

BIOLOGIA MOLECOLARE

Come si pubblica un dato scientifico:

- 1) faccio una scoperta
- 2) deve avere una rilevanza
- 3) decido di pubblicarla
- 4) scrivo un manoscritto
- 5) invio all'editore che nomina una commissione di esperti (anonimi all'autore) che valuteranno il manoscritto a seconda della qualità e se è "di moda"
- 6) i REFEREEES (arbitri) → commentano il manoscritto e decidono se accettare o meno il lavoro
- 7) eventualmente si fanno modifiche per migliorare il lavoro per cui i dati sono interpretabili
- 8) quando decido di pubblicare devo pagare (4.000 dollari)
- 9) scelgo la rivista dell'editore a cui si rivolgono + scienziati
- 10) ad ogni rivista → IMPACT FACTOR (+ alto e + rilevante)

È importante PUBBLICARE le scoperte!!!

Il **biologo** si è sempre occupato dei fenomeni naturali ma negli ultimi anni si è specializzato in discipline come la *genetica* e la *biologia molecolare* causando una modificazione della Natura con determinate conseguenze.

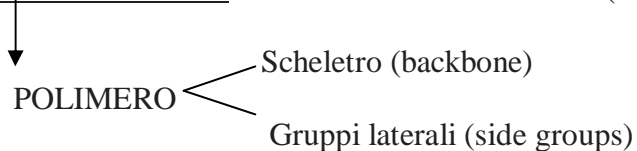
SUGARS → polisaccaridi

ACIDI GRASSI → lipidi

AA → proteine

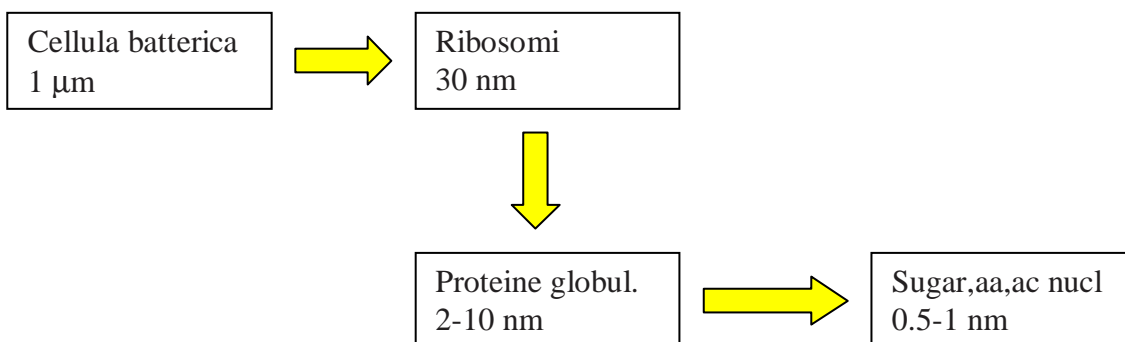
NUCLEOTIDI → acidi nucleici

POLIMERIZZAZIONE → reazione di condensazione (libera H₂O)



È possibile cambiare i gruppi laterali nelle proteine o nel DNA cambiando rispettivamente aa e nucleotidi ma a volte occorre cambiare parte del backbone.

DIMENSIONE e % delle COMPONENTI CELLULARI:



Spesso si osserva la presenza di acidi nucleici e proteine con tecniche di OSSERVAZIONI INDIRETTE.

PROTEINE:

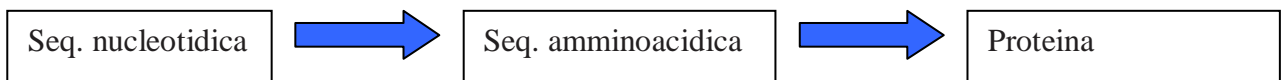
Proteoma → rete di interazioni tra proteine ed acidi nucleici

Proteinkinasi → fosforilazione di residui aa delle proteine

↓
Pathway (interazioni tra PK e tutti i suoi substrati)

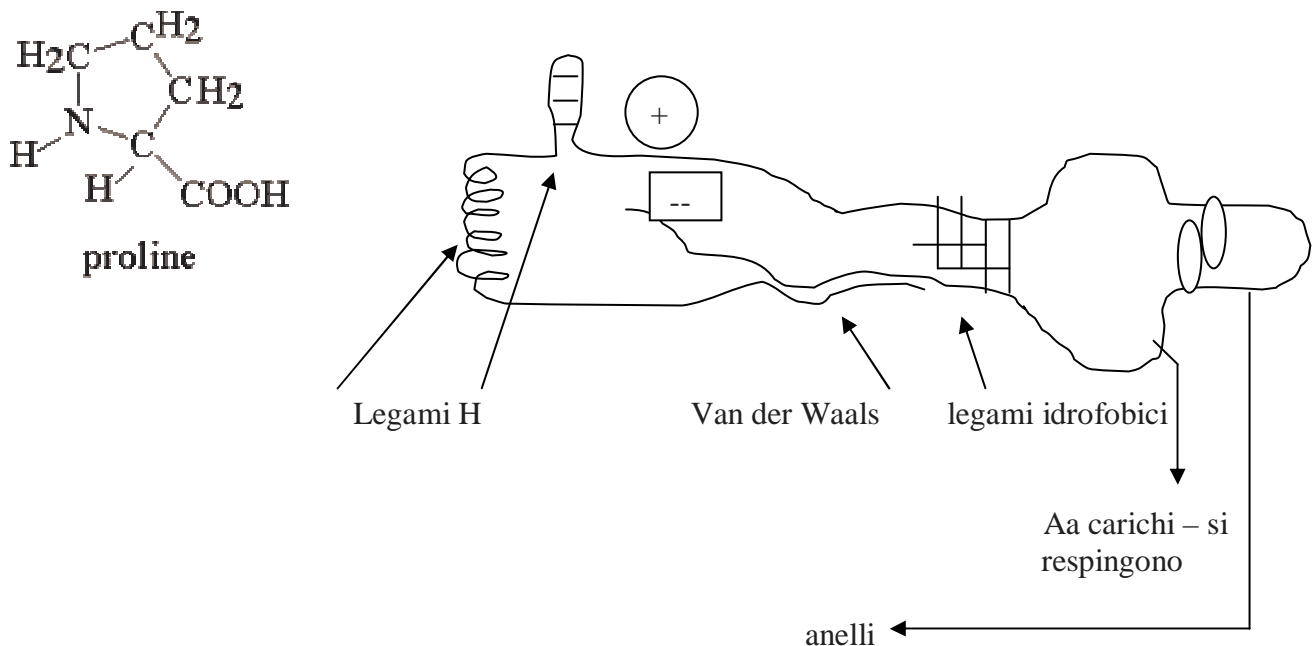
Amminoacidi → classificazione a seconda dei R (gruppi radicalici)

Se si prendono 200 aa (miniproteina) alcuni aa hanno un particolare significato → DOMINI che fanno interazione.

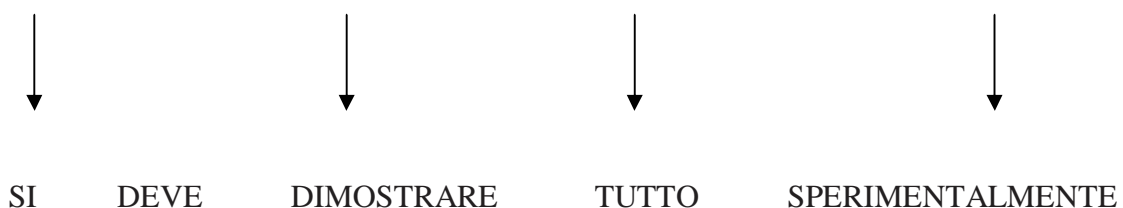


Bioinformatica → capire col computer la sequenza aa

Per esempio, la **prolina** forma un angolo rigido e la sua funzione strutturale è esporre i domini.



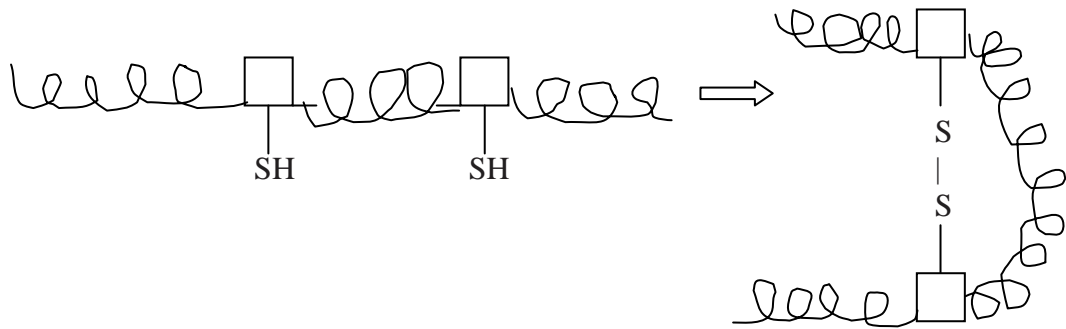
Si può scambiare un aa con un altro ma occorre mantenere le stesse caratteristiche e per far questo tipo di studio si utilizzano le **tecniche d'indagine chimico-fisiche e di biologia molecolare**. Per cambiare i residui aa bisogna intervenire sul nucleotide che codifica per l'aa → proteina MUTATA.



Se ho una proteina purificata e misuro la $K_m \rightarrow$ valore dimensionale "x". Quando cambia un aa cambia la $K_m \rightarrow$ analisi biochimica ma se cambia la K_m non è detto che la cellula cambia. Devo fare esperimenti in vitro e in vivo.

