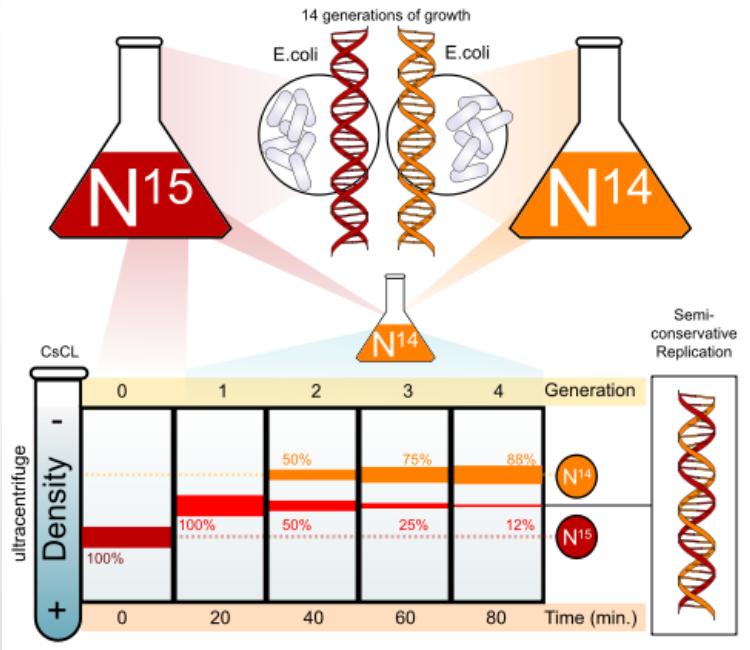
Le cellule avevano quindi un DNA marcato con azoto "pesante", che nel gradiente di densità della centrifugazione in cloruro di cesio si accumulava verso il fondo della provetta (banda "pesante")

Il DNA normale (con azoto <sup>14</sup>N) si collocava nella parte alta del gradiente di centrifugazione (banda "leggera")

Fonte:

Meselson and Stahl, PNAS 44: 671-682, 1958

# Esperimento di M. Meselson e F. Stahl (definito “il più elegante della storia della biologia”)



Dopo avere fatto replicare **una volta sola** le cellule marcate con azoto “pesante” in un mezzo di coltura con azoto normale, Meselson e Stahl estrassero il DNA replicato e lo centrifugarono

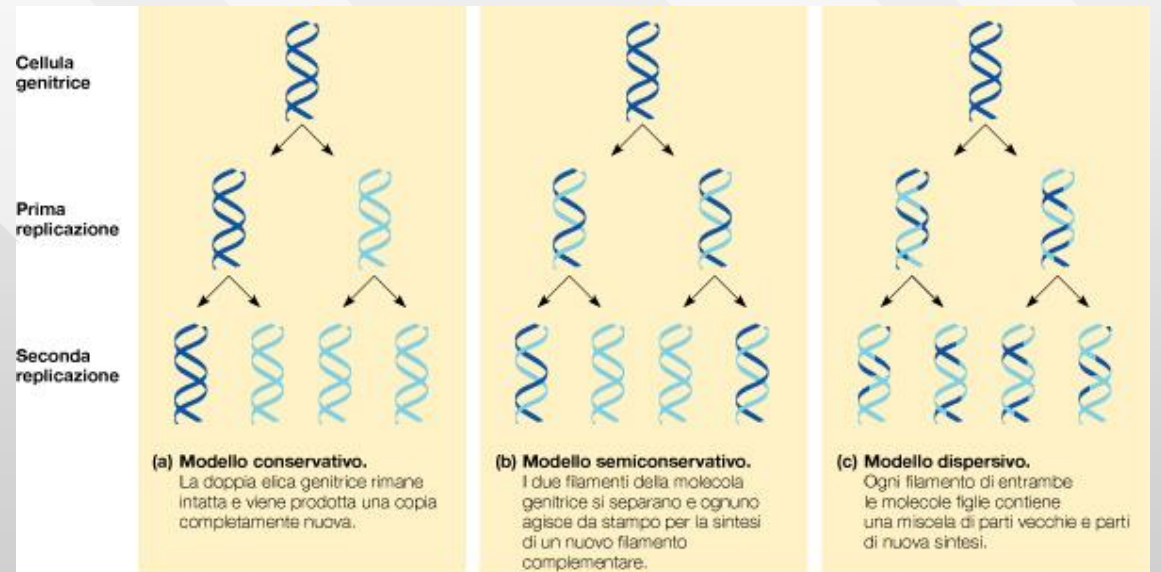
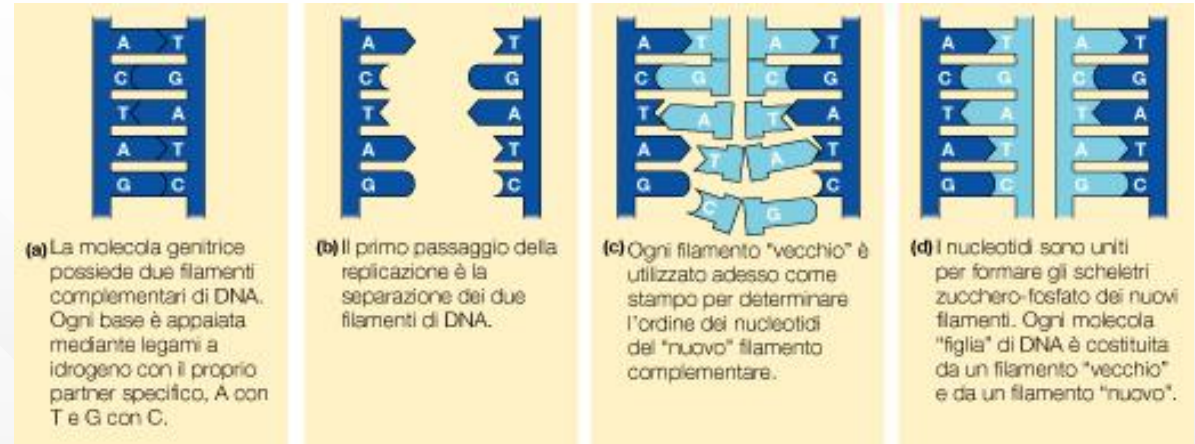
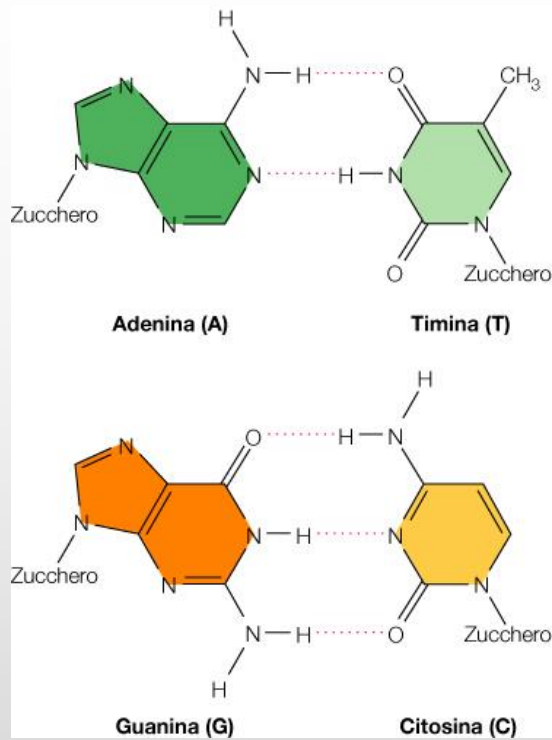
La banda di centrifugazione del DNA si collocava in un **punto intermedio del gradiente (banda “ibrida”)**

Dopo **un secondo ciclo di replicazione**, la **banda “pesante” scompariva** e appariva una **banda “leggera”**, al di sopra della banda “ibrida”

Fonte: Meselson e Stahl, 1958; Sadava et al., 2014; 2019



# La replicazione del DNA è quindi solo **semiconservativa**



La **banda "ibrida"** comparsa dopo il primo ciclo di replicazione **permetteva di escludere che la replicazione fosse conservativa**

...e la comparsa di una banda "leggera" insieme a quella "ibrida" dopo il secondo ciclo di replicazione **permetteva di escludere che la replicazione fosse dispersiva**

Ma vi era un altro problema fondamentale:  
 i due filamenti della doppia elica del DNA sono **ANTIPARALLELI**....

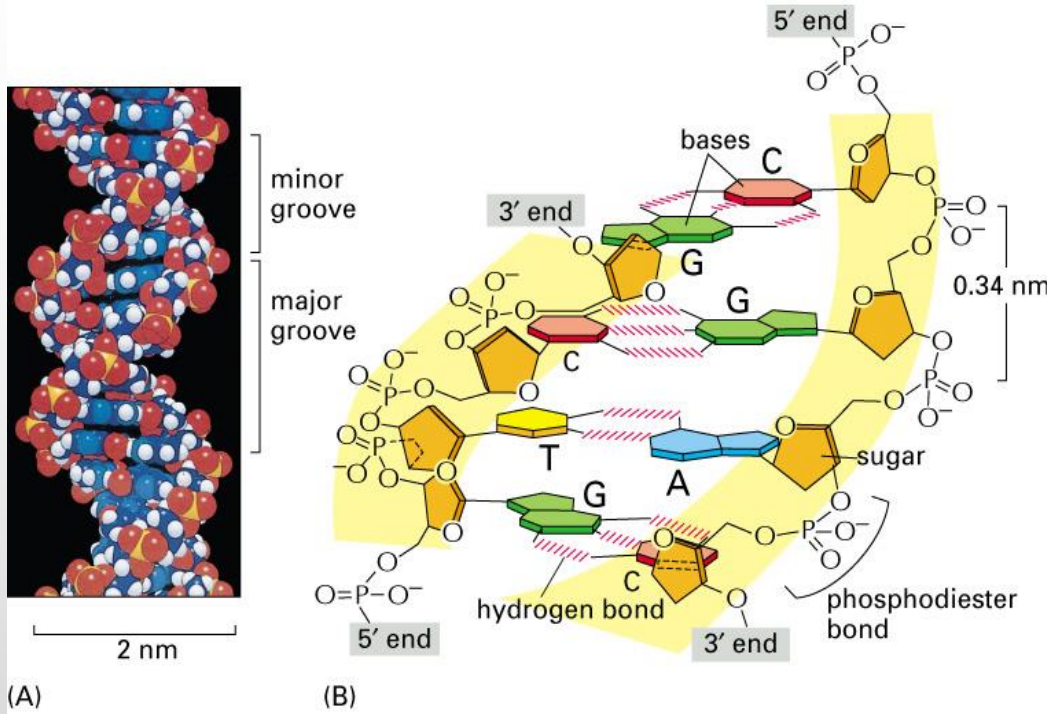
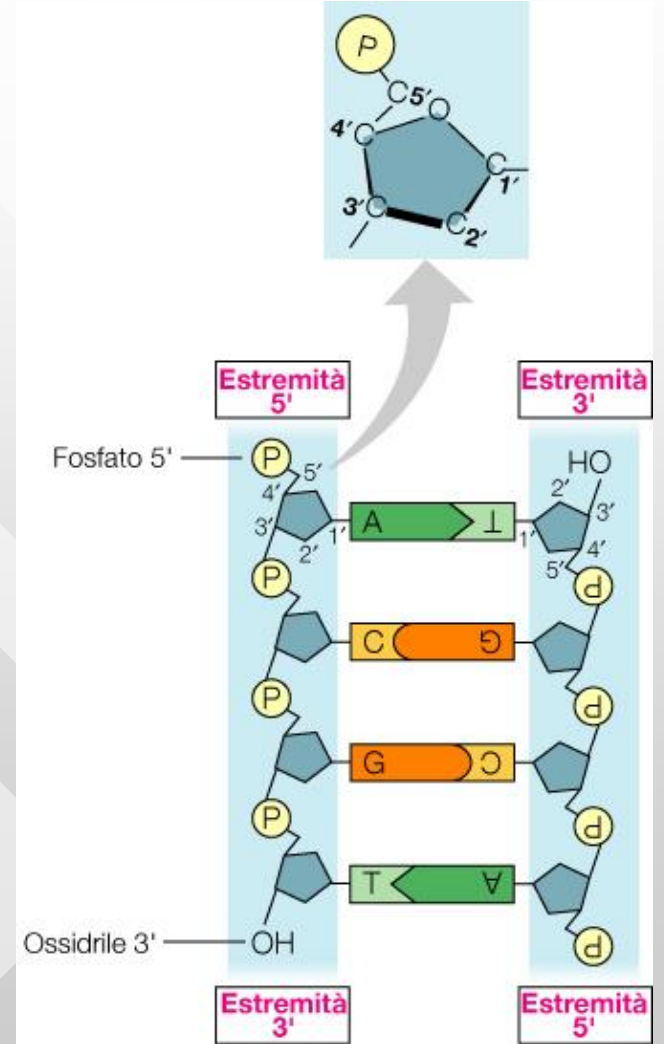


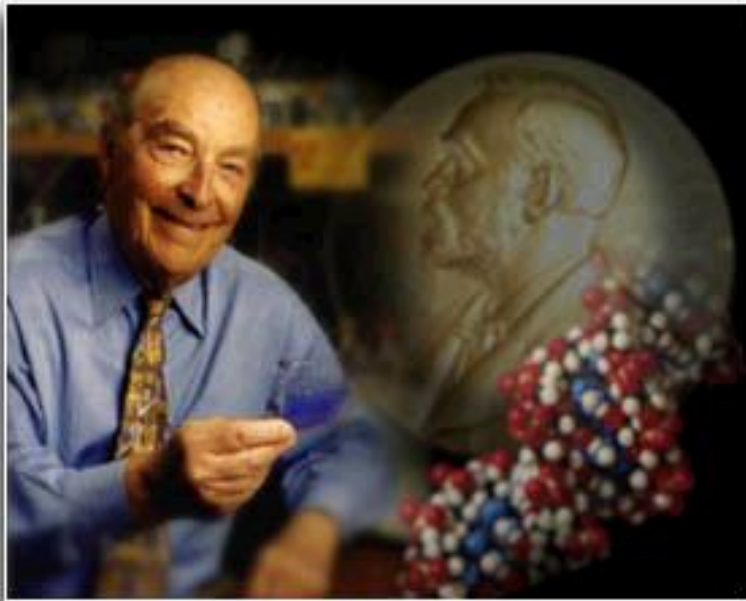
Figure 4-5. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Esistevano forse **due enzimi diversi** nella replicazione, cioè uno che aggiungeva nucleotidi in direzione  $5' \rightarrow 3'$ , e l'altro in direzione  $3' \rightarrow 5'$  ?