- **ponti disolfuro** -

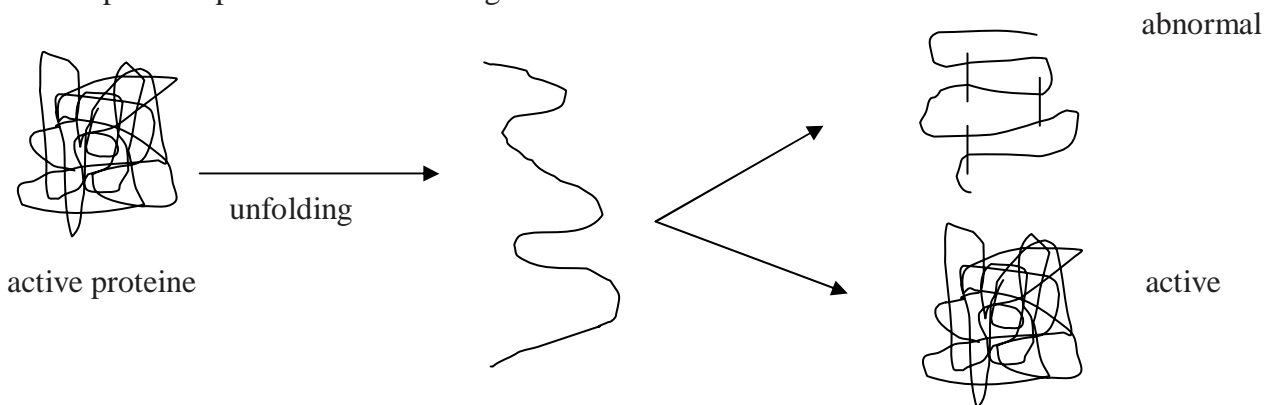
Sono legami covalenti (S—S) in proteine (es. le immunoglobuline)



L'emoglobina ha 4 catene polipeptidiche uguali 2 a 2 dettate dalle sequenze nucleotidiche

Esperimento 1.

- proteina purificata
- denaturazione con calore o 8M urea + mercaptoenolo (riduce S—S ad SH e SH)
- unfolding \rightarrow struttura 1°
- messa in condizioni ottimali \rightarrow folding corretto (> parte) MA in alcuni casi \rightarrow strutture anomale
- conclusioni: in cellula ci sono cofattori che "aiutano" a costruire la proteina in pochi istanti. Anche nella cellula avvengono errori ma sono rari e vengono sempre corretti perché una proteina sbagliata può essere tossica. Nella cellula si ha un controllo sulla qualità delle proteine prodotte che le distingue in buone e non buone.



All'interno della sequenza aa esistono piccole sequenze la cui presenza non è importante per la funzionalità della proteina.

PROTEASI \rightarrow

- degradano altre proteine
- riconoscono alcune sequenze di aa
- endonucleasi
- se la sequenza bersaglio è "protetta" allora la proteasi non si lega al substrato

Se muti le regioni di una proteina che fungono da substrato per la proteasi allora non contribuisco al *folding* ma solo al riconoscimento delle proteasi per cui la proteina è comunque ATTIVA.



PURIFICAZIONE PROTEINA →

- avviene a 4°C
- ipotizzo di ottenere 2 proteine
- IPOTESI: interazione tra proteina A e B

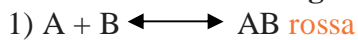
Come posso valutare l'interazione?

- posso calcolare una costante di ASSOCIAZIONE:
- con tecniche biochimiche
- ottengo un numero (può essere buono per la mia dimostrazione) però in vitro queste proteine possono interagire benissimo ma nella cellula potrebbero non vedersi mai **oppure** possono formare un complesso cellulare ma avere funzioni diverse

$$K = \frac{[AB]}{[A][B]}$$

Devo dimostrare che non solo l'interazione avviene in cellula, ma deve anche servire a qualcosa: come lo dimostro?

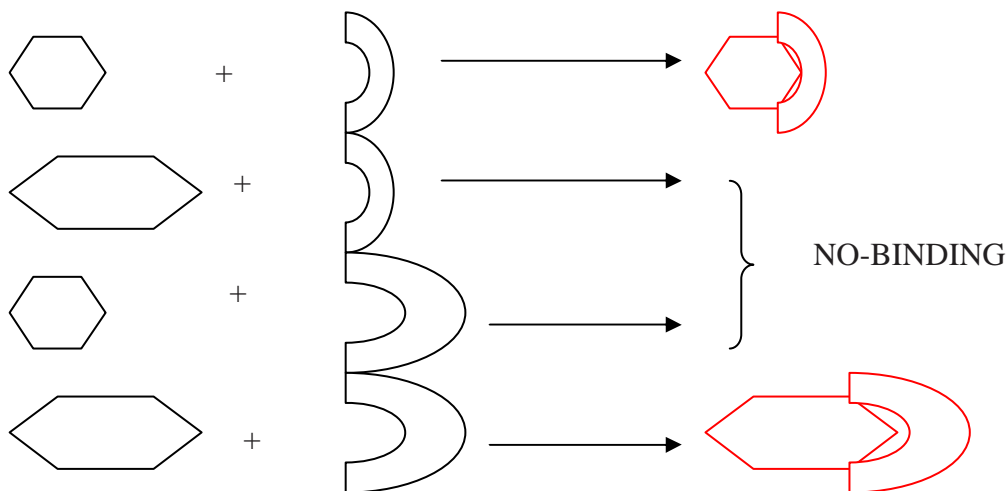
- posso produrre mutanti con assenza di queste proteine
- **sistema biologico** → approcci in vivo e genetici
- **materiale biologico** → ottengo qualche risultato da una cellula



2) $A^* + B \leftarrow AB$ bianca (A* non è in grado di interagire con B)
cerco una seconda mutazione in un altro gene che mi sopprima il "bianco":

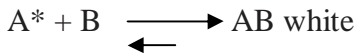


La mutazione in A non può essere una **lost of function** (perdita di funzione) ma cade sul sito di interazione con B (difatti si forma sempre un prodotto)

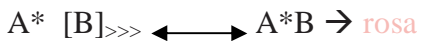


Questo era un approccio genetico ed ha suggerito una ipotesi e se l'approccio biochimico coincide con quello genetico allora la dimostrazione è + convincente.
 Se una colonia bianca diventa rossa allora geneticamente c'è stata una mutazione su un altro gene o all'interno dello stesso.

MUTANTI → SITUAZIONI PATOLOGICHE



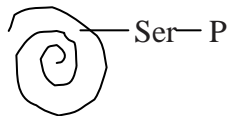
Per aumentare la reazione verso destra posso aumentare la [B]:



Questa tecnica si chiama **soppressione ad alto numero di copie** → sovradosaggio di un gene → sbilancio il contenuto proteico

NUOVA IPOTESI:

- tra A e B c'è una interazione fisica
- sappiamo che A viene fosforilata cioè è il substrato di una PK (fosfochinasi, enzimi regolatori che fosforilano solo su certi aa, nei procarioti è + raro)
- gli aa fosforilati sono SER, THR, TYR
- la PK riconosce un FOLDING specifico e se c'è una SER la PK la fosforica
- i residui fosforilati sono preceduti da una PRO → curvatura → esposizione aa da fosforilare



QUINDI se A è una proteina fosforilata:

- 1) la fosforilazione di A è richiesta per interagire con B
 $A-p + B \xrightleftharpoons{\leftarrow} A-pB \rightarrow \text{rosso}$
- 2) P è irrilevante
- 3) La fosforilazione su A può impedire l'interazione con B
 $A-p + B \xleftarrow{\leftarrow} AB \rightarrow \text{white}$

Con la fosforilazione la Ser si carica negativamente; è reversibile grazie all'azione delle fosfatasi che hanno meno specificità delle PK che ve ne sono circa 3.000.

DIMOSTRAZIONE:

- ho un sistema biologico per sviluppi genetici
- posso fare tutti i mutanti che voglio
- devo dare dei dati

Non potrei eliminare la Ser32 perché forse è importante strutturalmente MA potrei cambiare la Ser con un aa non fosforilabile per es. l'Ala che ha una carica neutra → no-fosforilazione → no complesso → cellula bianca (ipotesi 1)

So che con la fosforilazione la Ser acquista una carica negativa allora la sostituisco con un aa carico negativamente, Asp → cellula ROSSA

Devo anche vedere se l'allele mutante Ser32Ala è recessivo o dominante:

Ser32Ala } essendo presente il wt ottengo colonie rosse quindi l'allele in esame è recessivo
Wild type }

Nell'ipotesi in cui la fosforilazione sia inibente allora ottengo cellule rosse (con Ala) → mutazione dominante perché in assenza della kinasi ho potuto bypassare la sua richiesta e ottenere lo stesso cellule rosse con Ser32Ala (in questo ultimo caso non ho utilizzato la kinasi).

Ser32Ala	Red	Mutante Ala dominante
Ser32Ala & wt	Red	“ “ “
Ser32Asp	White	Mutante Asp recessivo
Ser32Asp & wt	Red	“ “ “

La fosforilazione impedisce la formazione del complesso.

Non si riesce quasi mai a trovare una funzione per gli eventi di fosforilazione.

La cellula ha diverse interazioni proteiche nel suo interno senza che abbiano un apparente significato ma la cellula ha un efficiente controllo qualità se si formano errori rilevanti.



NUCLEOSIDE → base + deossiribosio

NUCLEOTIDE → nucleoside + fosfato

BASE → specificità al sistema ed è il gruppo laterale dell'elica

LEGAME 5'-3' con stechiometria 1:1:1 (base - zucchero - fosfato)

NUCLEOTIDE TRIFOSFATO → precursore DNA

MARCARE il DNA:

- utilizzo il ^{32}P del gruppo fosfato in posizione α o γ
- α per il DNA
- β e γ vengono idrolizzati e si perdono

SINTESI DNA:



È una reazione poco efficiente a cui posso accoppiare a questa reazione l'IDROLISI del PP (elimino i prodotti). Se aggiungono PP → si inibisce la reazione di sintesi (in vitro) mentre in cellula si può fare un esperimento *farmacologico* in cui la pirofosfatasi diventa + efficiente e blocca la sintesi; oppure un approccio genetico in cui il mutante del gene per la pirofosfatasi è reso poco efficiente e la sintesi quindi è meno efficace.

$$\frac{\text{A} + \text{G}}{\text{T} + \text{C}} = 1$$

Le quantità relative di A/G e T/C variano a seconda delle specie

DOPPIA ELICA:

- antiparallela → 5'P --- 3'OH

- CG (3 legami H) e AT (2 legami H)
- Molto spesso la cellula la apre
- Quando la larghezza della doppia elica varia → mutazione

I DIMERI DI TIMINA causano deformazione della doppia elica ma fortunatamente ci sono sistemi di riparazione efficienti altrimenti si avrebbe un accumulo di lesioni → tumori.

La **replicazione** è molto veloce x cui sono anche maggiori gli errori.

Il DNA esiste in 2 diverse forme:

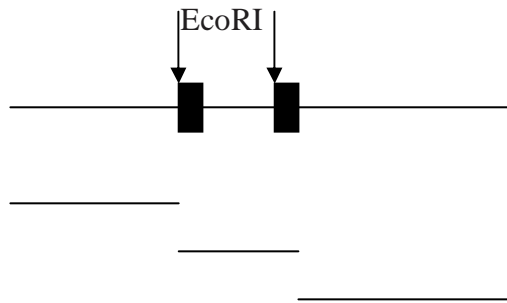
- 1) Z-DNA → + raro
- 2) B-DNA → + comune, elicoidale
- 3) A-RNA → riguarda 2 eliche di RNA ma è stato visto solo in provetta

Il B-DNA presenta un solco maggiore → si legano proteine associate al DNA e un solco minore → raramente si legano proteine ma agiscono alcuni farmaci

TOPOLOGIA studia la struttura del DNA.

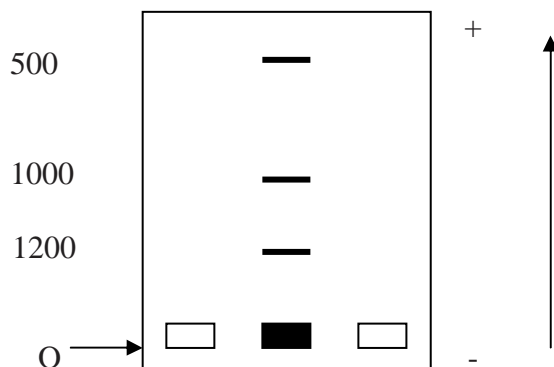
Nell'analizzare il DNA → vedere, manipolare, analizzare i cromosomi

Posso tagliare sequenze con ENZIMI DI RESTRIZIONE per es. EcoRI taglia la molecola in 2 siti e ottengo 3 frammenti di cui 1 discreto (quello che mi interessa)



Elettroforesi

- DNA è carico negativamente e può essere separato in base alla carica
- Gelatina di agarosio → si creano delle tasche per il campione
- O = origine o partenza del gel
- Applico gli elettrodi e nel tempo il campione migra



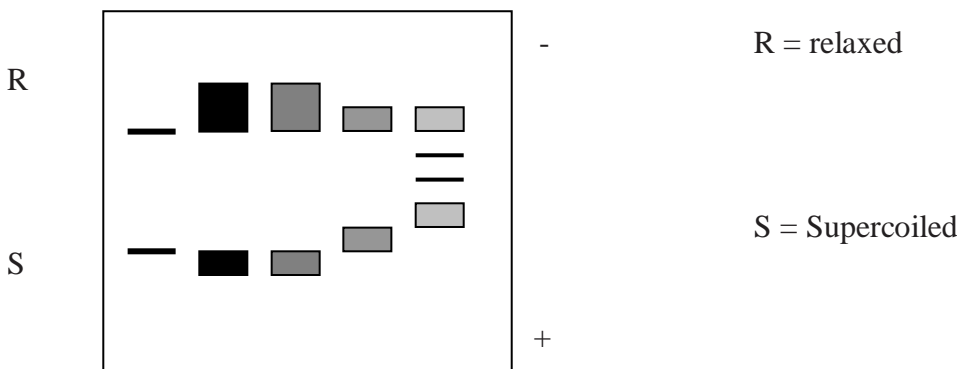
Ci sono 2 tipi di elettroforesi:

- 1) in base alla **massa**
- 2) in base a **forma** o ingombro sterico delle molecole

Il DNA migra a seconda della lunghezza: quelli leggeri vanno + lontano verso il polo POSITIVO.

L'**ELETTROFORESI**:

- costa poco
- osservare indirettamente: si aggiunge alla gelatina il colorante specifico (bromuro di etidio) che si intercala nel DNA (quindi è mutageno) → ai raggi UV → DNA assume colorazione biancastra
- la quantità di DNA può essere **limitante** → si ovvia marcandolo in modo *radioattivo* e si usa una **lastra fotografica** → bande nere
- il pozzetto di partenza si chiama Starting weil
- è possibile individuare un gene su un cromosoma
- tutte le bande separate hanno massa diversa e i cromosomi sono lineari



- le 2 bande sono uguali ma si separano perché la conformazione è diversa
- il DNA relaxed ha > ingombro sterico, viceversa il supercoiled migra + velocemente.
- Per capire se la mia digestione è avvenuta misuro le bande e le confronto con uno STANDARD fatto correre in parallelo al mio campione e i frammenti sono a PM noto.
- Trasferisco i dati su una carta semilogaritmica in cui faccio una retta per valutare la migrazione standard; la distanza è quella tra segmentino e gel, sulla Y metto le paia di basi (bp), interpolo la retta.

Si può separare anche RNA a singolo filamento e i nucleotidi.

I **fattori limitanti** sono la purezza e la quantità.

Occorre evitare che una singola molecola di RNA si appaia:

STEM → zona appaiata (o struttura a forcina)

LOOP → zona non appaiata o ansa

Per un ribosoma è + facile leggere un RNA lineare per cui nella cellula si deve prevenire l'appaiamento grazie a delle particolari proteine.

SSB → SingleStrandBindingProteins: strutture proteiche abbinata al DNA.

Per continuare ad aprire la doppia elica → enzimi specializzati a svitare DNA o RNA (ke appaiato è + stabile) e si chiamano **ELICASI**.

Come posso vedere l'organizzazione di una molecola di RNA o altro in cellula?

Posso tenere conto del ΔG degli appaiamenti e si abbinano con una sommatoria, naturalmente tutto ciò lo esegue un computer.

IPOTIZZO quindi un mRNA e posso visualizzare con tecniche appropriate la struttura con i nucleotidi marcati di cui conosco la sequenza.

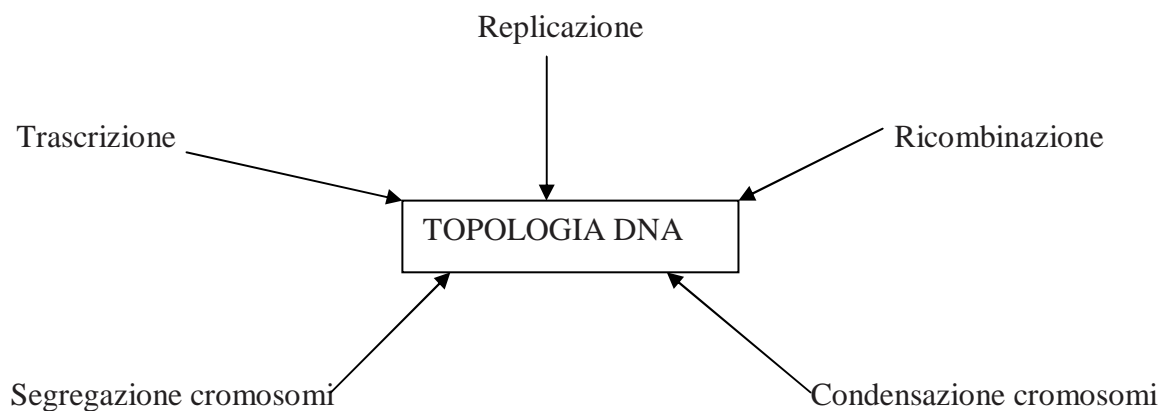
Posso tagliare RNA con enzimi (**RNAasi**) e se ci sono regioni protette vuol dire che ci sono siti organizzati e li posso vedere con una elettroforesi.

Dopo aver rilevato che vi è una certa struttura di RNA ci si chiede una cosa molto importante: A COSSA SERVE? QUALE LA SUA FUNZIONE?

Per es. se nell'estremità 5' ci sono sequenze regolatrici (AUG) e nella zona non trascritta c'è uno STEMLOOP → non trascrive per cui se il ribosoma si attacca a monte dello stemloop si ha la traduzione fino allo stemloop e se si attacca a valle → traduzione dopo lo stemloop.