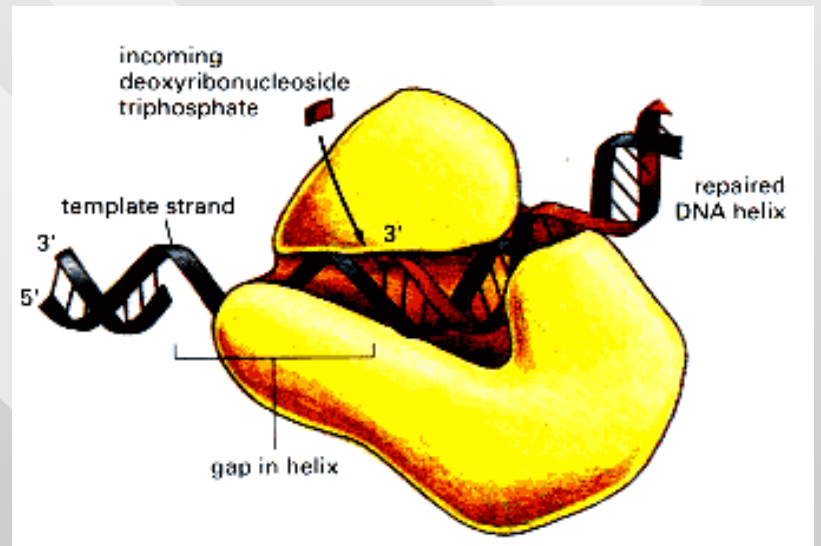
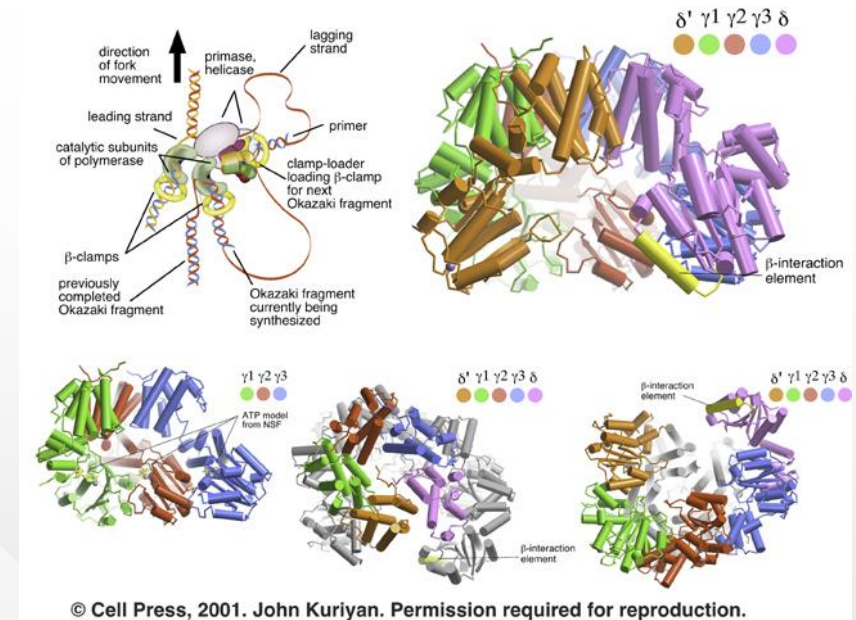
# Arthur Kornberg (1928-2007)

Nel 1956 scoprì l'enzima fondamentale che esegue la replicazione del DNA, la **DNA polimerasi**

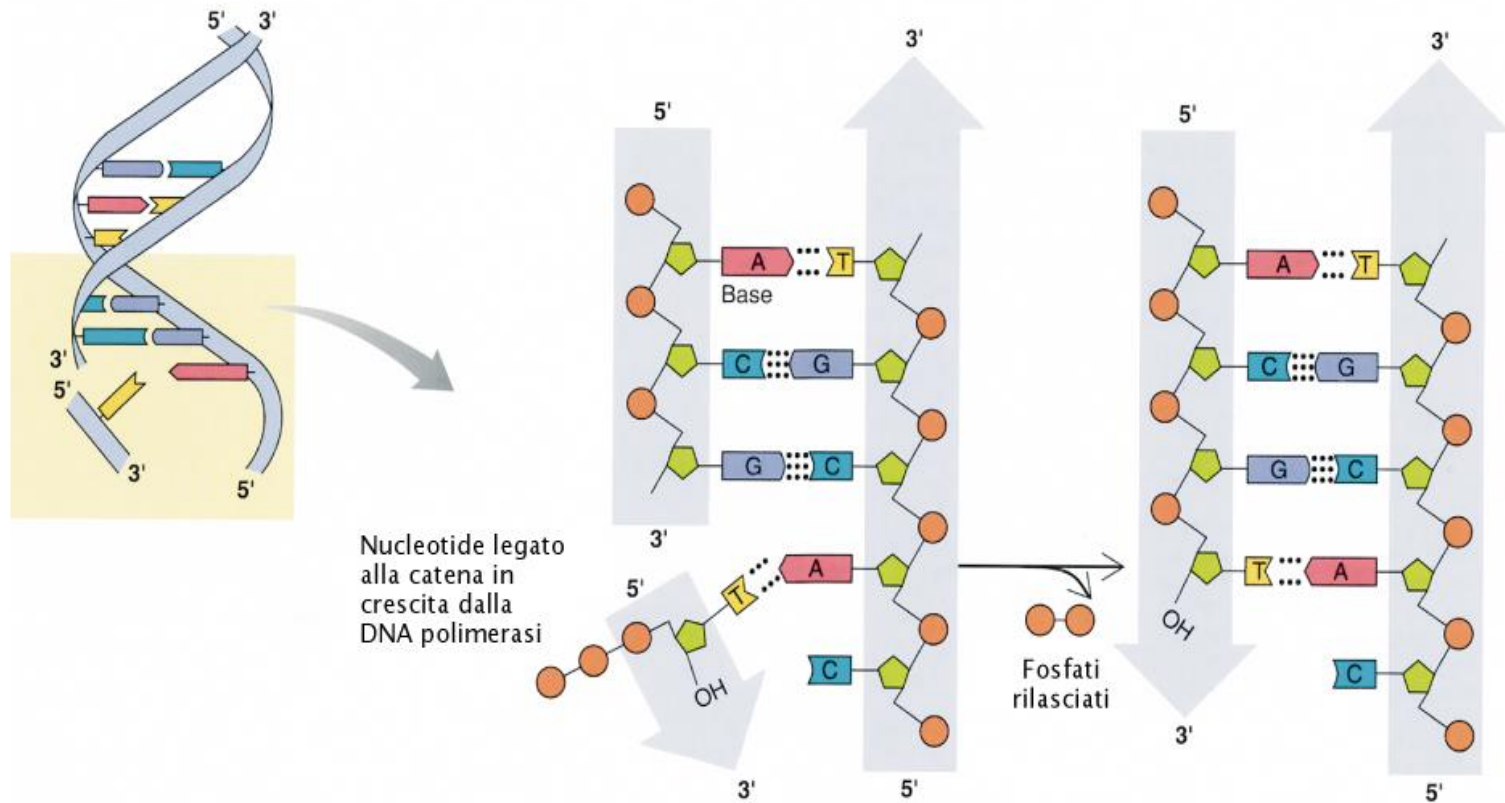


Premio Nobel 1959 per la Medicina e la Fisiologia, insieme a Severo Ochoa

Fonti: Sadava et al., 2014; 2019; Alberts et al., 2002

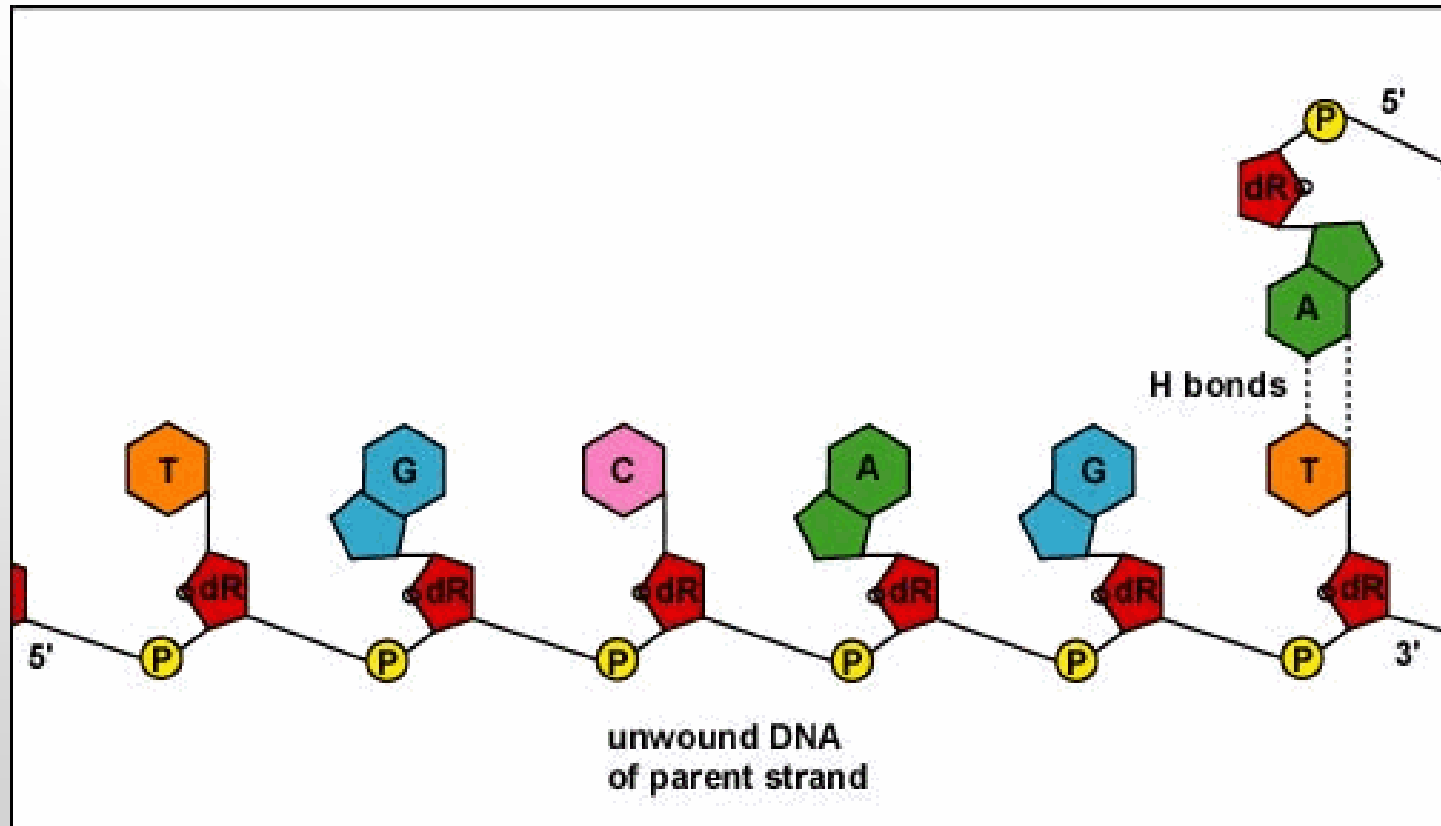


La **DNA polimerasi** esegue l'appaiamento e l'aggiunta di nuovi nucleotidi **SOLO** in direzione **5' → 3'**



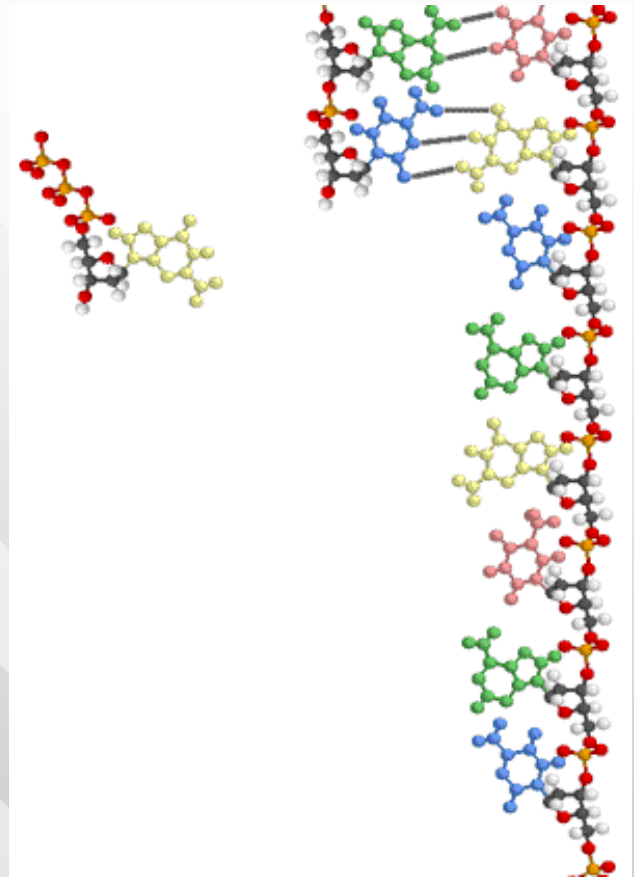
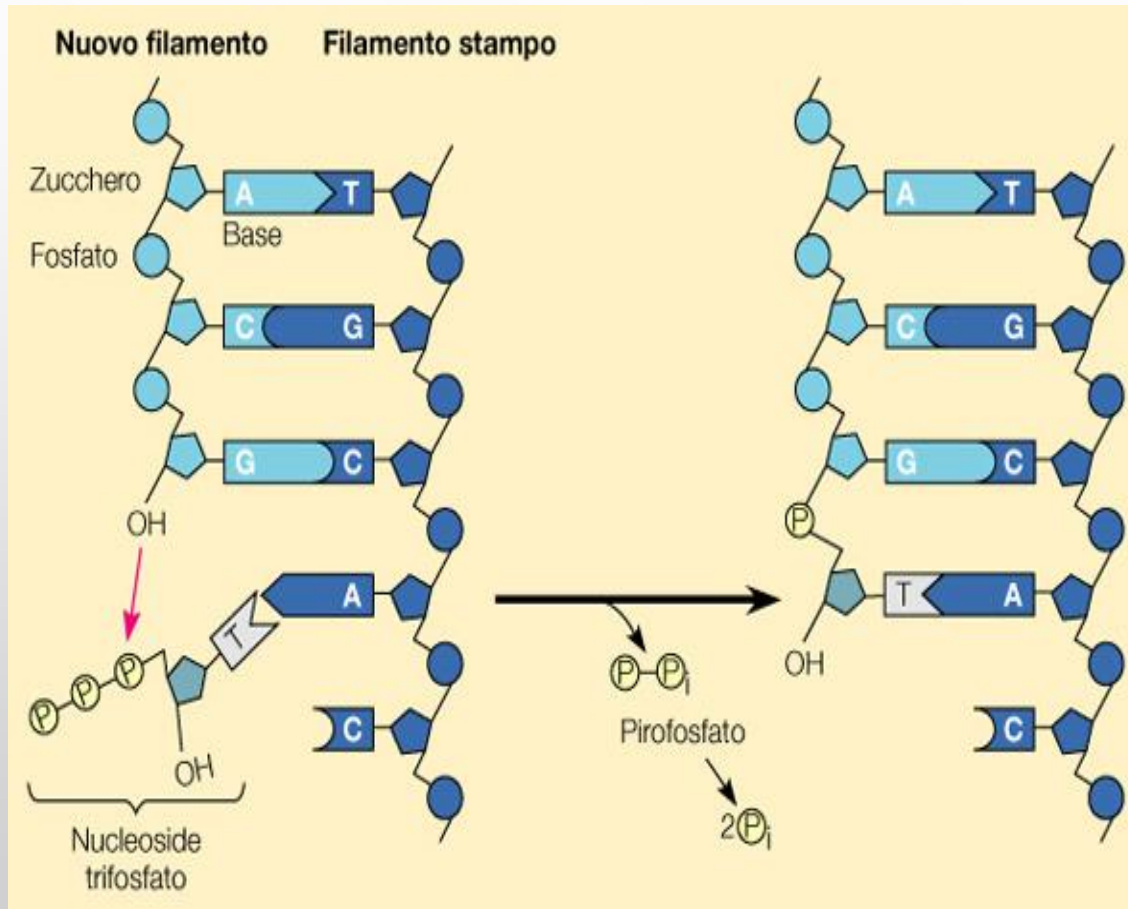
■ **Figura 11-9 La replicazione del DNA.** Gli enzimi specifici (polimerasi) che catalizzano le reazioni di polimerizzazione aggiungono un nucleotide alla volta all'estremità 3' della catena nascente.

Appaiamento dei nucleotidi e allungamento del nuovo  
filamento di DNA **in direzione 5' → 3'**



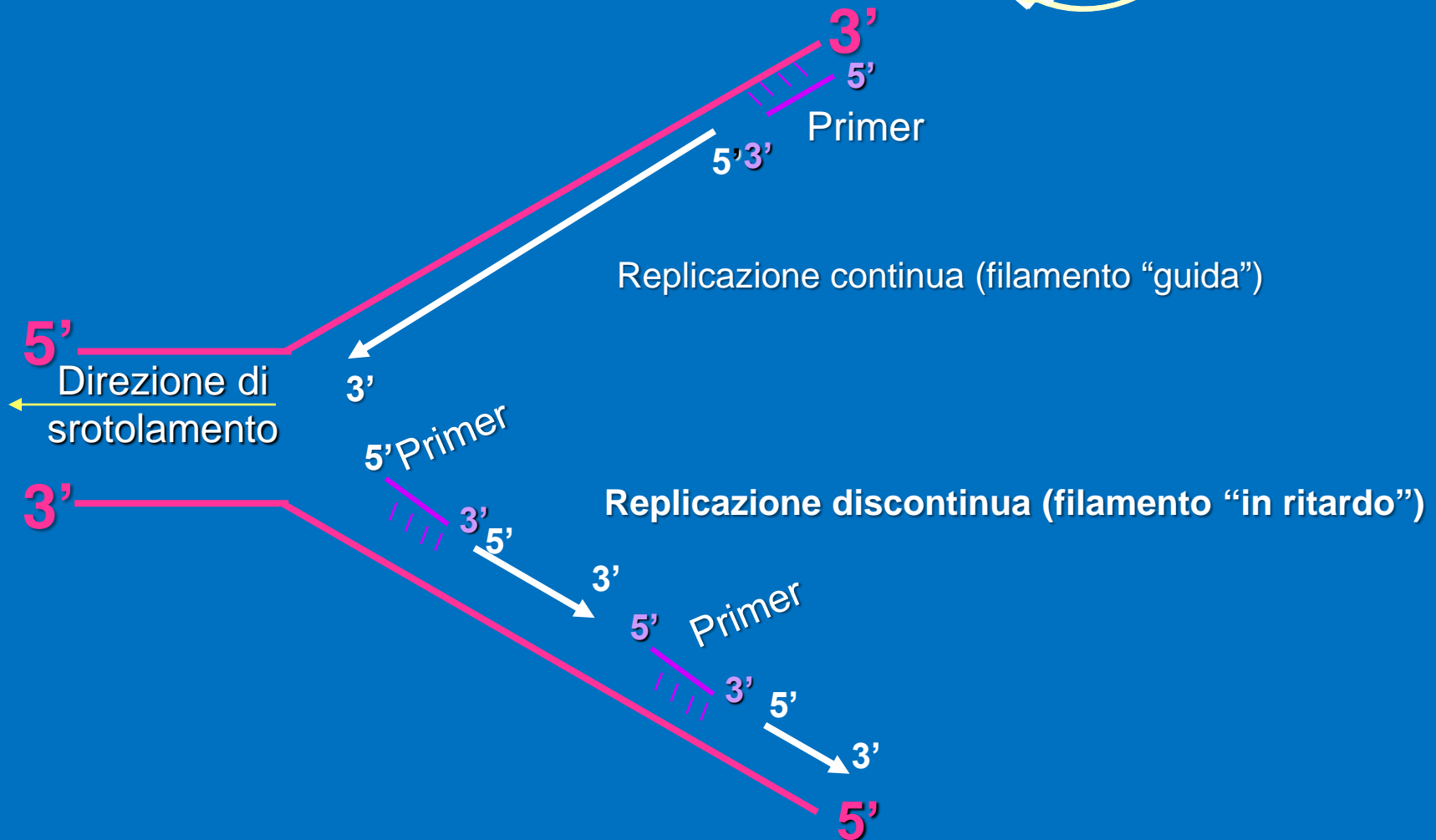
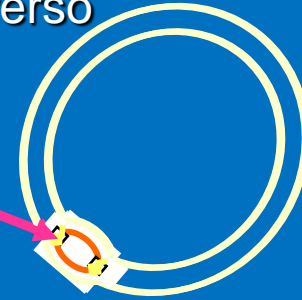
L'aggiunta di nuovi nucleotidi tramite legami fosfodiesterici avviene  
**'in coda'** al nucleotide precedente (**polimerizzazione di "coda"**)