TOPOLOGIA DEL DNA →

CROMATINA: interazione tra acidi nucleici e proteine ed è la risposta al problema di come avvolgere il DNA



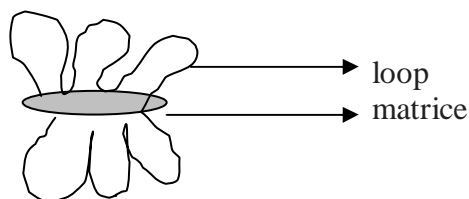
TOPOSIOMERIZZAZIONE → diverse strutture dello stesso DNA

RICOMBINAZIONE → riparare lesioni al DNA e permette la variabilità genetica

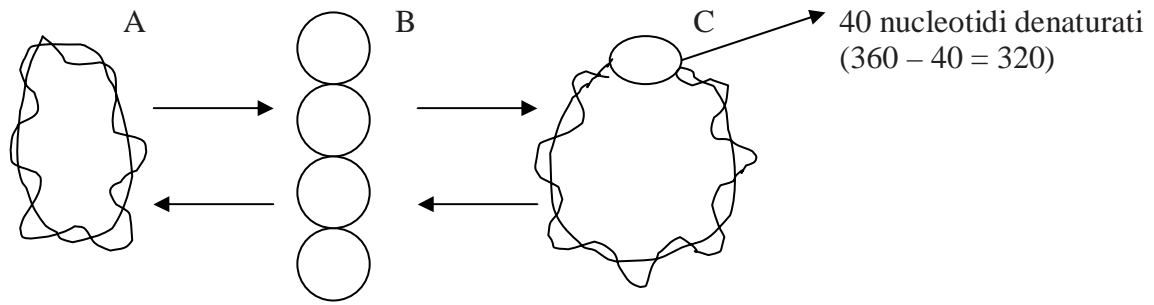
Se c'è troppa ricombinazione è un segnale di allarme (tumore).

- ci sono enzimi che trasformano topoisomeri diversi: **TOPOISOMERASI**
- se non ci fossero questi enzimi non segregherebbero i cromosomi e non si avrebbe replicazione
- questi sopra sono i **TARGET** favoriti dalle topoisomerasi (x i tumori)
- esistono strutture "cruciforme" o Holiday Junction

Anche nei batteri e batteriofagi è presente il problema di ripiegare il DNA; al centro si nota una matrice poco chiara ove si dipartono delle anse (loop) che si possono attorcigliare.



TOPOISOMERI → molecole identiche in sequenza e lunghezza ma diversa struttura



360 bp	360 bp	360 bp
T = 36	T = 36	T = 320
W = 0	W = -4	W = 32
L = 36	L = 32	L = 32

W = writhing number → n° di superavvolgimenti (relaxed, W = 0)

L = linking number → stato topologico molecola di DNA

T = twisting number → n° di giri dell'elica → $\frac{\text{n° totale bp}}{\text{bp/giro elica}}$

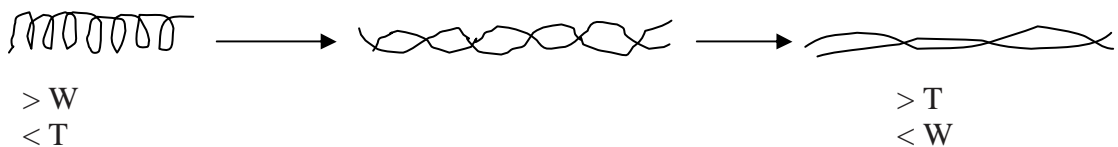
L = T + W

Quasi tutti i riavvolgimenti sono negativi

Per passare da B a C basta aprire B e poi si svolge tutta la struttura, posso denaturare.

Da A a B → aprire 2 eliche + enel

Da B a A → si rompe 1 sola elica e in modo spontaneo l'altra si svolge; **nick** = rottura del legame fosfodiesterico e si libera enel



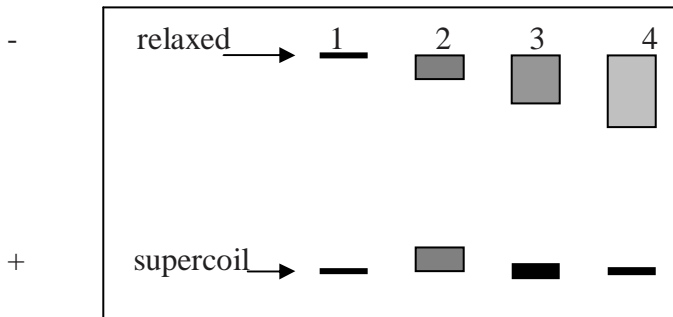
CONSIDERAZIONI TERMODINAMICHE:

- la molecola superavvolta ha > enel di quella rilassata
- il superavvolgimento consente di immagazzinare enel (1 superavvolgimento negativo/200 bp → ~9Kcal/mol)
- l'anel può essere utilizzata per denaturare piccole regioni di DNA (12-50Kcal/mol per denaturazione)

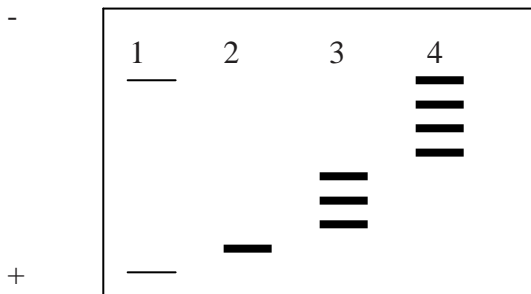
Più efficiente è la purificazione del DNA per l'elettroforesi e più sarò superavvolto

Per passare da supercoiled a relaxed → rompere 1 filamento e l'enzima per andare avanti deve rompere e chiudere la doppia elica

La DNAasi taglia solo per cui non ho intermedi:

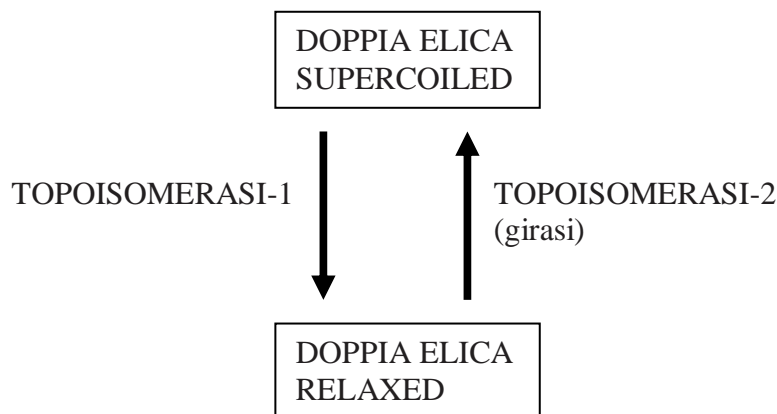


1 → controllo
 2-3-4 → aggiungo [] maggiori di enzima DNAasi
 Nelle [DNA] che abbiamo, la DNAasi taglia in punti diversi per cui l'elica è circolare
 Nell'altro caso:



Abbiamo prodotti discreti per cui le rotture devono essere saldate → questi enzimi: NICK & CLOSING e sono TOPOISOMERASI (I) che convertono il DNA supercoiled in DNA meno supercoiled in modo discreto.
 Se uso un eccesso di enzima “nick & closing” → tutto rilassato quindi è molto importante la [enzima].

Il **bromuro di etidio** si va a intercalare nella doppia elica e la deforma → induce superavvolgimenti positivi senza rompere niente.



Uno sbilanciamento può causare gravissimi problemi alla cellula (mutanti).
 Topoisomerasi 2 → rompe entrambi i filamenti → avvolgimento da + a -
 Topoisomerasi 1 → rompe 1 filamento

Sono essenziali per la vitalità della cellula; gli **inibitori** delle topoisomerasi facilitano il distacco dell'enzima senza far richiudere il DNA.

Come posso capire il ruolo fisiologico di questi enzimi?

- uso dei mutanti: LIEVITO
- se elimino i geni TOP2 la cellula muore

Instabilità GENOMICA → accumulo di mutazioni (traslocazione, inversione, ecc.)

I mutanti possono essere:

- **TEMPERATURA SENSIBILE (T.S.)**: mutazioni puntiformi che modificano il folding di una proteina per cui assume patogenicità solo a determinate temperature.
- **CONDIZIONALI LETALI**: mutanti in un gene essenziale per cui a causa di una condizione ambientale abnorme diventano letali.

Screening di cellule tumorali → confronto cellula sana con malate

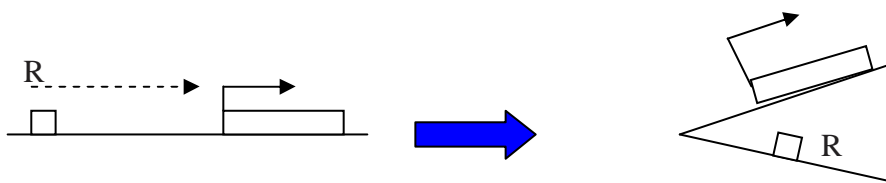
CROMATINA:

BENDING → curvatura del DNA dovuta alla presenza di alcuni legami A—T; può essere **NATURALE** (o intrinseco) oppure **INDOTTO** da proteine che legandosi al DNA creano curvature indipendentemente da AT



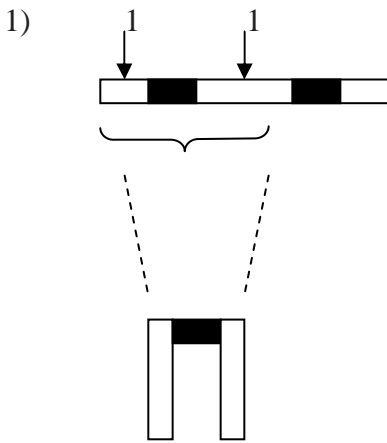
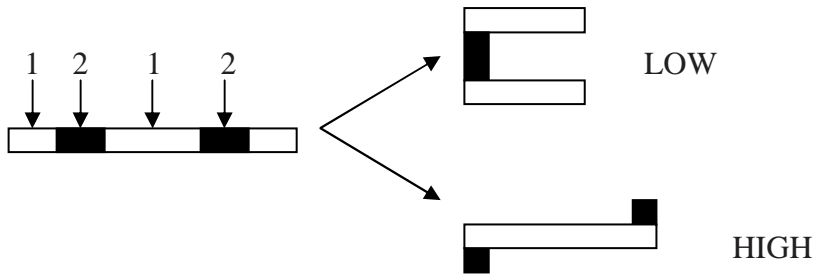
A cosa serve tutto ciò?

TRASCRIZIONE: nelle vicinanze di un gene c'è una zona regolatrice dove si lega una proteina e inizia la trascrizione (in procarioti, maniera lineare) ma per quanto concerne gli eucarioti, nel DNA "lineare" le regioni sono posizionate a diverse migliaia di basi di distanza e a volte sono anche presenti a valle del gene da trascrivere per cui se la struttura fosse piegata a "bending" le distanze si accorciano. Il BENDING quindi ha importanti implicazioni sulle regolazioni geniche.

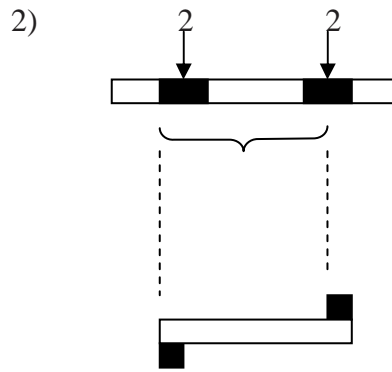


Per **mappare** il centro di curvatura della molecola:

- possiedo una barra di DNA con all'interno 2 regioni che inducono curvatura
- mi avvalgo di 2 enzimi di restrizione (1 e 2)
- separo il DNA in 2 provettine diverse e faccio elettroforesi:



Migrazione diversa da 2



migrazione diversa da 1

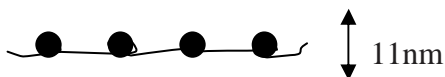
i frammenti
sono di
dimensioni =
e di
sequenza
diversa

Per sapere se sono importanti queste zone, posso cambiarle con altre basi.

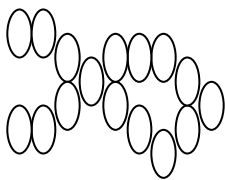
CROMOSOMI EUCARIOTICI:

- DNA = 2 nm (microscopio elettronico)
- Cromosoma = 1400 nm (microscopio ottico)

DNA → **FIBRA DI CROMATINA**: impiccamento del DNA e larghezza di 11 nm



FIBRA DI CROMATINA → **SOLENOIDE**: collana di perle avvolta in modo + ordinato



SOLENOIDE → **ANSE**

Dopo altri 2 passaggi si ha la tipica forma a X del cromosoma.

La cromatina vista al M.E. presenta una struttura amorfa con dei pallini elettrondensi;
Se le palline fossero di RNA → tratto con RNAasi e se sparisce allora l'RNA è parte integrale;
Con la DNAasi (cromatina + nucleasi) → palline + sparse **QUINDI**:

- le strutture elettrondense non sono DNA
- il DNA teneva assieme le palline

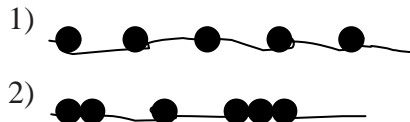
Infine se tratto con **PROTEASI** anche la particelle si disgregano.

Da tutto ciò si deduce che la **cromatina** è la sostanza nucleare fatta di DNA e proteine.

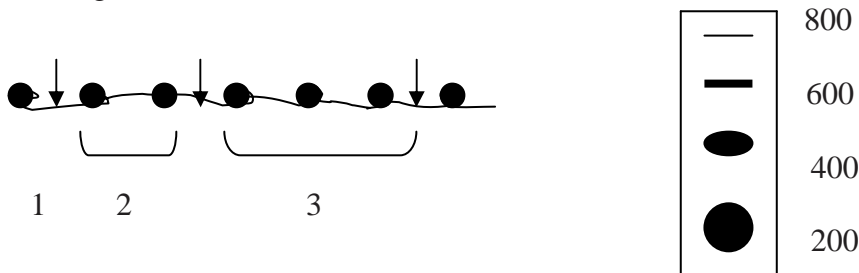
Un altro esperimento consiste nella digestione con *nucleari micrococciche* in grado di degradare il DNA “nudo” ma non se è mascherato.

Tutto il prodotto ottenuto viene purificato e deproteineizzato e poi seguo elettroforesi e ottengo bande di DNA (so che è DNA dopo che ne ho misurato l'ABS = 260 nm). Le bande sono l'una multiplo dell'altra e ipotizzo un'organizzazione multimerica.

2 ipotesi su come è organizzata la cromatina:



L'esperimento è stato fatto in [] non saturanti di DNAasi per cui se è vera la prima ipotesi (1) otterrò un taglio statistico:



Se eccedo con la nucleari → 200

- se è vera l'ipotesi (1) e utilizzo condizioni saturanti → tutto il digerito: 200
- se è vera l'ipotesi (2) e se uso [] diverse di enzima a saturazione si otterrebbe sempre lo stesso risultato



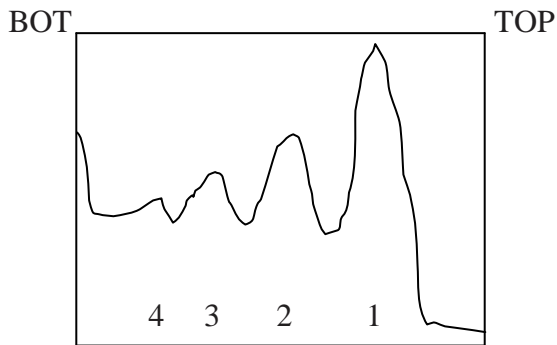
L'ipotesi corretta è la (1):

- struttura monometrica
- purificazione degli intermedi di elettroforesi

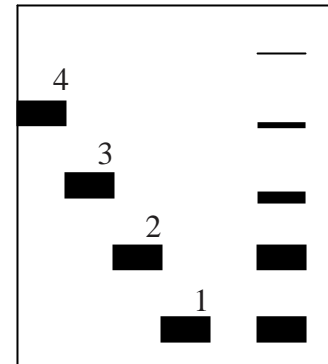
Devo preparare un GRADIENTE →

- in una provetta da centrifuga devo creare un gradiente di profondità > sul fondo e leggera sul “**top**”
- utilizzo saccarosio o glicerolo
- uso un *formatore di gradiente*
- dopo che ho la mia provetta col saccarosio stratifico il campione, ne introduco pochi µl in soluzione acquosa → interfaccia visibile
- centrifuga
- le particelle sono spinte verso il “**bottom**” e quelle con densità maggiore migrano + velocemente

- misuro il coefficiente di sedimentazione (o di Svedberg: **S**)
- estraggo le particelle tramite capillare o pompa
- quello che pesco va in provette seriali
- dal TOP la densità decresce
- il tutto è monitorato da uno spettrofotometro (260 nm)



1 = monomeri
2 = dimeri
3 = trimeri
4 = tetrameri



La frazione che corrisponde ad ogni picco → elettroforesi:

Dentro alla massa di DNA ho trovato del materiale proteico che sono gli **ISTONI**.

ISTONI →

- si associano al DNA in modo stabile
- formano un cilindro

costituiti da 2 **H2A** + 2 **H2B** + 2 **H3** + 2 **H4**

CORE:

- cuore del nucleosoma
- otetto istonico: 8 subunità uguali 2 a 2
- si attorciglia il DNA duplex per ~ 200 bp

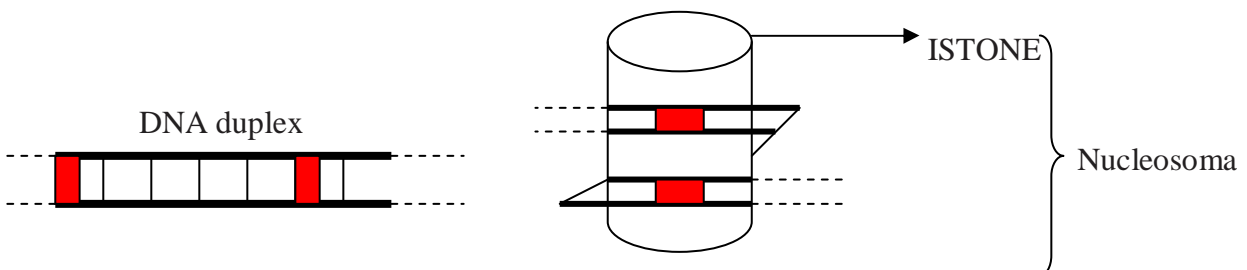
H1: istone che non fa parte del “rocchetto” vero e proprio ma è fondamentale

I nucleosomi sono uniti da DNA linker

Quando tratto con DNAasi, l'enzima taglia e mangia le estremità, il resto è protetto dalla **matrice proteica** → digestione totale.

La minima regione coperta da istoni è di 146 bp ma occorre una grande quantità di DNAasi → **SATURAZIONE**.

Quando il DNA si avvolge posso far avvicinare 2 tratti di DNA che erano lontani



H1 →

- funzione rilevante ma che esula dalla funzione del CORE
- si posiziona a lato del rocchetto istonico e stabilizza la struttura
- se si dissocia dal nucleosoma il DNA è + libero di sciogliersi

Come regolo H1?

- 1) se degrado la proteina la devo risintetizzare
- 2) se utilizzo una **kinasi** è un processo reversibile, - dispendioso.

Il nucleosoma è una situazione incompatibile con la segregazione dei cromosomi mentre il cromosoma è una situazione OK per la segregazione ma non per la replicazione.

Cosa avviene se non c'è condensazione completa?