# Allungamento della catena del DNA



Dato che i due filamenti di DNA sono **antiparalleli**,  
la loro replicazione avviene in modo diverso

Consideriamo una “forcella” di replicazione,  
ad esempio nel DNA circolare di un batterio:



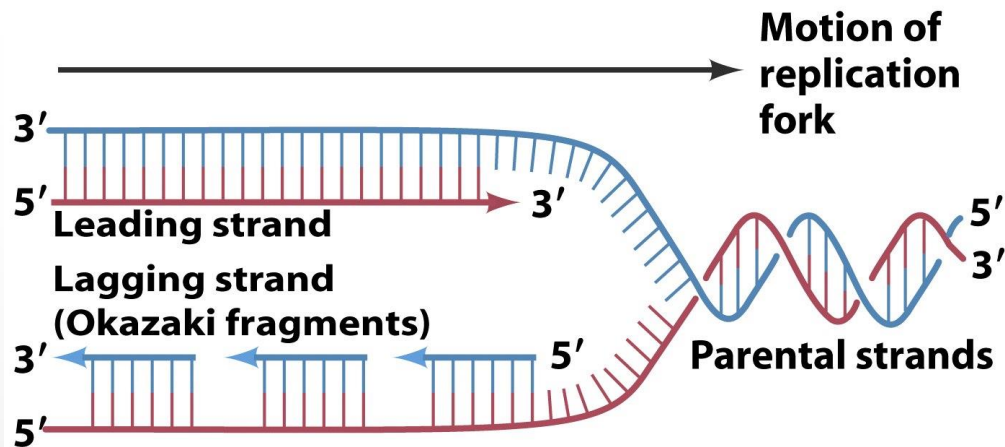


Figure 24-5 Fundamentals of Biochemistry, 2/e  
© 2006 John Wiley & Sons

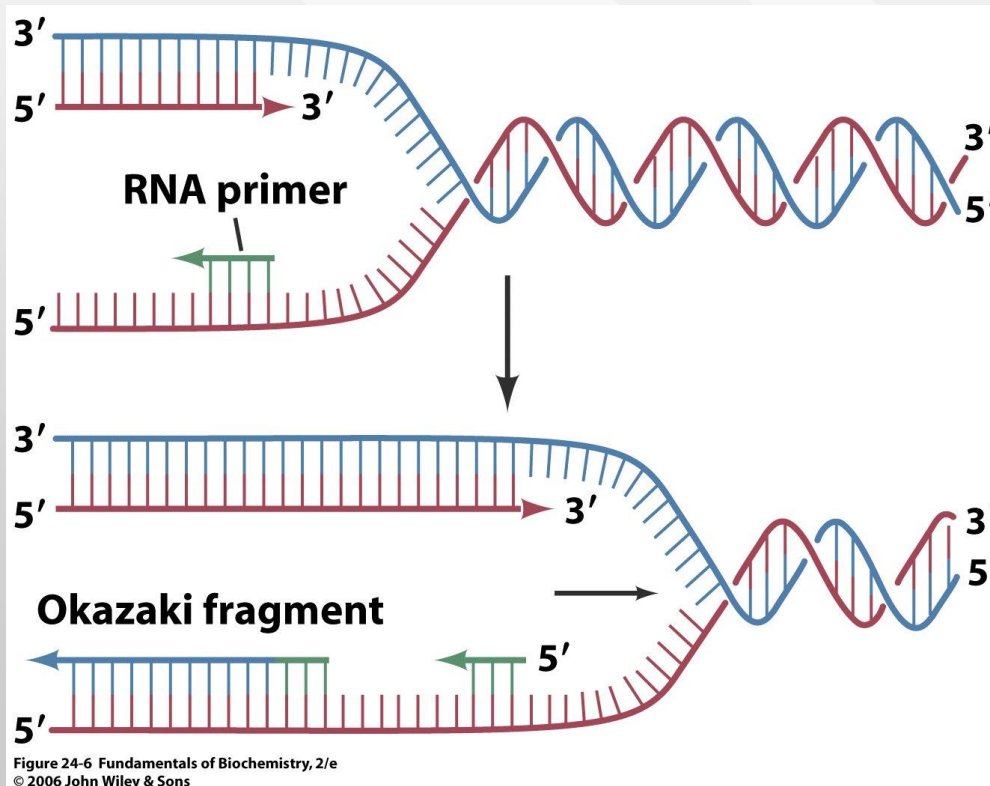
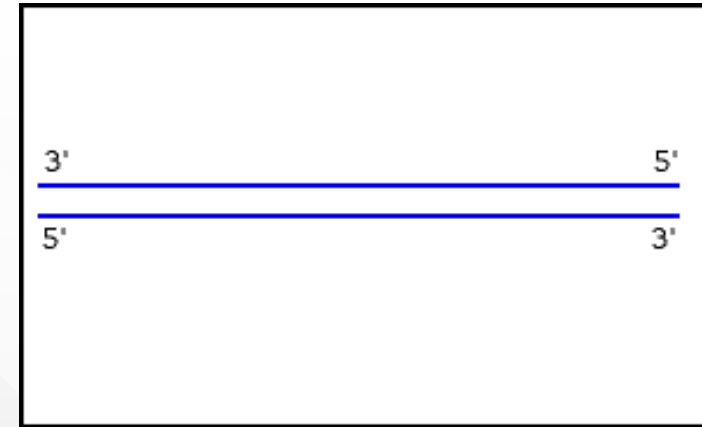
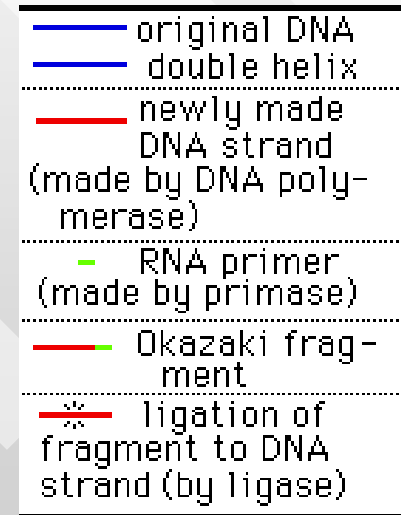


Figure 24-6 Fundamentals of Biochemistry, 2/e  
© 2006 John Wiley & Sons



Fonte: Voet et al., Fundamentals of Biochemistry, John Wiley & Sons, 2006



# Frammenti di Reiji Okazaki e Tsuneko Okazaki (1968)



Reiji Okazaki  
(1930-1975)



Tsuneko Okazaki  
Professore Emerito  
all'Università di Nagoya  
Premio UNESCO "Women  
in Science" 2000

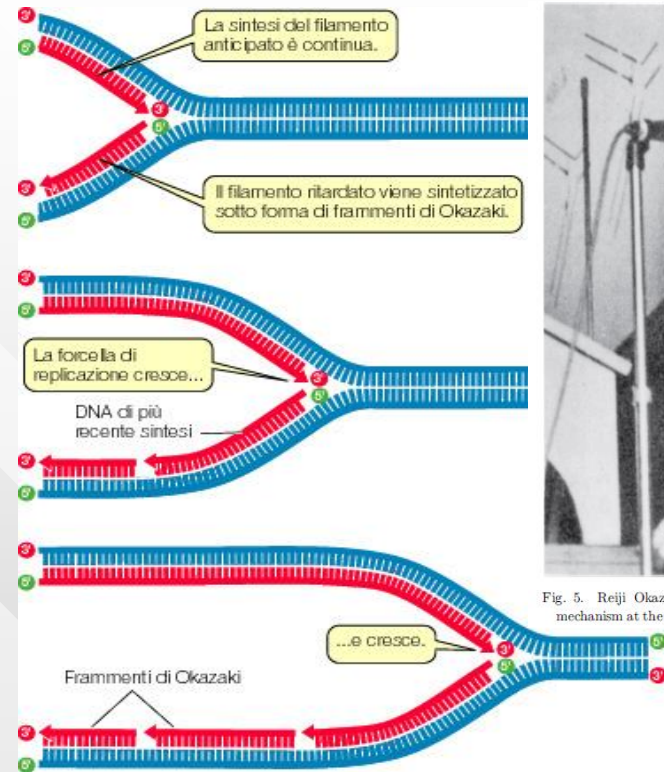
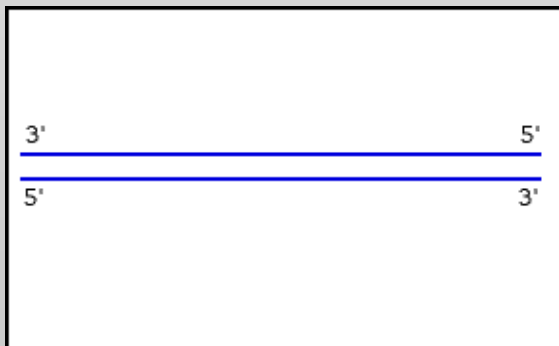


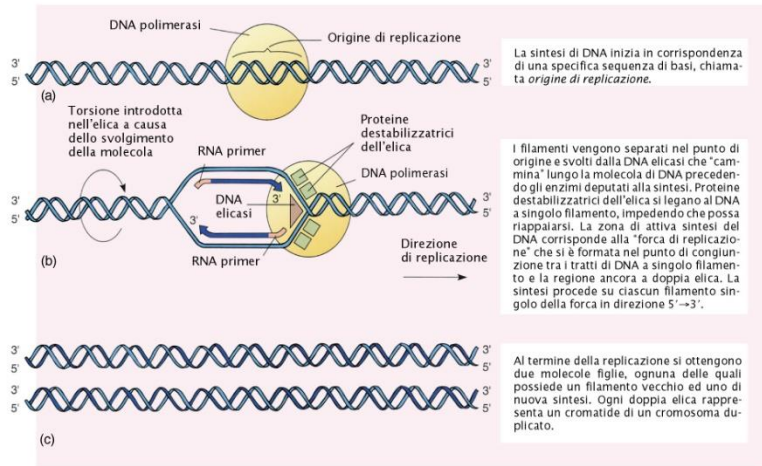
Fig. 5. Reiji Okazaki presenting the discontinuous replication mechanism at the Cold Spring Harbor Symposium in June 1968.



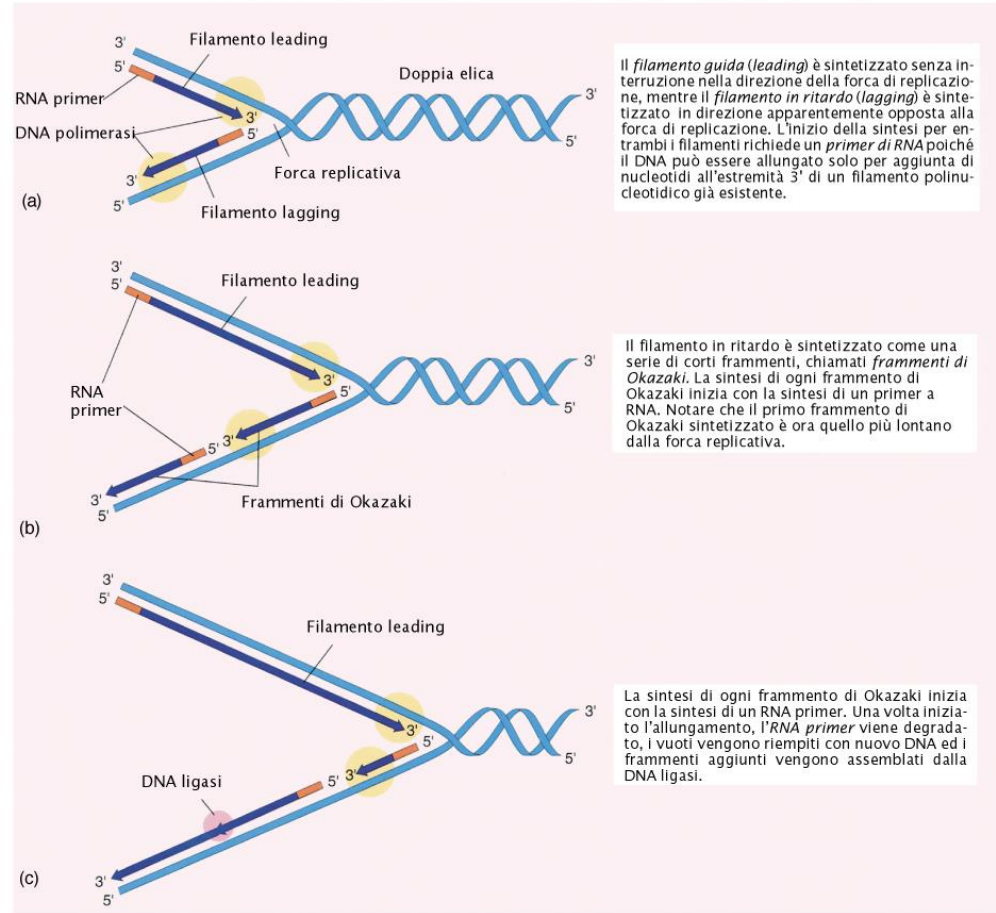
Okazaki et al. "Mechanism of DNA chain growth. I. Possible discontinuity and unusual secondary structure of newly synthesized chains". PNAS 59: 598-605, 1968

Fonti: Sadava et al., 2014; 2019  
Okazaki et al., 1968; Okazaki, PNAS 93, 2017

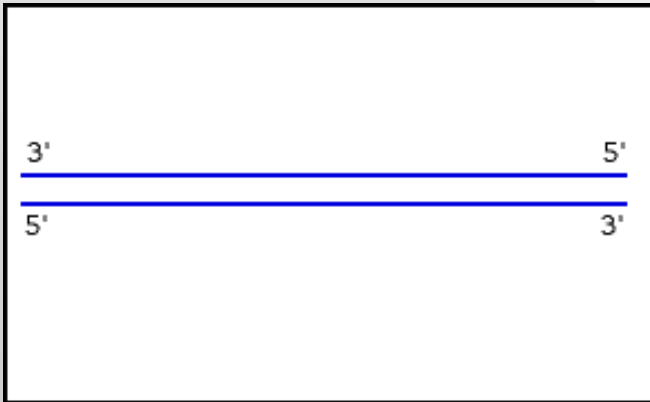
# Replicazione del DNA: "primer", "bolle" e "forcelle"