- se i fusi si formano → segregazione anomala
- se i fusi non si formano → sistemi di controllo che prevengono attivamente la condensazione
- se replicazione e condensazione non sono completi → **sistemi di controllo** (check point) per “frenare” la cellula

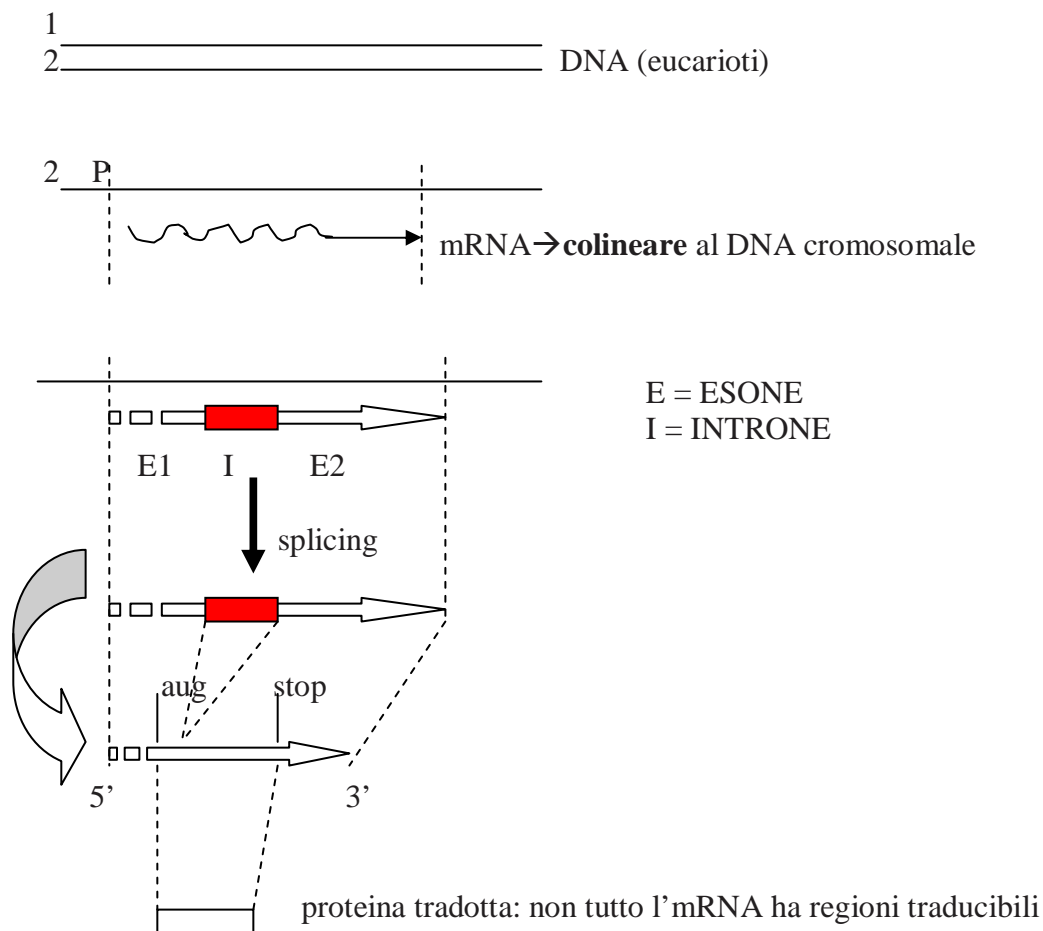
Se avviene la segregazione errata:

- aneuploidie
- instabilità genomica
- accumulo di mutazioni
- cellule tumorali

Tecniche d'indagine

Non tutto il DNA viene trascritto in quanto vi sono “*junk dna*” (DNA-spazzatura) e sequenze chiamate **esoni** e **introni**.

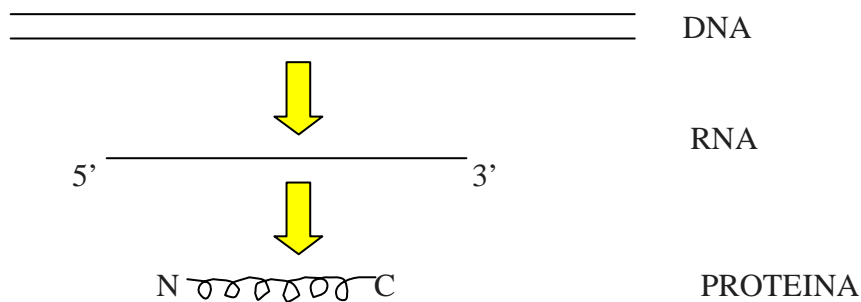
Come faccio a sapere le sequenze tradotte?



Con la proteina non c'è **colinearità** difatti per codificare una proteina di 100 aa occorrono 300 o addirittura migliaia di nucleotidi.

PROMOTORE → sequenza che consente al DNA di essere trascritto e fa parte del GENE. Nei batteri non vi è lo **SPLICING** e il promotore viene trascritto.

Non tutti gli RNA vengono tradotti perché alcuni andranno a costituire **tRNA e ribosomi**



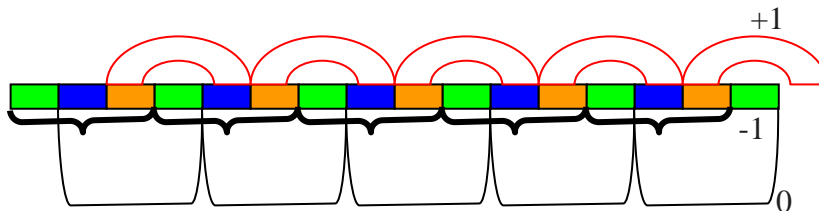
Tutte le polimerasi → 5' 3' (sintetizzano d 5' a 3' leggendo da 3' a 5')

FRAME → griglia di lettura

CODONE → tripletta nucleotidica

3 FRAME di LETTURA:

- (-1): se parto dal primo nucleotide
- (0): se parto dal secondo nucleotide
- (+1): se parto dal terzo nucleotide



Leggendo un codone con 2 frame diversi → proteine totalmente diverse.

5' → 3'	RNA	DNA
INIZIO	AUG	ATG
STOP (Z)	UAA	TAA
	UGA	TGA
	UAG	TAG

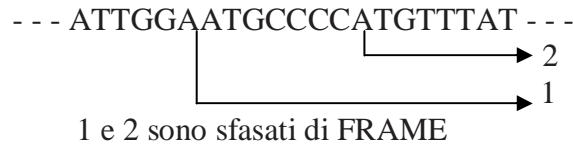
Ci sono eventi rari per cui un codone di STOP codifica per un aa funzionale.

ORF → **Opening Reading Frame**: quello che è contenuto fra il codone I inizio e uno di fine, può essere anche rappresentato dalla sequenza AUG-UAA.

Una ORF deve essere contenuta in un mRNA.

PSEUDOGENI → ex-geni, ovvero sequenze somiglianti a geni ma non sono né trascritti né tradotti.

Siccome virus e batteriofagi devono economizzare al massimo l'informazione genetica allora esistono **geni SOVRAPPOSTI** in grado di codificare per + di una proteina:



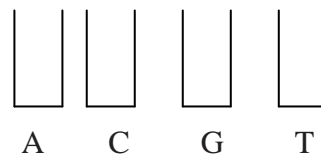
Un'anomalia genetica non è dovuta solamente a mutazioni nell'ORF ma la causa può essere anche ricercata in un'alterazione del promotore.

TECNICHE DI SEQUENZIAMENTO:

1) Maxam e Gilbert

- rendo le molecole di DNA visibili e monitorabili marcando con ^{32}P
- 4 provettine ciascuna con un agente chimico che taglia una specifica base nucleotidica
- metto un quantitativo discreto di DNA* e lo metto nelle provettine in = volume
- tratto il DNA con agenti chimici che tagliano in modo specifico a valle delle C
- l'agente chimico è in condizioni non saturanti per cui non taglia ovunque e non completo per cui parte del DNA sarà tagliato solo in "3" e ottengo 2 frammenti MA 1 solo è marcato, l'altro è **freddo** e si perde perché non è marcato; ottengo un DNA lungo 5 nucleotidi; se la molecola taglia in "2" ne ottengo 9 e se taglia in "1" ne ho 10. Ottengo sempre tutti e 3 perché sono in condizioni non saturanti
- questi frammenti → elettroforesi per cui migrano in base alla massa
- faccio la stessa cosa con un altro reagente che tagli a livello delle A; poi delle T e delle G
- autoradiografia per cui le molecole calde impressionano la lastra
- non conoscendo la sequenza del DNA di partenza non mi resta che leggere la lastra dal basso verso l'alto
- la polarità si ricava dalla marcatura

5' AATCCGTTTCGAGG* 3'



2) Sanger

vedere diapositive ppt nella cartella di /chimicabiologica/

ENZIMI DI RESTRIZIONE →

- riconoscono sequenze palindrome
- affinità per il DNA
- asse di simmetria purificati da cellule batteriche

- tagliano DNA che non appartiene all'organismo
- rompono il legame fosodiesterico
- 1) l'incisione avviene sull'asse di simmetria con le estremità piatte → **Blunt-ends**; rimangono mobili e non possono appaiarsi
- 2) l'incisione è asimmetrica, sfalsata alle estremità → **Protundung-ends** ovvero estremità appiccicose e ognuna è complementare all'altra, possono cioè appaiarsi (estremità coesive)

DNA RICOMBINANTE →

- utilizzo gene di rana
- deproteinizzo il DNA genomico
- digestione con enzima di restrizione e trovo il gene che mi interessa
- qualsiasi DNA da studiare va inserito in un **vettore plasmidico** per poterne poi produrre quantità elevate (per es. in E.coli)
- *marcatore di selezione* per E.coli (nel mio caso) → gene che codifica per un enzima che consente alla cellula di crescere in presenza di antibiotico (Amp resistente)
- saldo le rotture della digestione con **ligasi**
- *trasformazione* e seleziono le colonie
- sia il plasmide che la sequenza di gene di rana vengono tagliate con lo stesso enzima di restrizione
- ottengo quindi molecole **chimeriche** o ricombinanti
- se utilizzo batteriofagi aumento la possibilità di iniettare le molecole chimeriche nell'ospite

Si lavora spesso con geni batterici perché non presentano introni.

Se devo lavorare con geni eucariotici utilizzo il sistema ideato da **Baal** in quanto nel DNA eucariotico vengono tagliati gli introni e saldati gli esoni per cui se voglio conoscere le ORF devo leggere l'mRNA maturo. Grazie a Baal è stato possibile copiare l'mRNA (che è molto instabile) in DNA → (utilizzano l'enzima trascrittasi inversa) ottenendo così **DNA non genomico** o **cDNA** (COPY-DNA).

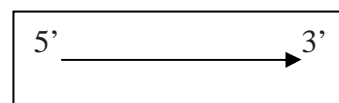
LA REPLICAZIONE

La replicazione serve per:

- duplicare il DNA
- non in tutte le cellule
- in vivo e in vitro

Partendo da un provetta e un DNA stampo →

- DNA polimerasi
- **INNESCO** → primer che può essere DNA o RNA → creare un'estremità 3'-OH
- DNA template (stampo)
- dNTP (solo per il DNA)
- H₂O
- TEMPERATURA
- TAMPONE (pH, sale,...)



Può essere copiato qualsiasi pezzo di DNA ma ci sono alcuni **LIMITI** tra i quali la possibilità che hanno le DNA-pol di sbagliare MA ci sono DNA-pol in grado di correggere.

Siccome il DNA è un limite quantitativo per le varie analisi di laboratorio sarebbe l'ideale poterlo **amplificare**. Ed è per questo che fu messa a punto la **PCR** (Polinucleotide chain reaction) che consente di produrre molto DNA partendo da una molecola piccola.

PCR→

- da un pezzo di DNA + primer→allungamento (1° round di replicazione)
- denaturazione (90°) + primer (anealing a 50°)→polimerizzazione (70°)

Quando alzo la T l'enzima si denatura e dovrei rimpiazzarlo ma sarebbe troppo dispendioso quindi furono scoperti enzimi purificati da organismi che vivono ad altissime T: **TAQ-POLIMERASI** e quindi all'interno della mia provetta posso fare tutte le reazioni necessarie.

- provetta piccolina con un blocchetto di Alluminio per aumentare la T di molti gradi in poco tempo.
- Passo da 90→50→70°C e la TAQ-pol resiste bene
- Alla fine ho DNA sufficiente per clonare

Limiti→TAQ-pol sbaglia e addirittura può essere usata per mutagenizzare ma negli ultimi anni sono state scoperte le DNA-pol con attività di "correzione di bozze"

- la PCR ha innumerevoli applicazioni
- è possibile modificare il DNA compiendo inserzioni o delezione agendo solamente sulla struttura dei primers.

REPLICAZIONE DNA:

- avviene durante il ciclo cellulare i procarioti ed eucarioti
- in caso di lesioni viene rimossa la parte malata e replicata la parte sana

FASI:

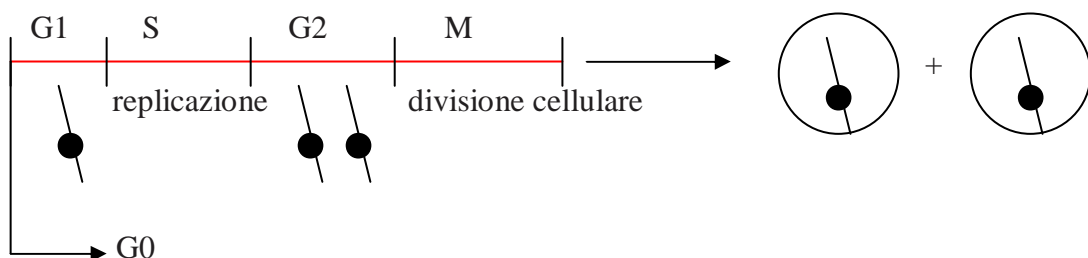
- 1) *pre-inizio* (importante)
- 2) *inizio*
- 3) *allungamento*
- 4) *terminazione*

La sintesi del DNA deve essere **controllata** (e/o regolata) perché è necessario controllare la divisione cellulare se la replicazione dei cromosomi non è completa.

Una cellula differenziata che entra in quiescenza **NON** deve replicarsi.

La cellula esegue un solo round di replicazione durante il ciclo cellulare perché se replicasse + volte si andrebbe incontro a fenomeni di poliploidia.

Ciclo Mitotico



La cellula deve **replicare** e **segregare** 1 sola volta.

Se la cellula si trova in condizioni particolari e decide di non replicare DNA→nella fase G0 o di quiescenza (che può essere reversibile o irreversibile)→no – proliferazione cellulare o entra nel differenziamento.

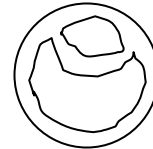
Una cellula che inizia a replicare programma **IRREVERSIBILMENTE** la divisione cellulare.

Le cellule sentono l'ambiente e la fase S riceve gli stimoli ambientali.

Un altro processo in cui la replicazione e la divisione cellulare avvengono ma con modalità un po' diverse è la **MEIOSI** → duplicazione dei cromosomi ma 2 round di divisione.

FASE DI PRE-INIZIO →

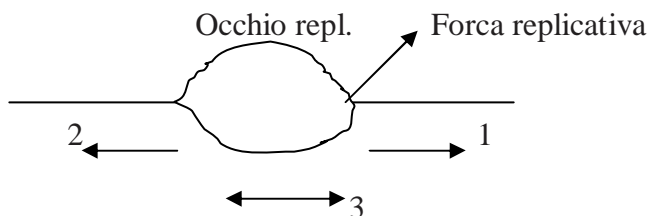
- fase cruciale
- in batteri – procarioti – E. coli
- cromosoma chiuso circolare
- struttura θ o occhi/bolle replicative (entrambe a doppia elica)
- c'è solo un **UNICO** punto di **inizio replicazione**



è sempre quel punto oppure la cellula inizia da un altro ma è sempre “uno”? →
se c'è un punto specifico la cellula deve attivare solo quella zona e ci deve essere un riconoscimento tra la sequenza del DNA (inizio sintesi) e uno o + **fattori proteici**.

Per vedere la sequenza in esame → delezioni per inibire la sintesi → **mutanti** che mutati nel gene che codifica per i fattori proteici non sono in grado di iniziare la sintesi di nuovo DNA.

↓ ↓ ↓ ↓ ↓
Nei procarioti → INIZIO SPECIFICO e FATTORI SPECIFICI

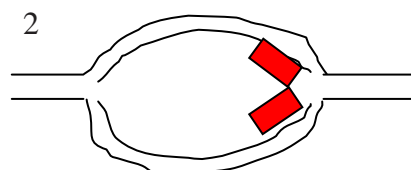
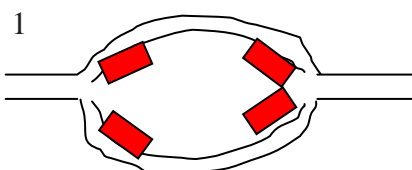


A) Se fosse in direzione (1) la forza a sinistra sarebbe fissa e stazionaria (idem per 2)

B) Se fosse **bidirezionale** (3) entrambe le forche si spostano.

Esperimento:

- cellule in coltura con periodo di tempo breve
- precursore DNA radioattivo
- nel caso B quando la cellula ha superato l'origine e ha fatto un po' di sintesi e incontra DNA* → lo incorpora e poi elimino il DNA radioattivo
- questa tecnica si chiama **PULSE & CHASE** → intervallo stretto in cui si fornisce il marcatore
- autoradiografia e vedo solo la parte **rossa** → deduco che la forza è bidirezionale. (se fosse unidirezionale → caso 2)



In realtà in procarioti accadono entrambe le cose!

Nel caso A e B occorre un fattore che svita e disannoda in DNA inoltre è da ricordare che non c'è DNA-pol che inizia la sintesi ex-novo perché la sintesi di DNA prevede che l'enzima legga lo stampo, incorpora i nucleotidi ma solo se c'è un **3'-OH** → occorre perciò un **INNESCO**.