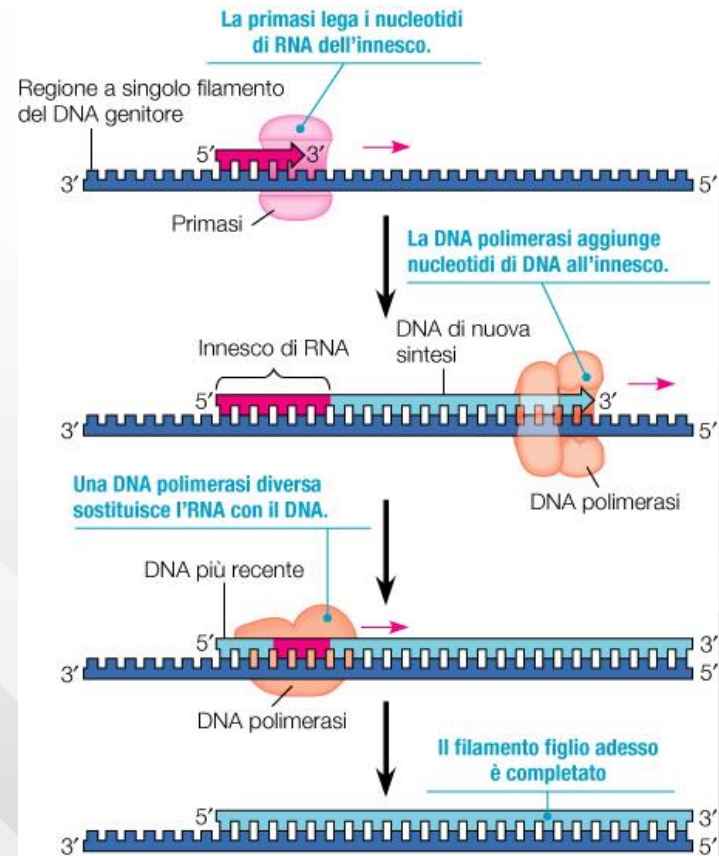
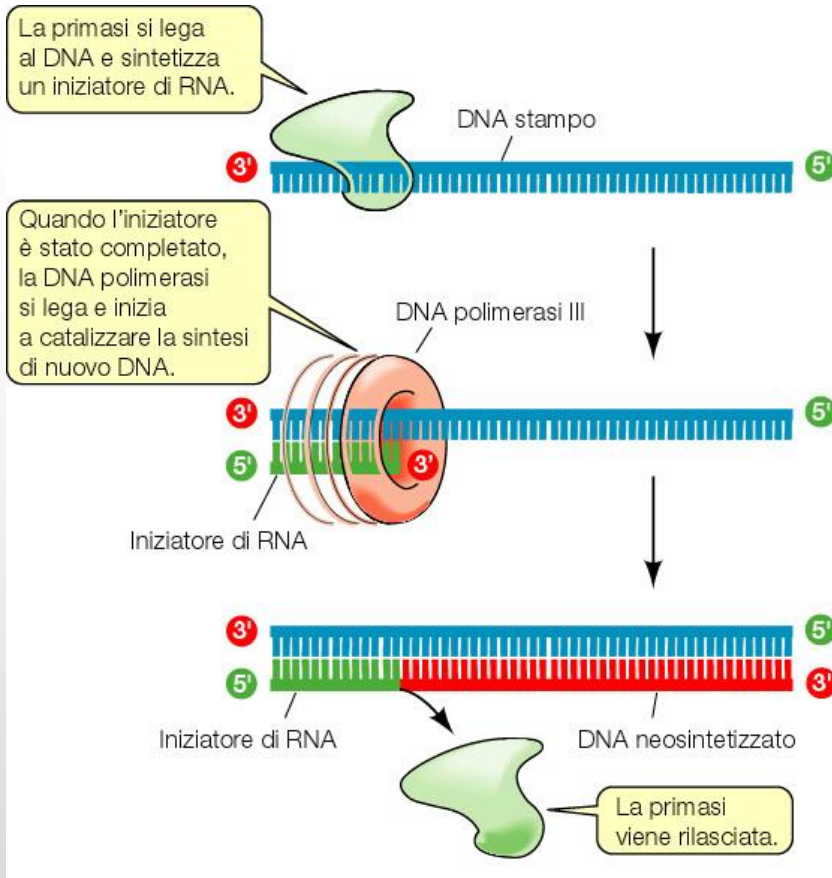


■ **Figura 11-10 Panoramica della sintesi del DNA.** Questo processo richiede diverse fasi che coinvolgono vari enzimi e RNA primer.



■ **Figura 11-11 I filamenti guida e in ritardo.** Poiché l'allungamento può procedere solo nella direzione 5' → 3', i due filamenti alla forca di replicazione vengono copiati in modo diverso, ognuno da una molecola di DNA polimerasi distinta.

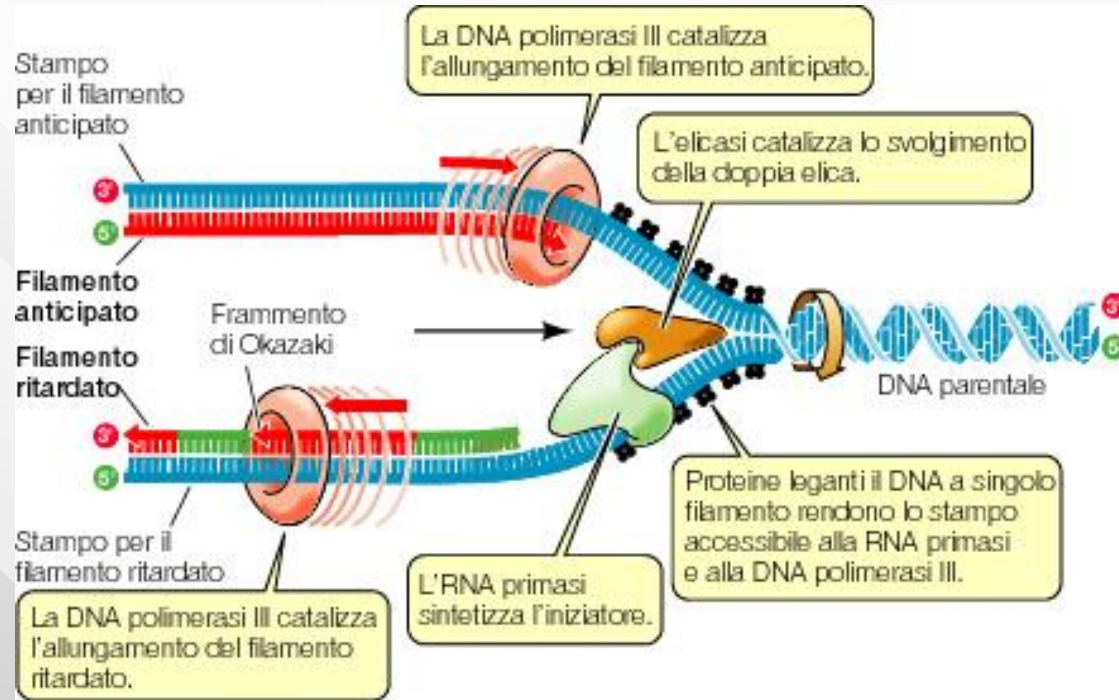
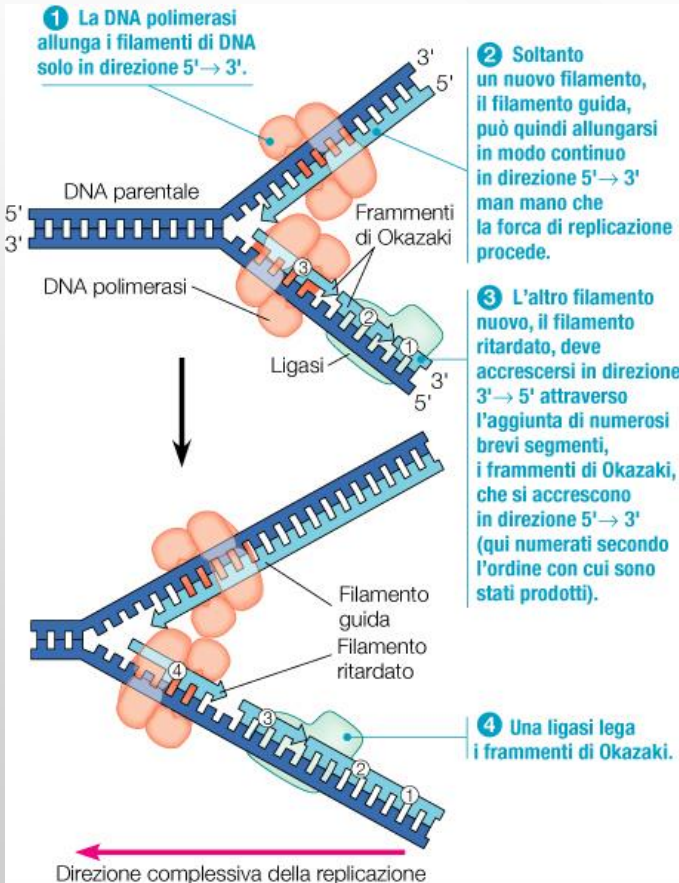




L'enzima “**primasi**” costruisce il “**primer**” (in italiano “**innesco**”), un tratto di RNA ibridato con il DNA stampo, per fornire alla DNA polimerasi una estremità 3' da cui iniziare ad **aggiungere nucleotidi SEMPRE in direzione 5' → 3'**

In ogni forcella di replicazione vi sono due DNA polimerasi (“**dimero**”), una per ciascun filamento

Entrambe aggiungono nucleotidi in direzione  $5' \rightarrow 3'$ , ma in direzione diversa rispetto alla forcella di replicazione



Filmati

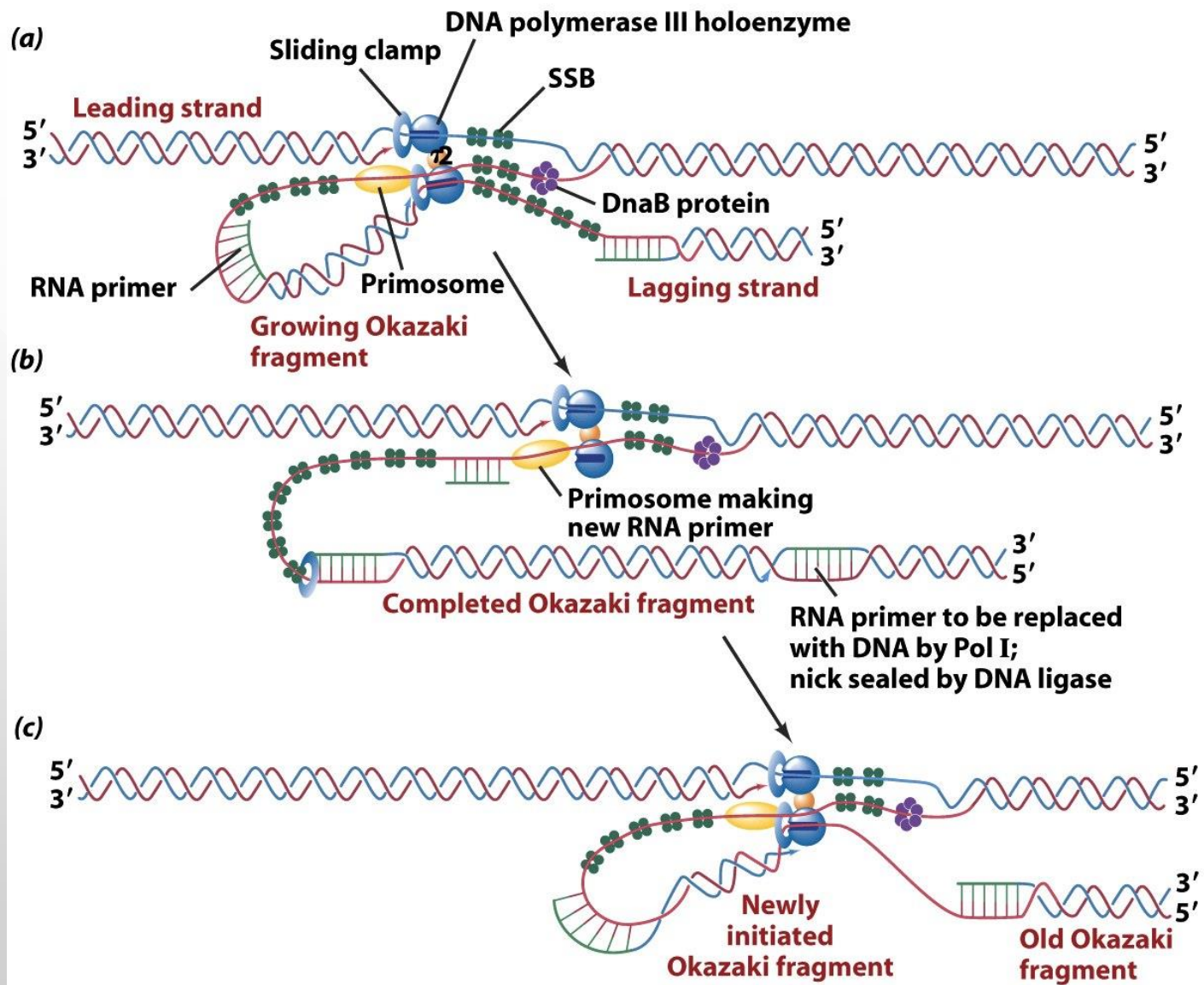
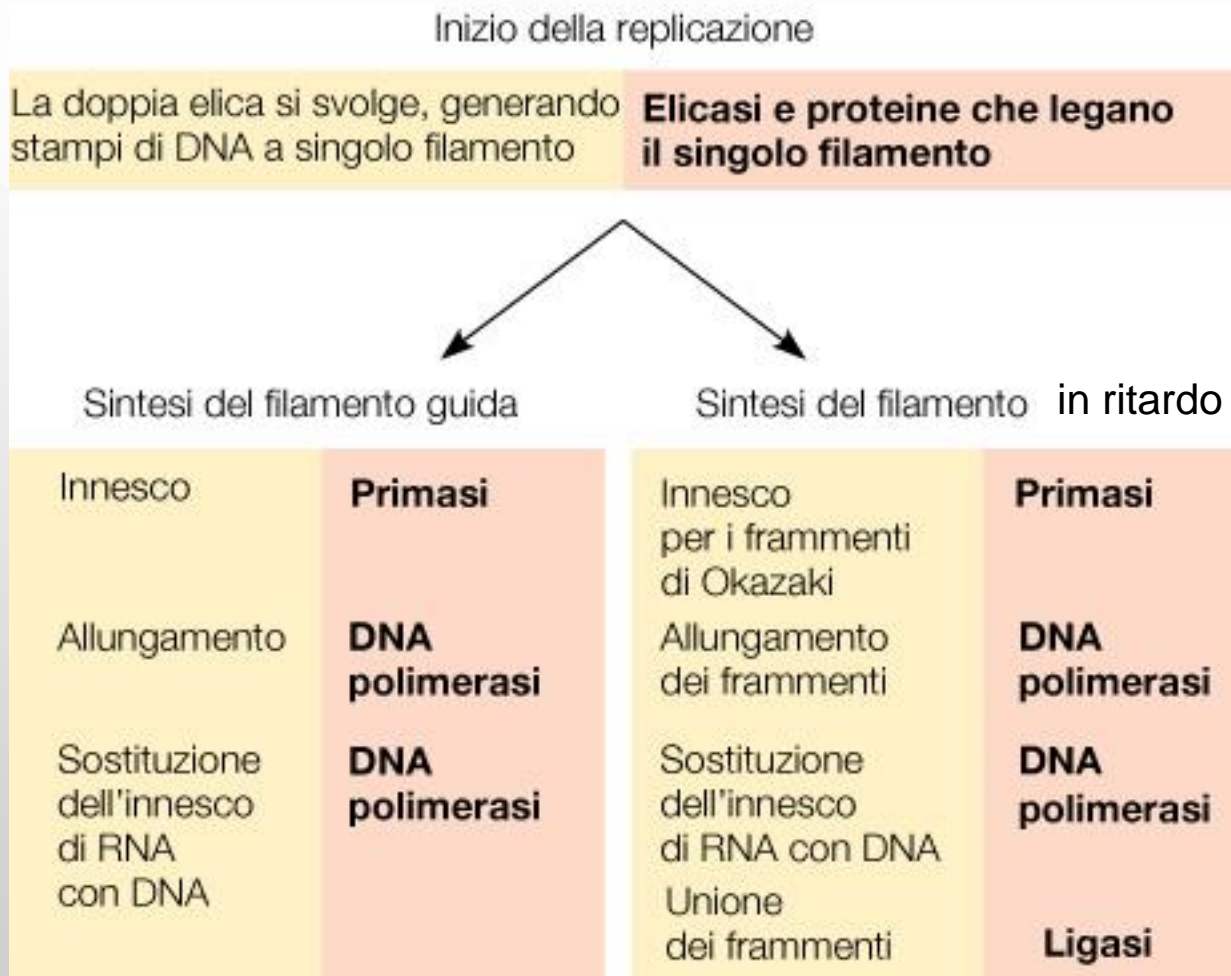


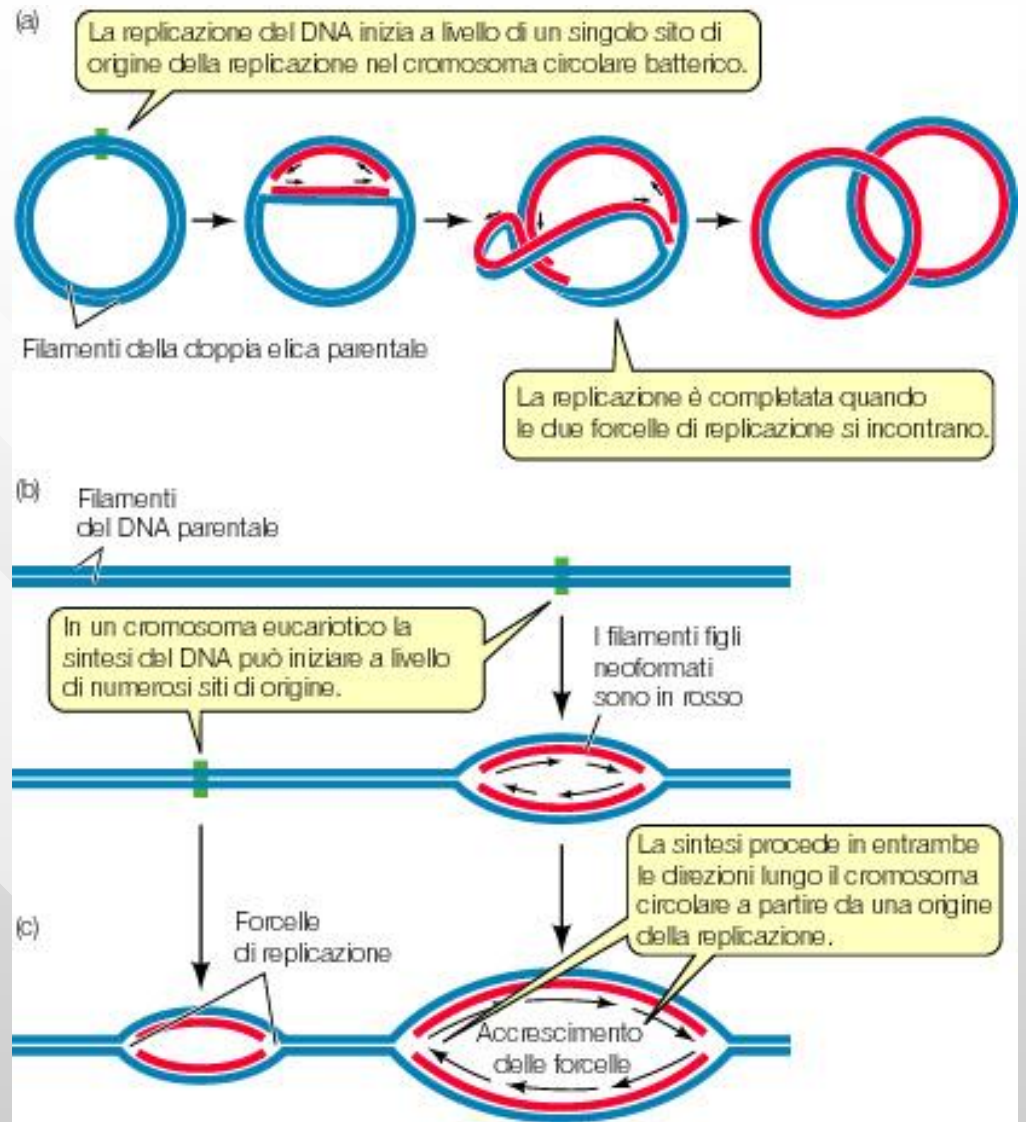
Figure 24-15 Fundamentals of Biochemistry, 2/e  
 © 2006 John Wiley & Sons

# Riassunto degli eventi della replicazione del DNA



## Origine della replicazione

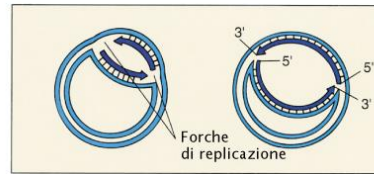
La replicazione del DNA inizia in corrispondenza di una specifica sequenza di basi, detta “**origine della replicazione**”



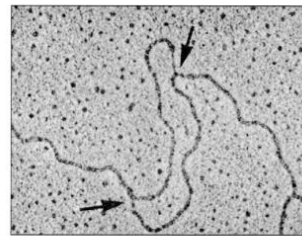
# La replicazione del DNA è **bidirezionale** sia nei Procarioni sia negli Eucarioti, ma...

- nei Procarioni vi è un'**unica origine della replicazione (ori)** e la 'bolla' di replicazione è una sola

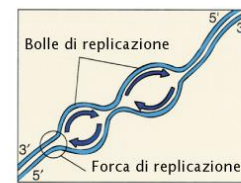
- negli Eucarioti vi sono **fino a 1000 origini della replicazione** e numerose 'bolle' di replicazione



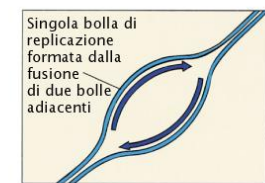
(a)



(b)

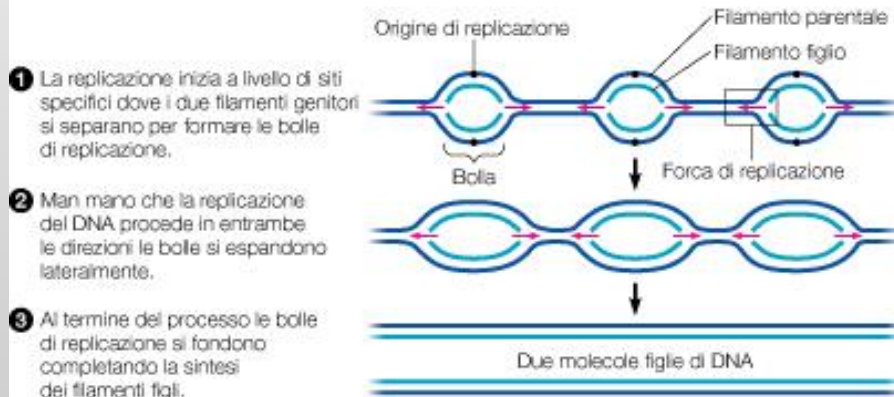


(c)



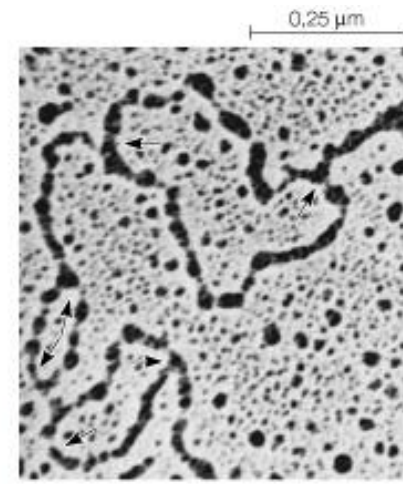
(d)

■ **Figura 11-12 La replicazione del DNA è bidirezionale.** 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. (b) La fotografia al microscopio elettronico a trasmissione mostra 2 forche di replicazione (*frecche*) 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 (d). (b, per gent. conc. di D.S. Hogness e H.J. Kriegstein).



- 1 La replicazione inizia a livello di siti specifici dove i due filamenti genitori si separano per formare le bolle di replicazione.
- 2 Man mano che la replicazione del DNA procede in entrambe le direzioni le bolle si espandono lateralmente.
- 3 Al termine del processo le bolle di replicazione si fondono completando la sintesi dei filamenti figli.

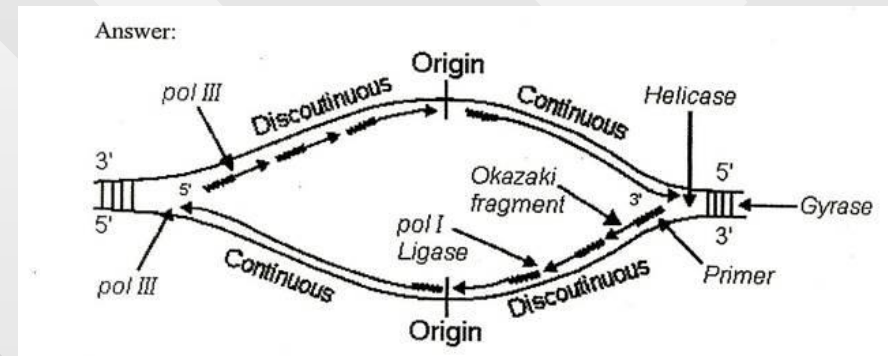
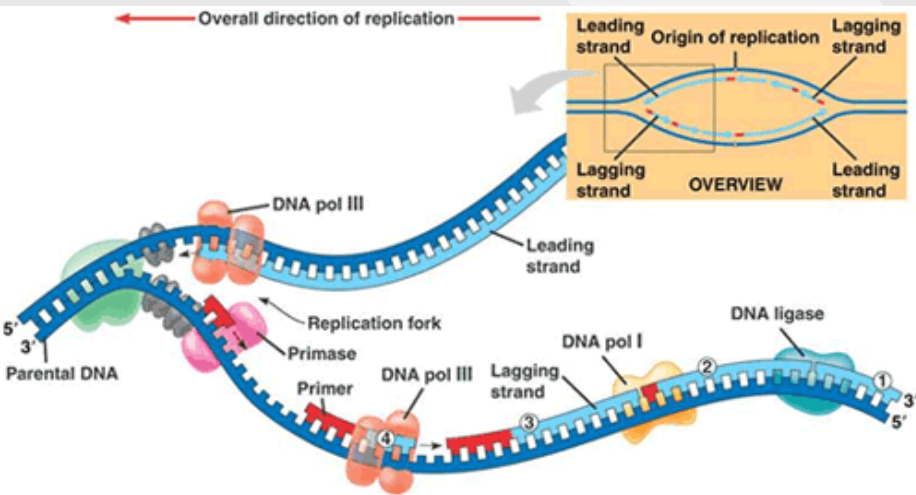
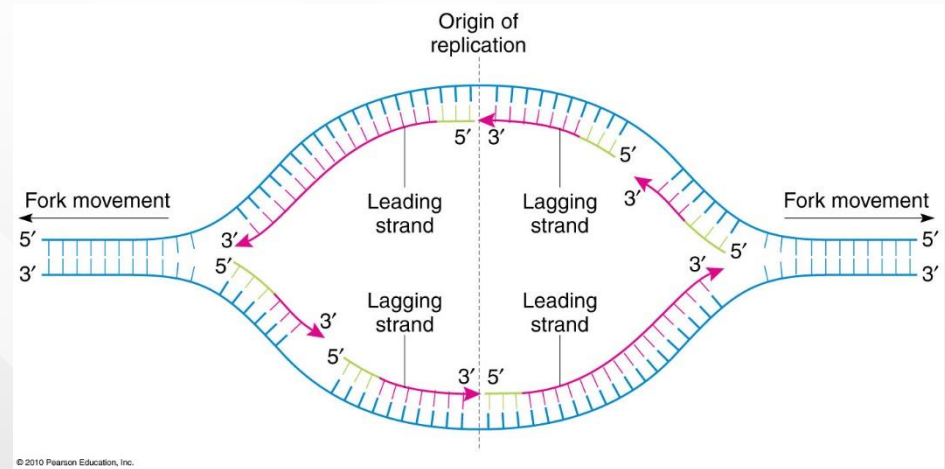
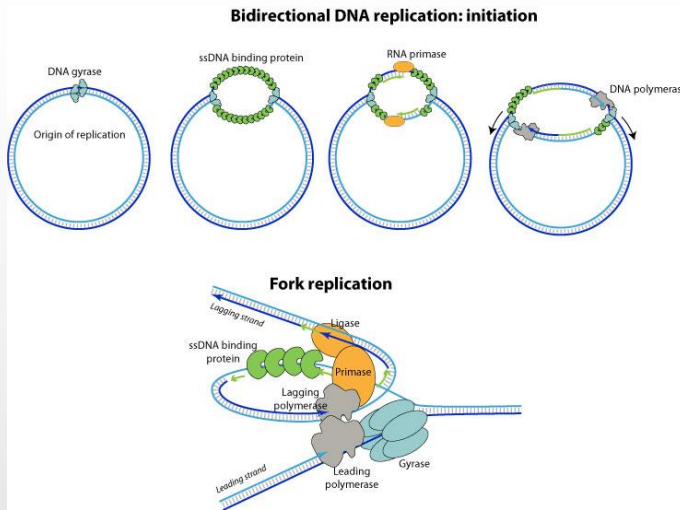
(a) Negli eucarioti, la replicazione del DNA inizia a livello di numerosi siti lungo la molecola gigante del DNA di ciascun cromosoma.



(b) In questa micrografia elettronica sono visibili tre bolle di replicazione nel DNA di cellule di criceto in coltura. Le frecce indicano la direzione di replicazione del DNA all'estremità di ogni bolla (TEM).

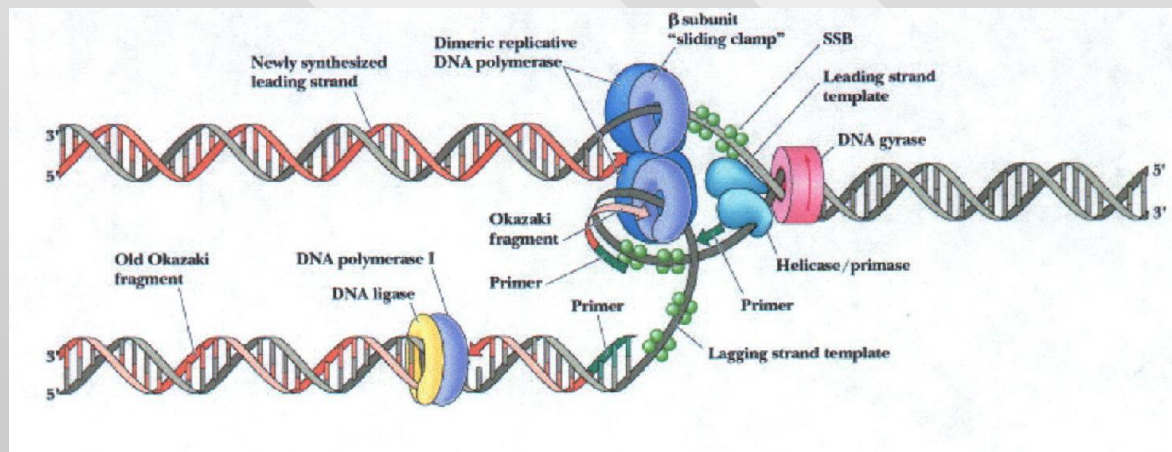
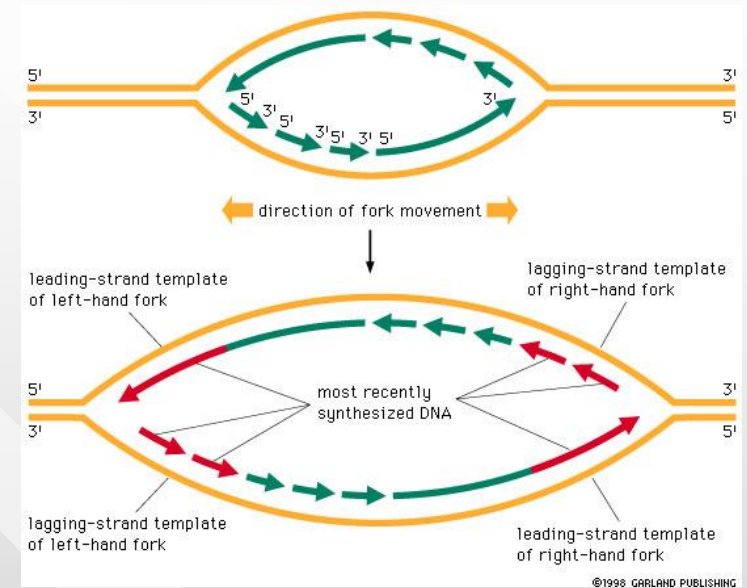
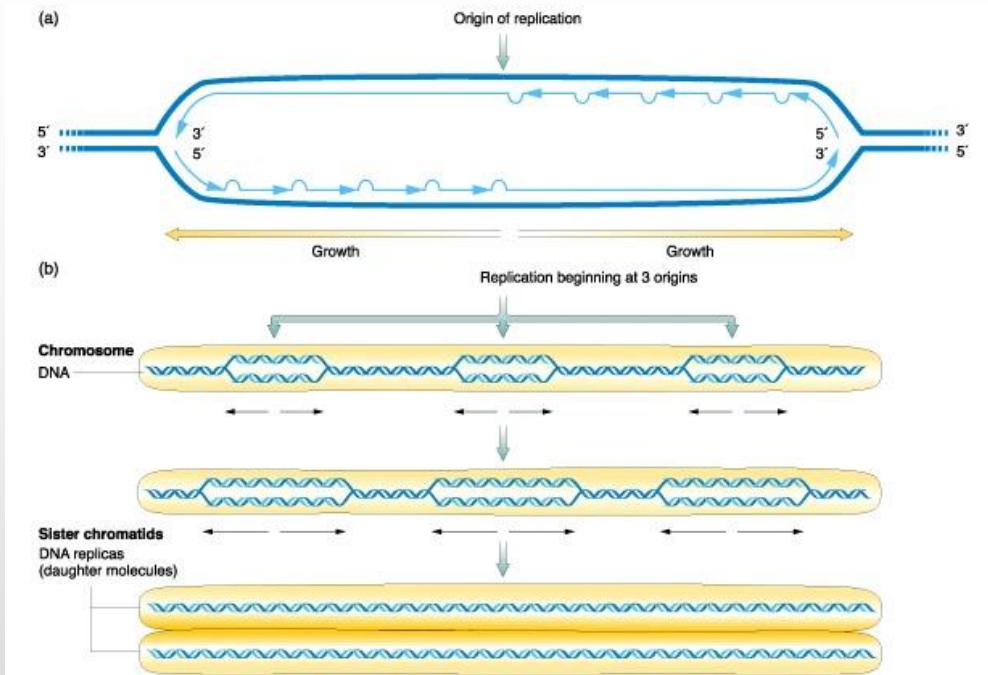


# La replicazione bidirezionale del DNA inizia da una origine (“ori”) nei Procarioni (ad esempio in *E. coli*)



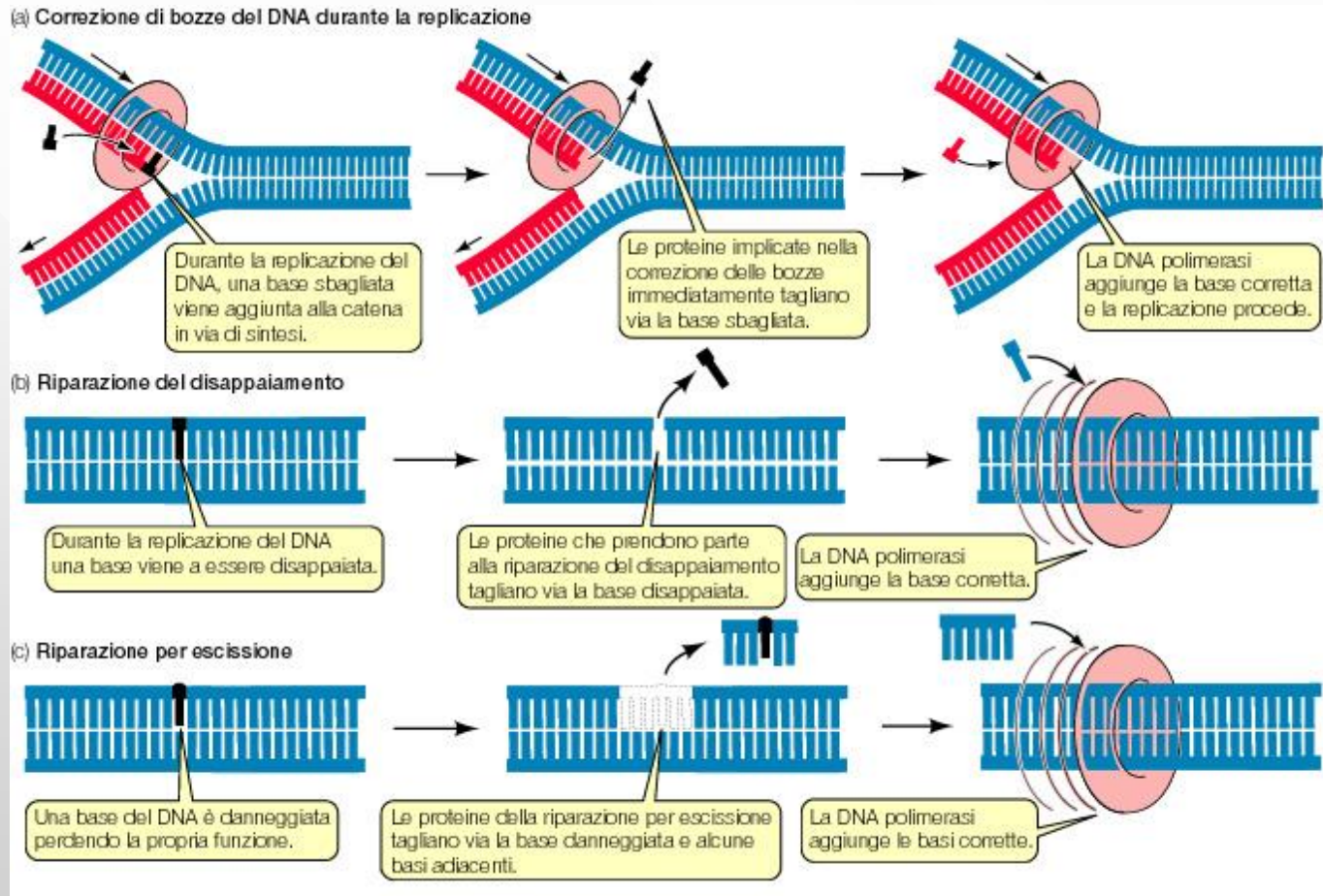
Nelle due forcelle opposte della “bolla” di replicazione il filamento “guida” diventa “in ritardo” e viceversa

Negli Eucarioti la replicazione inizia in più punti del cromosoma lineare, in regioni “**ORC**” (“origin recognition complex”) a cui si legano altre proteine



Fonti:  
Sadava et al., 2014; 2019;  
Voet et al, 2006

# La DNA polimerasi ha inoltre un ruolo fondamentale nel riparo dei tratti di DNA con basi errate o lesionate ('mismatch repair')



Per la scoperta di questo meccanismo di riparo del DNA Paul Modrich ha ricevuto il Premio Nobel 2015 per la Chimica insieme a Tomas Lindahl e Aziz Sancar



KUNGL.  
VETENSKAPS-  
AKADEMIEN

THE ROYAL SWEDISH ACADEMY OF SCIENCES



The Nobel Prize in Chemistry 2015

Tomas Lindahl, Paul Modrich, Aziz Sancar

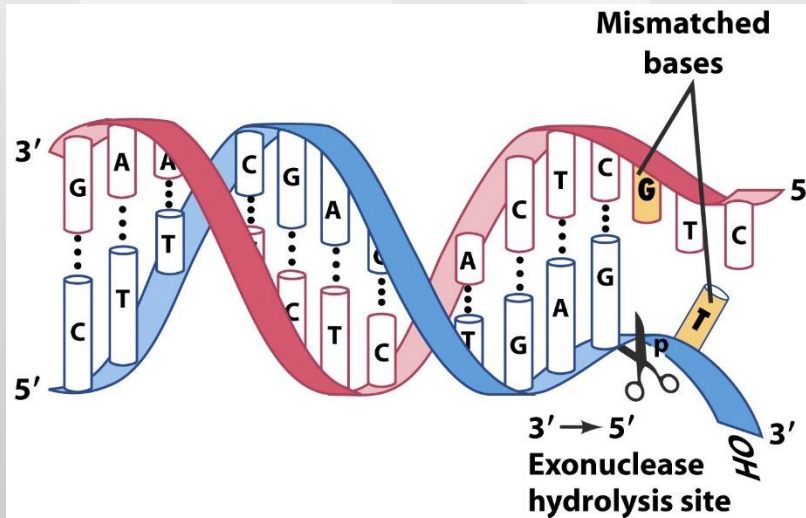
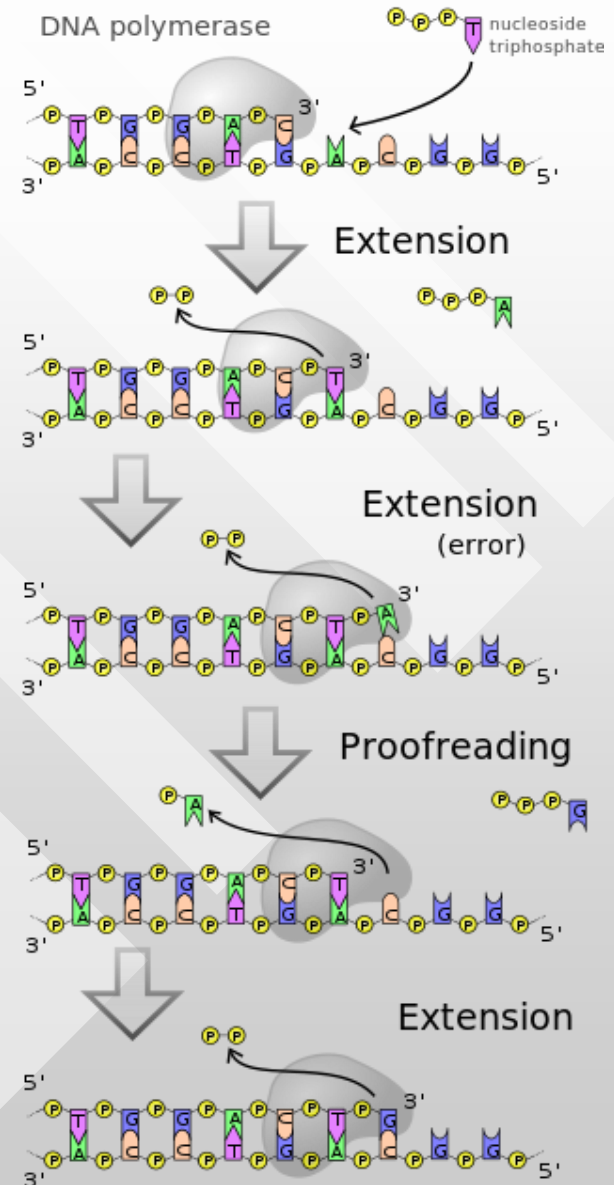


Figure 24-7 Fundamentals of Biochemistry, 2/e  
© 2006 John Wiley & Sons

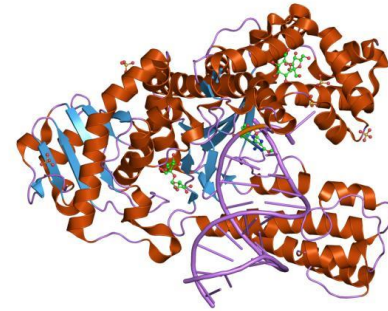
# Attività di “correzione di bozze” (“proofreading”) della DNA polimerasi

- La **DNA polimerasi** non copia il DNA in modo perfetto, ma **commette un errore** più o meno **ogni miliardo di basi** copiate
- Alcune DNA polimerasi (non tutte) sono in grado di eseguire la **correzione degli errori** muovendosi **all'indietro di una base** ed esercitando una **attività esonucleasica in direzione 3'-5'** che taglia la base errata (“proofreading” o “correzione di bozze”)
- Dopo il taglio della base errata, la DNA polimerasi **inserisce la base corretta in direzione 5'-3'** e prosegue nella replicazione



Fonti: Sadava et al., 2014; 2019; Alberts et al., 2002

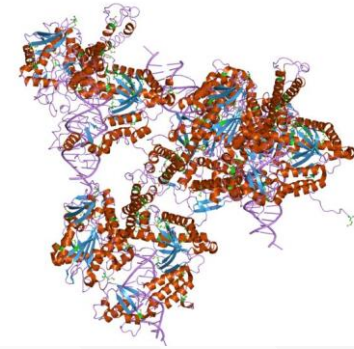
## DNA polimerasi nei **Procarioti**



<b>Enzima</b>	<b>Funzione</b>	<b>Attività <b>esonucleasica</b>*</b>
DNA pol I	Riparo del DNA e replicazione	5'-3' e 3'-5'
DNA pol II	Riparo del DNA	3'-5'
DNA pol III	Complesso multimerico, principale enzima della replicazione	3'-5'
DNA pol IV e V	Sintesi da translesione (TLS)	No

\*L'attività di sintesi del DNA è **SEMPRE** in direzione 5'-3'

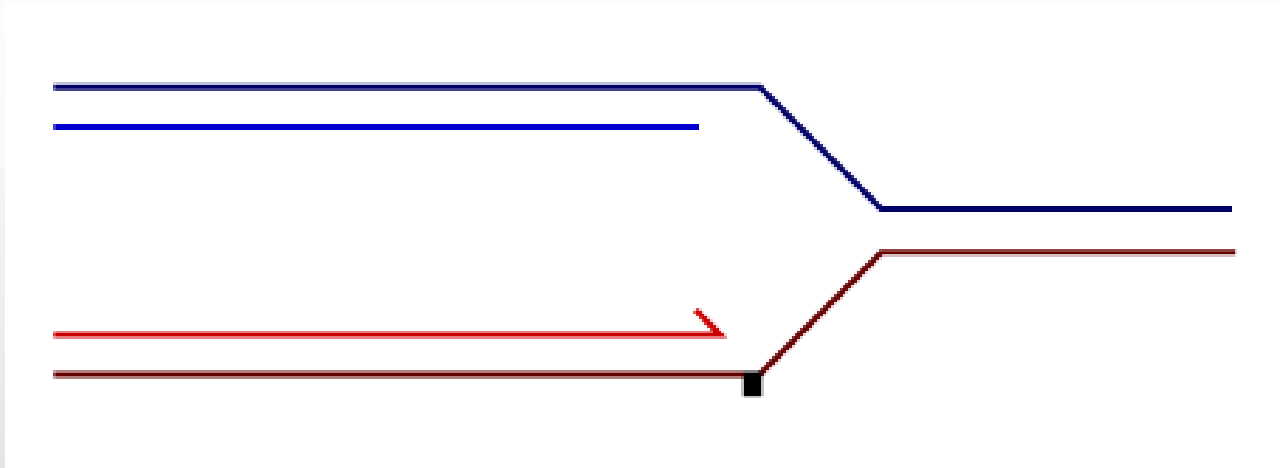
## DNA polimerasi negli **Eucarioti**



Enzima	Funzione	Attività <b>esonucleasica*</b>
DNA pol $\alpha$	Allungamento degli RNA primer	No
DNA pol $\beta$	Riparo del DNA	No
DNA pol $\gamma$	Replicazione del DNA mitocondriale	3'-5'
<b>DNA pol <math>\delta</math></b>	<b>Principale enzima della replicazione</b>	<b>3'-5'</b>
DNA pol $\epsilon$	Replicazione del DNA (filamento guida)	3'-5'
DNA pol $\eta$	Sintesi da translesione (TLS)	No

**\*L'attività di sintesi del DNA è SEMPRE in direzione 5'-3'**

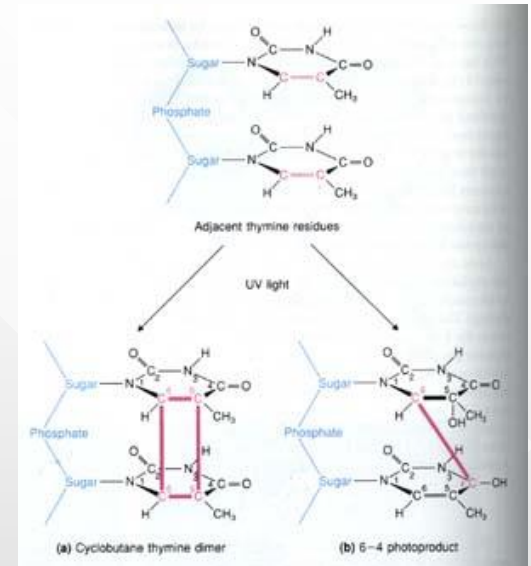
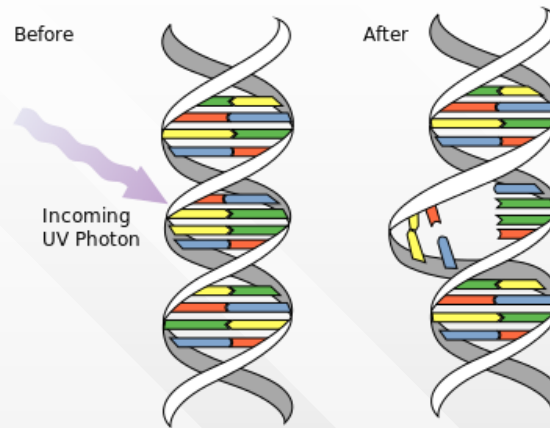
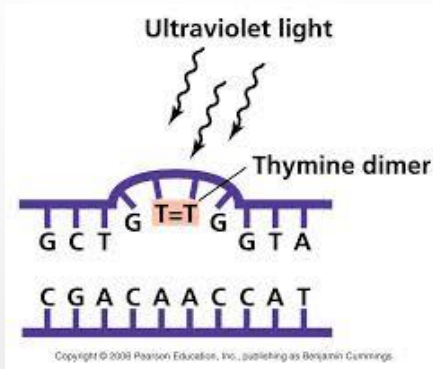
## DNA polimerasi da translesione (TLS)



- Se avviene un danno al DNA sul filamento guida, la replicazione si ferma su questo filamento, ma **prosegue sul filamento in ritardo** fino a quando **la DNA polimerasi** sul filamento guida **è sostituita da una DNA polimerasi da translesione (TLS)**
- La DNA polimerasi TLS permette alla replicazione di **proseguire, dopo avere “saltato” il gruppo di basi lesionato**, che sarà poi **riparato con qualche errore**



## Dimeri di pirimidine (timina o citosina)



- I **dimeri di pirimidine** sono una tipica **lesione molecolare del DNA** provocata da esposizione a raggi ultravioletti A (UVA, 400-100 nm)

- Gli UVA “saldano” insieme due pirimidine, vicine sullo stesso filamento, deformando il DNA e **bloccando la replicazione**

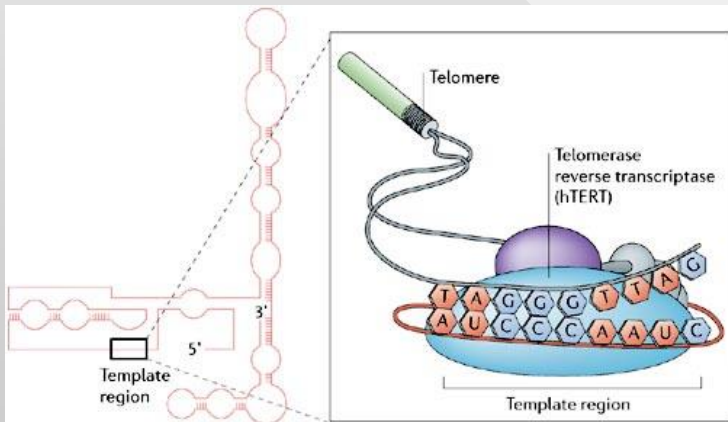
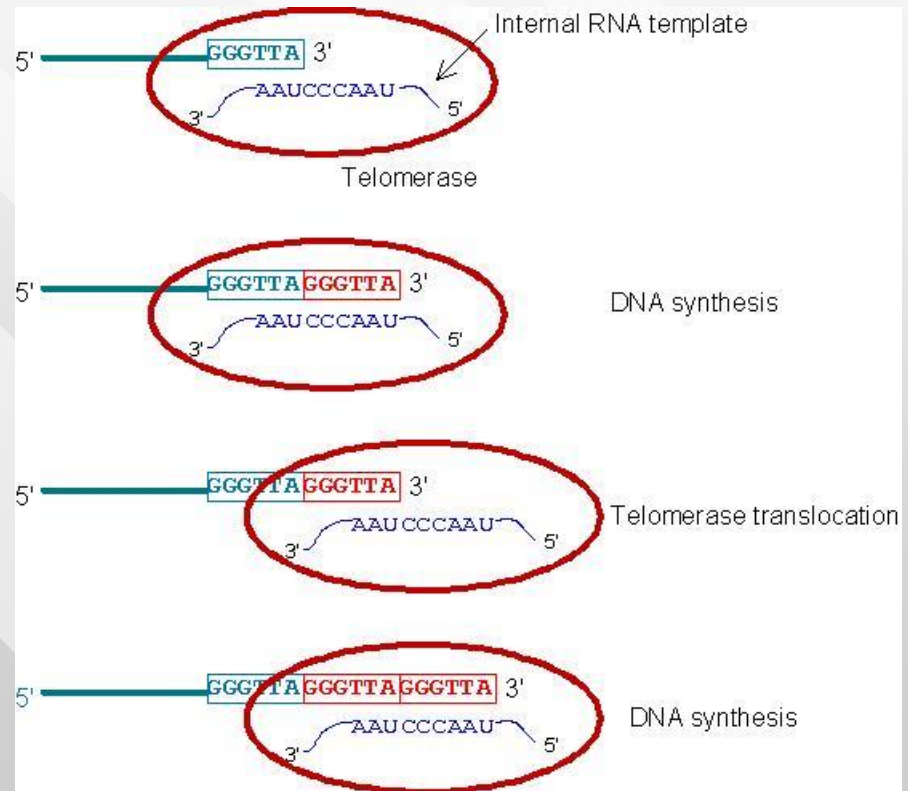
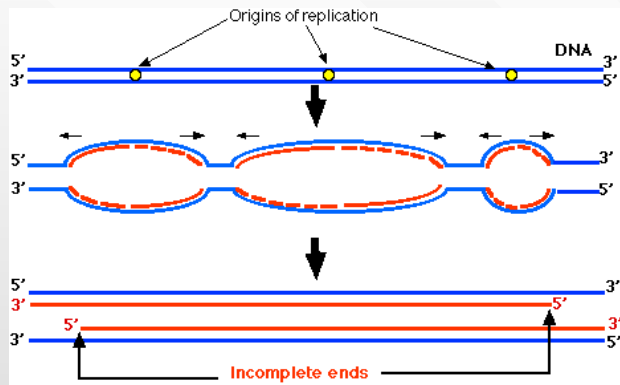
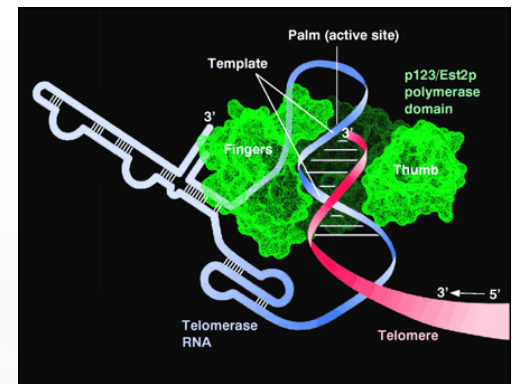
Se non riparati, i dimeri di pirimidine sono **una delle cause principali del melanoma**, un tumore della pelle



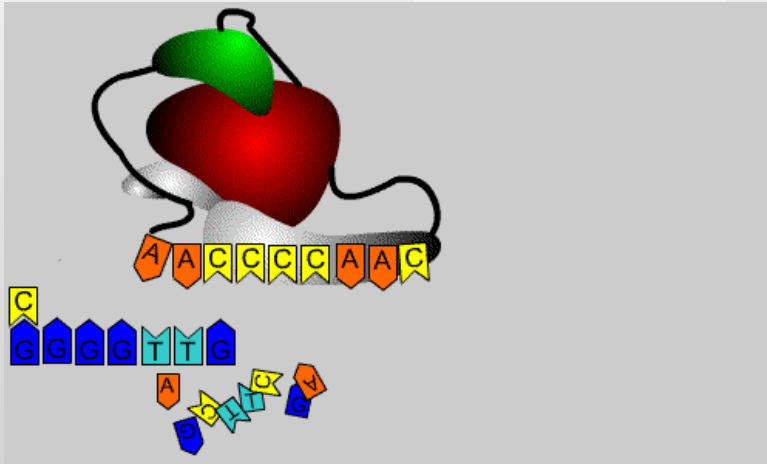
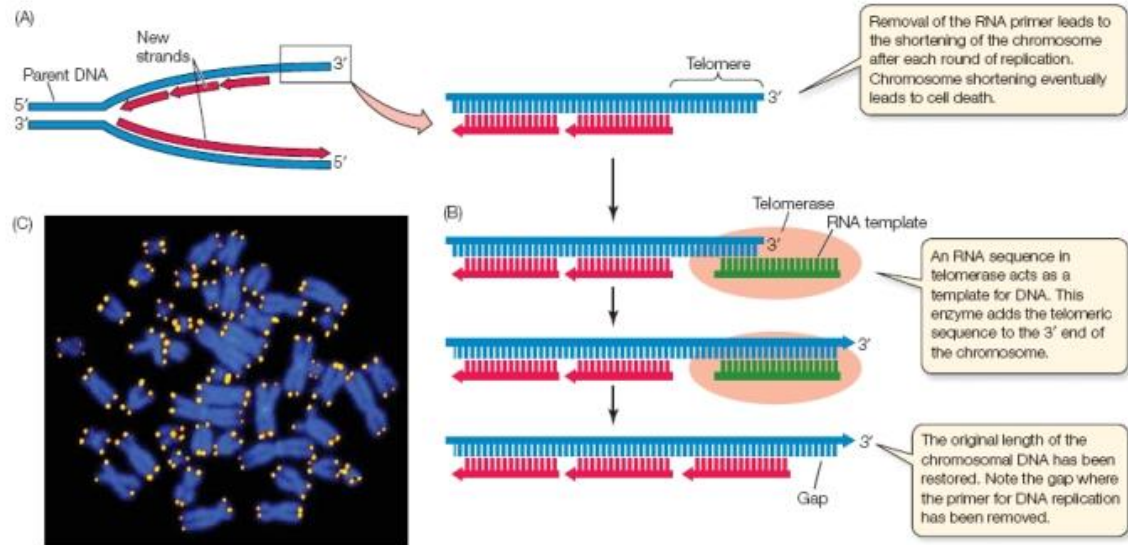
Per la scoperta del meccanismo di riparo di queste lesioni del DNA, **Aziz Sancar** ha ricevuto il **Premio Nobel per la Chimica 2015** insieme a Tomas Lindahl e Paul Modrich

# Riparazione del DNA a livello dei telomeri: l'enzima **telomerasi**

Elizabeth Blackburn e la sua allieva Carol Greider, studiando il ciliato *Tetrahymena termophila*, scoprirono nel giorno di Natale 1984 l'enzima **telomerasi**, una trascrittasi inversa che “ripara” le estremità delle molecole di DNA usando come “stampo” RNA



## Funzionamento della telomerasi



TERT di *Tetrahymena* sp.

La telomerasi a trascrittasi inversa (“**telomerase reverse transcriptase**”, TERT) è una **proteina con attività retrotrascrizionale** che usa come stampo una molecola di RNA per replicare i telomeri dei cromosomi degli Eucarioti

La sequenza dell'RNA stampo, **5'CAACCCCAA 3'**, si appaia con l'estremità 3' del filamento di DNA con la sequenza d(TTGGGG)

Una sequenza parziale TTG è aggiunta al telomero, poi l'enzima si ferma e trasporta lo stampo di RNA per iniziare la sintesi del DNA in unità ripetitive di 6 coppie di basi

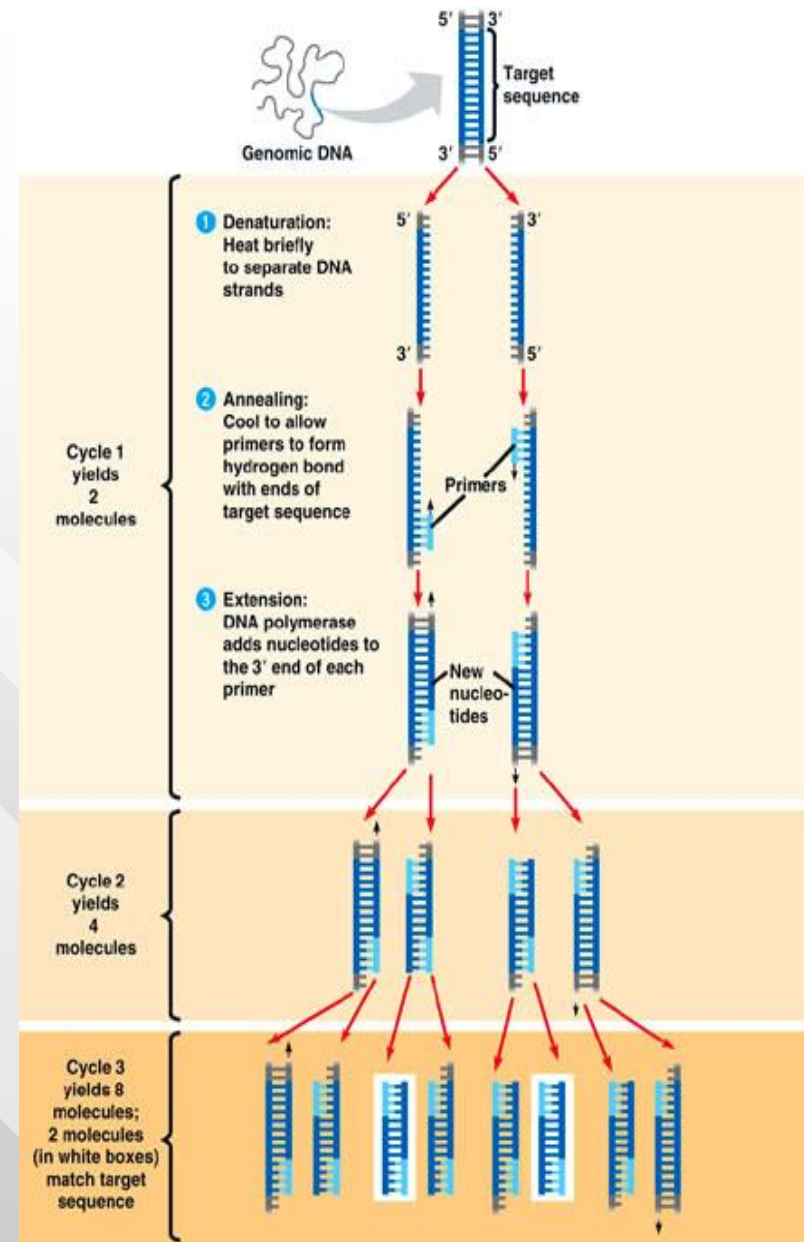
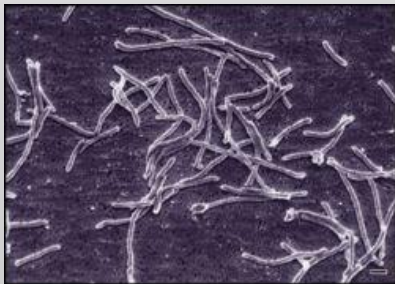
La telomerasi di *Tetrahymena* pausa sempre in corrispondenza della prima G della sequenza ripetuta

# Applicazioni degli studi sul meccanismo di replicazione del DNA: la reazione a catena della polimerasi (**P**olymerase **C**hain **R**eaction o **PCR**)

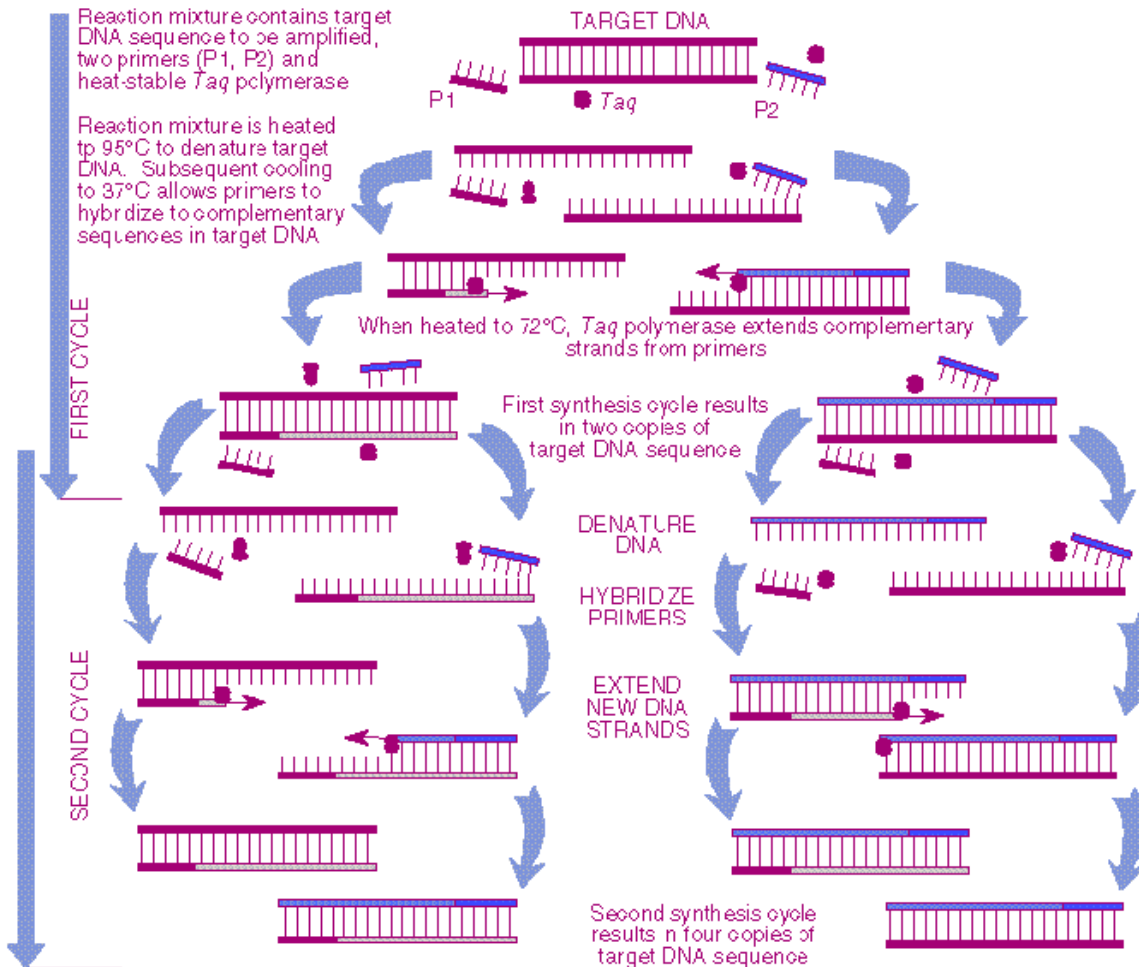
Da una piccolissima quantità di DNA genomico è possibile ricavarne una quantità sufficiente per studi o analisi, “amplificando” (copiando molte volte) il campione tramite PCR

L'enzima (**Taq polimerasi**) usato per “amplificare” il campione di DNA iniziale è **SPECIALE**, perché funziona a temperatura elevata (72 °C), di norma incompatibile con l'attività enzimatica

L'enzima è stato estratto dall'eubatterio ipertermofilo ***Thermus aquaticus***, che vive nelle sorgenti termali del parco di Yellowstone (USA)



## DNA Amplification Using Polymerase Chain Reaction

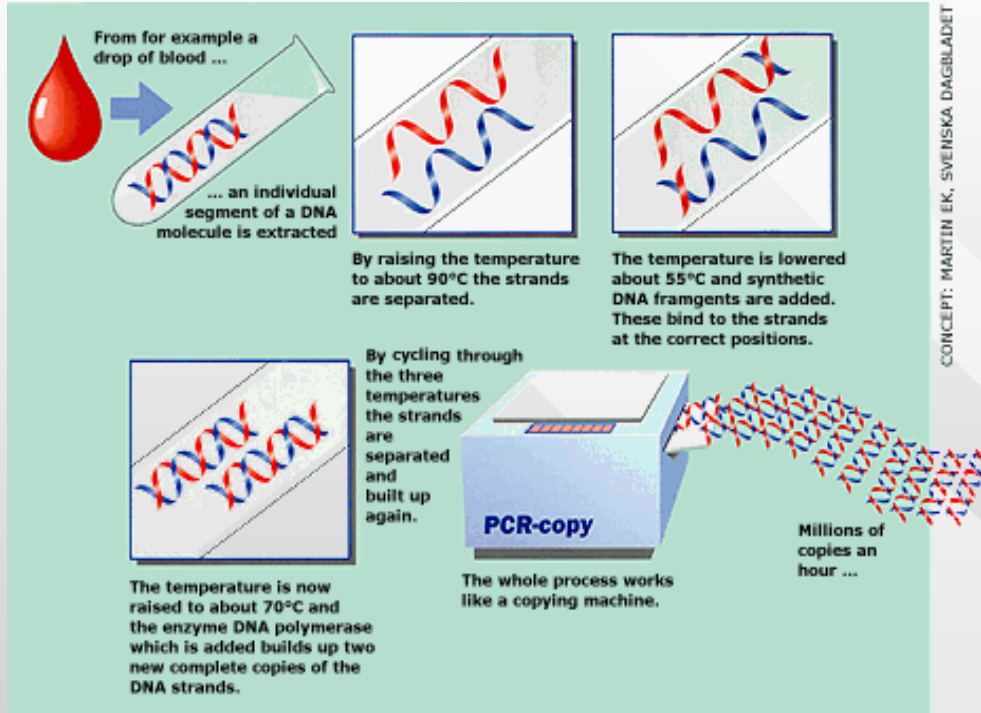


Source: *DNA Science*, see Fig. 13.



Il termociclature ("thermocycler"), strumento per l'amplificazione del DNA tramite PCR

L'amplificazione del DNA e l'analisi dei campioni amplificati permette una identificazione precisa di ogni individuo ("DNA fingerprinting" o "DNA profiling")



Fonti: Sadava et al., 2014; 2019  
<https://www.s-cool.co.uk>

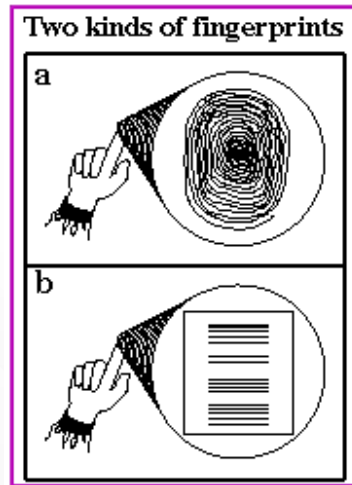
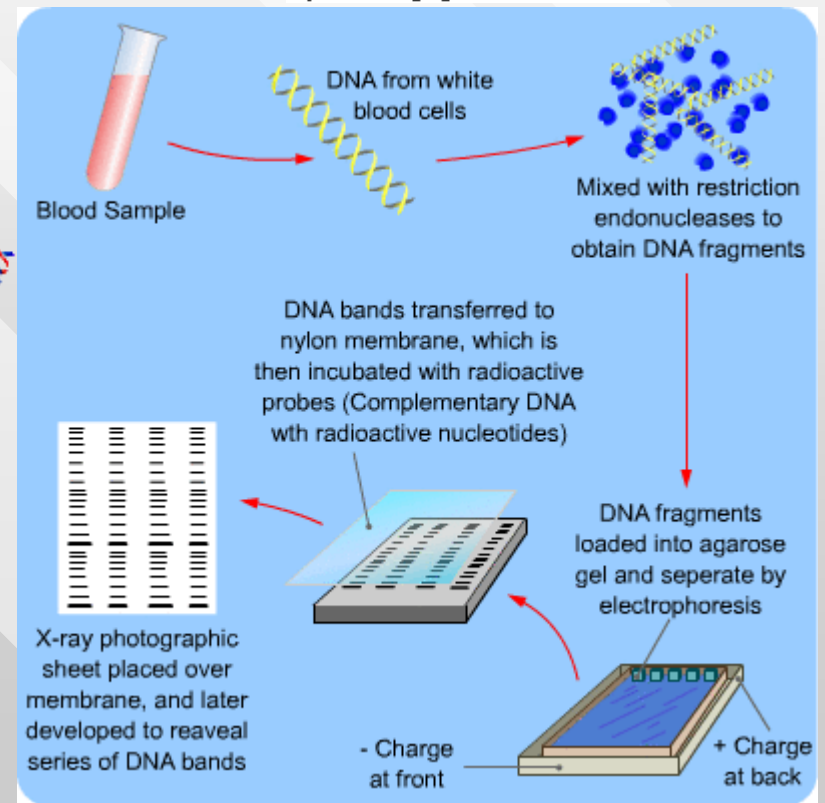
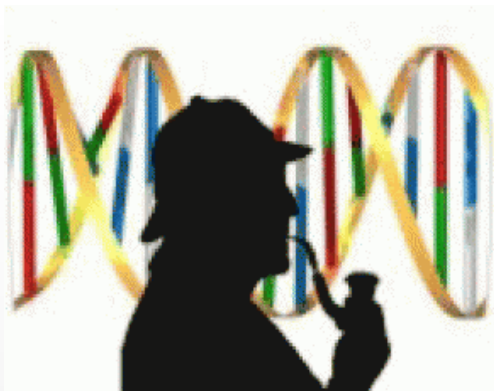
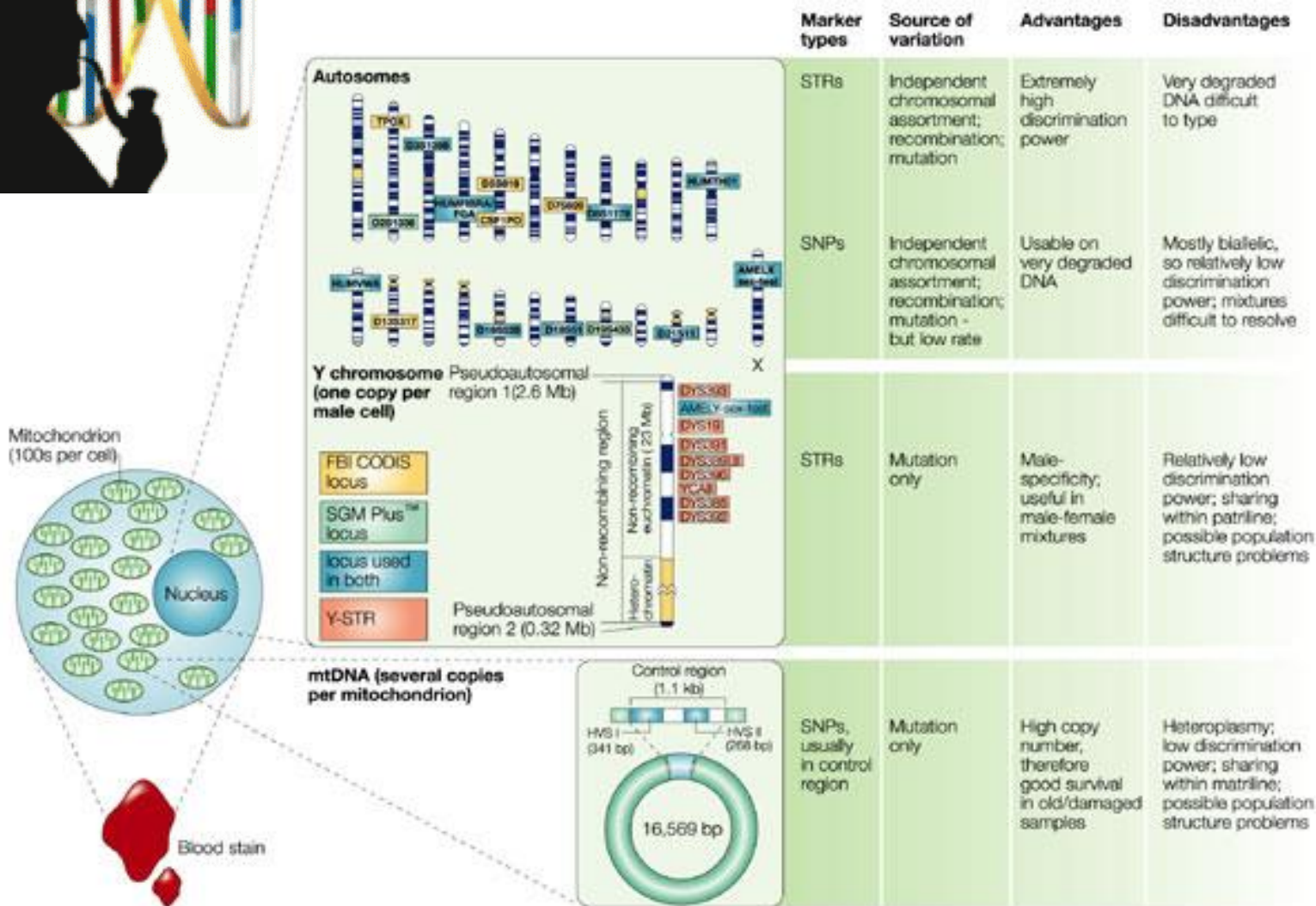


Figure 1.  
 a) Conventional fingerprint  
 b) DNA fingerprint

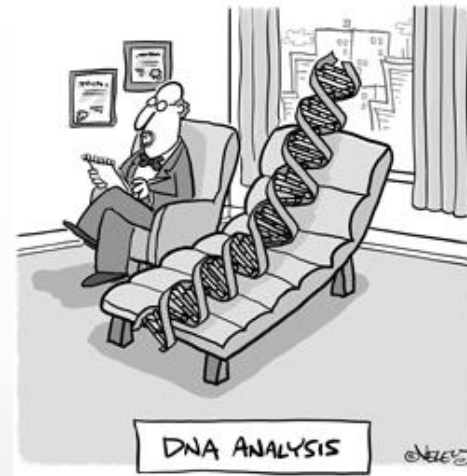
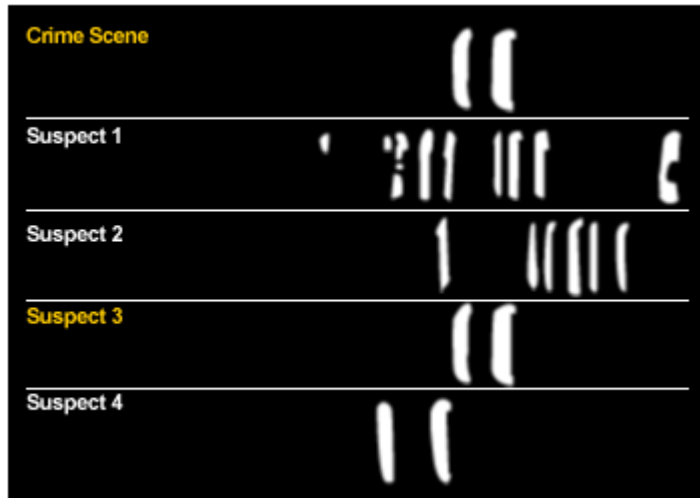




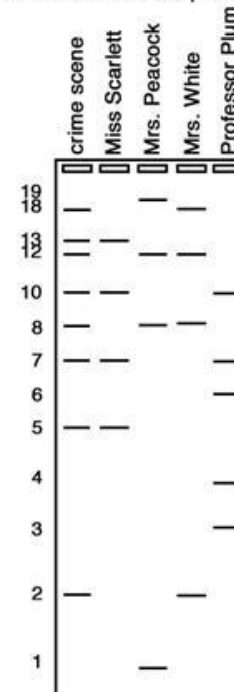
# Vari tipi di sequenze del DNA nucleare e mitocondriale sono usate **a scopo forense**



L'identificazione del DNA individuale è **fondamentale in criminologia** o nei casi di accertamento di paternità



A picture of the agarose gel (autoradiograph) from an EcoRI digest of crime scene DNA and DNA from the suspects.



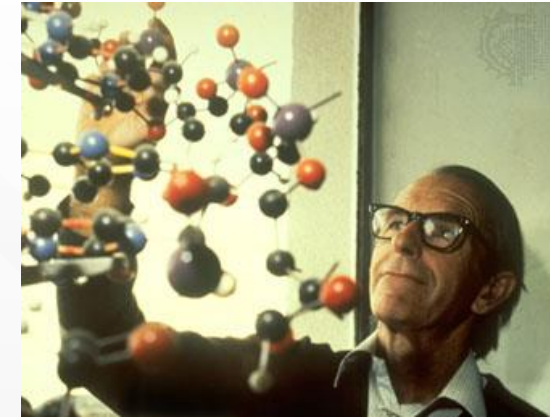


Il **primo genoma interamente sequenziato** è stato quello del virus **batteriofago fx174** (5375 nucleotidi) **nel 1980**

## Frederick Sanger (1918 - 2013)

Due volte Premio Nobel per la Chimica (**unica persona ad averlo ricevuto due volte in questa disciplina**)

- nel **1958**, per la scoperta del metodo per sequenziare gli amminoacidi nelle proteine e per il **primo sequenziamento di una proteina, l'insulina...**



... e nel **1980** (insieme a W. Gilbert e P. Berg) per la scoperta del metodo di sequenziamento "dideoossi" del DNA (**metodo di Sanger**) che ha permesso di **sequenziare per la prima volta un intero genoma** (quello del batteriofago fx174) e di **iniziare il Progetto Genoma Umano**

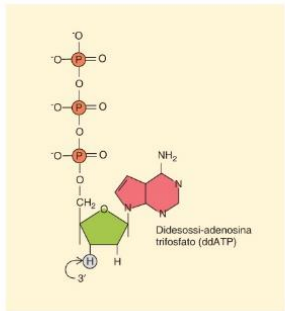


FIGURA 14-9 Un didossinucleotide.

I didossinucleotidi sono nucleotidi particolari, modificati in quanto mancano del gruppo ossidrilico in posizione 3' e perciò il loro inserimento determina l'interruzione della catena di DNA che si sta formando.



Nel 1993 Sanger partecipò alla fondazione di un Istituto di ricerca che porta il suo nome ("**Sanger Institute**") che ha dato un contributo fondamentale al sequenziamento del genoma umano ed è tuttora **uno dei più importanti centri di ricerca genomica del mondo**

# Metodo di Sanger (o dei dideoossinucleotidi) per il sequenziamento del DNA

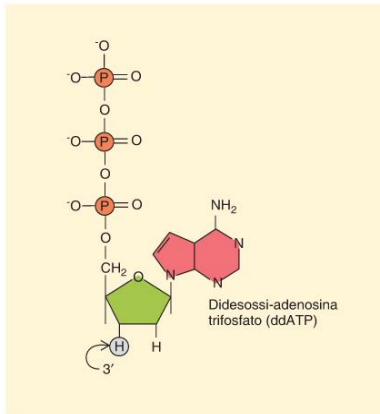


FIGURA 14-9 Un dideossinucleotide.

I dideossinucleotidi sono nucleotidi particolari, modificati in quanto mancano del gruppo ossidrilico in posizione 3' e perciò il loro inserimento determina l'interruzione della catena di DNA che si sta formando.

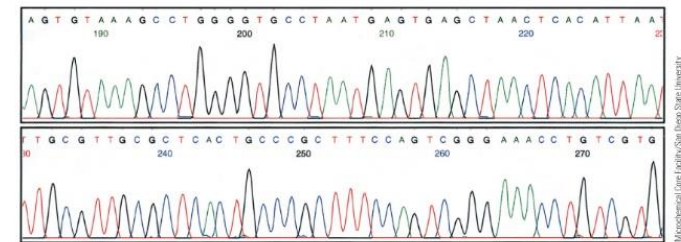
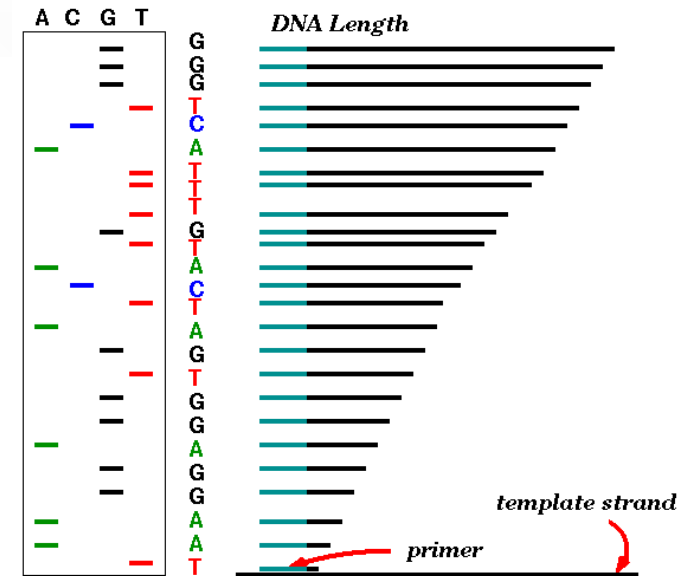


FIGURA 14-11 Risultati di un sequenziamento automatizzato del DNA.

Il computer produce la serie di picchi illustrata mediante la lettura delle bande fluorescenti sul gel. La base adenina è mostrata in verde, la guanina in nero, la citosina in blu e la timina in rosso. La sequenza del DNA decifrata dal computer appare al margine superiore della stampa.

“I was just a chap who messed about in his lab”.

(F. Sanger, 1988)