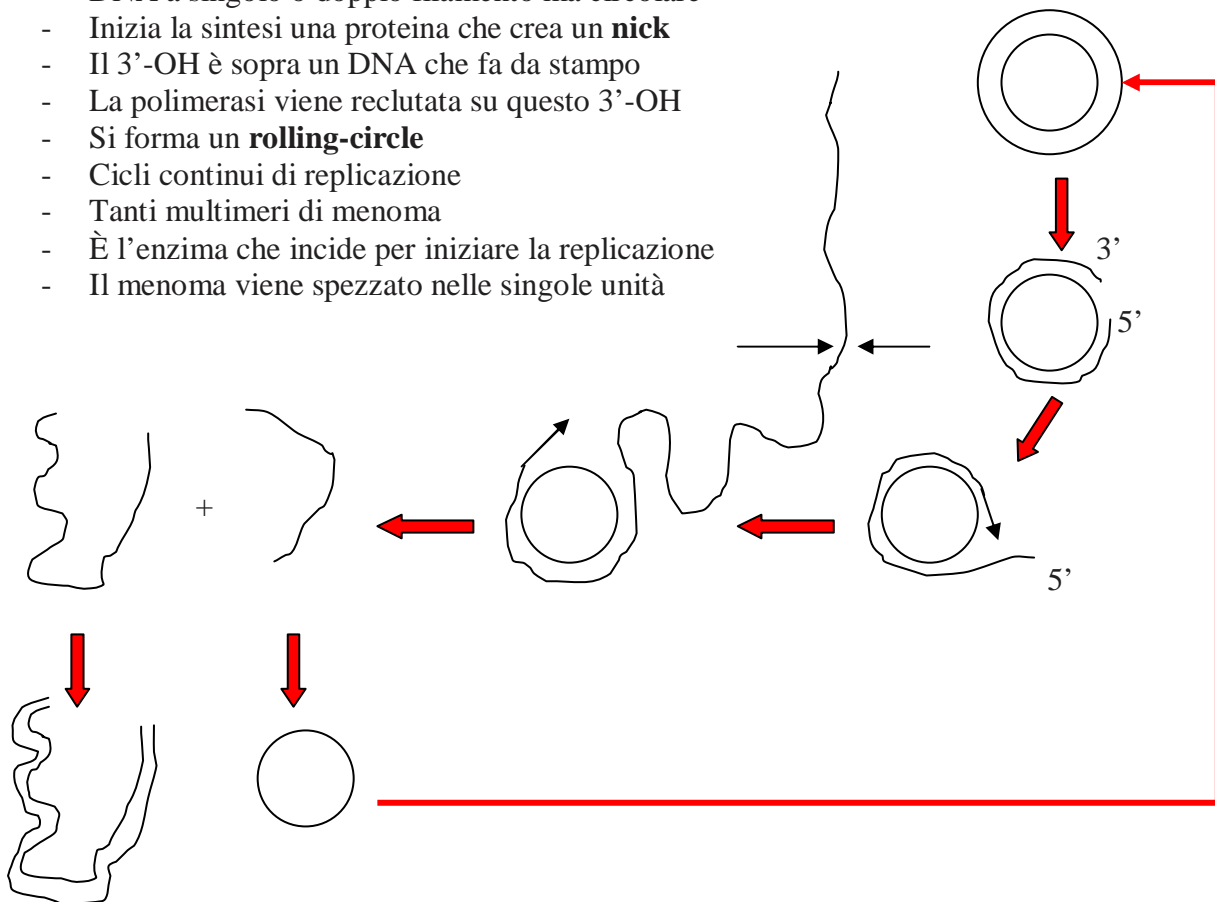
VARIE MODALITA' DI REPLICAZIONE

1) virus →

- Serina che forma legame covalente con il DNA
- Cromosoma lineare
- La proteina si lega alla estremità 3'-OH → allungamento
- Il virus si camuffa per evitare controllo cellulare (salvo eccezioni)

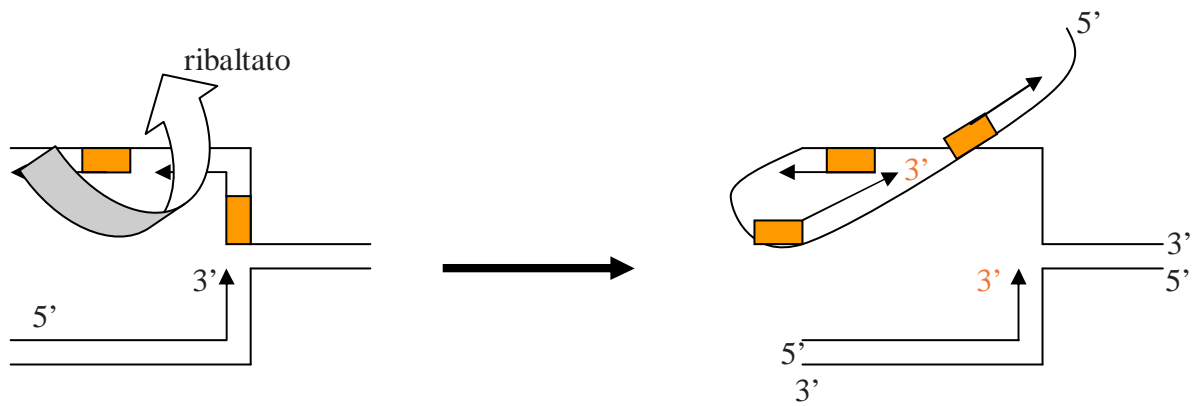
2) batteriofagi →

- DNA a singolo o doppio filamento ma circolare
- Inizia la sintesi una proteina che crea un **nick**
- Il 3'-OH è sopra un DNA che fa da stampo
- La polimerasi viene reclutata su questo 3'-OH
- Si forma un **rolling-circle**
- Cicli continui di replicazione
- Tanti multimeri di menoma
- È l'enzima che incide per iniziare la replicazione
- Il menoma viene spezzato nelle singole unità



LA REGOLA DELLA REPLICAZIONE CELLULARE:

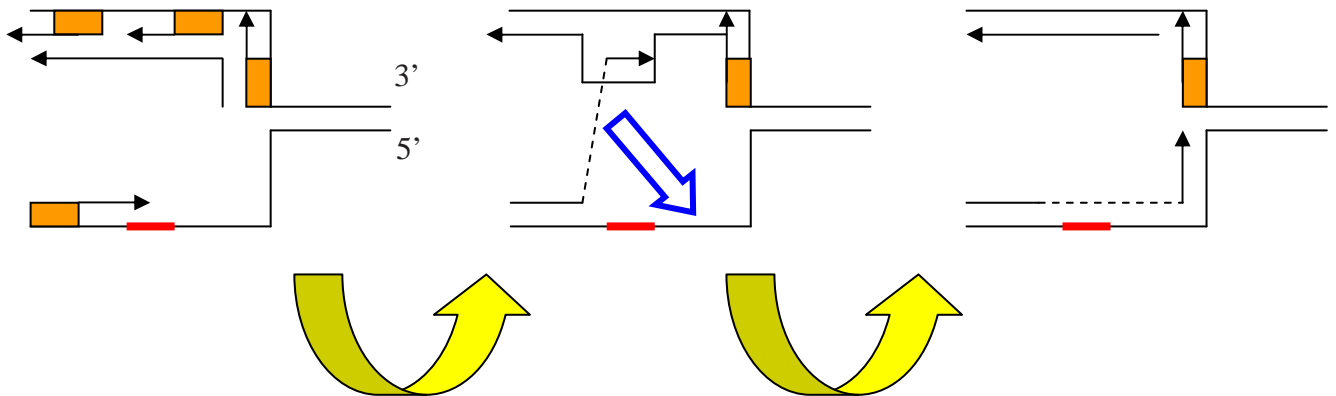
- DNA-pol replicano 5' → 3'
- Entra in azione la **primasi** dopo denaturazione DNA e genera l'innescio di DNA per formare il primer → 3'-OH
- **DNA-pol**: allungamento
- Sul filamento **leading** strand c'è solo un primer
- Sul **lagging** strand si ha una polimerizzazione discontinua → tante molecole ibride fatte da primer e DNA: **frammenti di Okazaki**.



MODELLO del TROMBONE → in questo modo le polimerasi si orientano nella stessa direzione (3')

Nel caso in cui lo stampo sia danneggiato (leading strand) la replicazione avviene nel seguente modo:

- 1) la polimerasi incorpora a caso un nucleotide → danno 2°
- 2) la **polimerasi salta**, si scolla e comincia a valle della mutazione con un nuovo primer
- 3) la polimerasi effettua un **TEMPLATE SWITCHING**: la polimerasi si blocca ma il lagging strand va avanti e dopo gli Okazaki il primer si elimina e tutto si risalda → la polimerasi invece di fare i passaggi 1 o 2 *cambia stampo*, salta sul filamento di neosintesi (lagging) → scambio di *lagging/leading*. Questo avviene solo per un piccolo pezzo e il DNA ex-novo viene riportato sulla leading saltando così il problema:



PRIMER di RNA

- verranno poi eliminati
- per la replicazione e trascrizione è fondamentale la reazione dei primi **dinucleotidi** → reazione non favorevole e soggetta a errori
- la cellula ha preferito una reazione poco efficiente ma veloce perché poi il primer verrà eliminato anche se ci sono errori. L'allungamento è + veloce.

Tutte le DNA-pol sbagliano: ma COSA SUCCEDE?

- se viene incorporato un Nu sbagliato → si accorge e torna indietro "smangiando" il Nu sbagliato → attività **esonucleasica**
- **attività proof-reading** (correzione di bozze)
- **mismatch repair**: incisa la doppia elica per eliminare la parte sbagliata e poi la ripara.

Il processo replicativi è pericoloso e mutageno per le cellule.

RIMOZIONE PRIMER:

- nucleari che smangiano RNA e un pezzettino di DNA
- **RNAasi-H**
- Si generano dei "buchi": **GAP** ma a destra del GAP c'è un 3'-OH → DNA-pol specializzata che va a riempire i GAP
- Rimangono dei NICKs (legame fosfodiesterico) → **LIGASI** che risalda le rotture

Per studiare la replicazione si utilizza un approccio biochimico e genetico creando mutanti letali/condizionali.

ELICASI → svitare la doppia elica → ssDNA

SSB → SingleStrandBinding-protein → ssDNA è instabile ma grazie alle SSB → stabile

DNA-POLIMERASI → scalzano via le SSB e polimerizzano il DNA

Esperimento: in E.coli ci sono 3 DNA-pol → il mutante del gene che codifica per la DNA-pol 1 a T alta è in grado di replicare DNA, se fosse DNA-pol replicativa vera e propria non ne sarebbe capace. Opzione-1) la DNA-pol non serve a niente

Opzione-2) la DNA-pol serve per altre funzioni (es. riparazione)

La sintesi del DNA serve per:

- mitosi
- meiosi
- riparazione

Se con una mutazione inattivo la DNA-pol-3 → no-replicazione → la cellula muore → deduco che questo è un enzima essenziale per la replicazione.

Se con una mutazione inattivo la DNA-pol-1 → replica lo stesso ma per capire se è essenziale si crea il danno con dei mutageni:

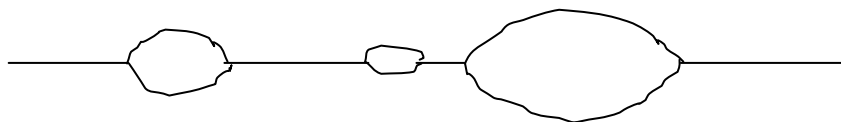
- wt [U.V.] → +
- pol-1 [U.V.] → -

DNA-POLIMERASI-3

- diverse subunità ma con simmetria
- diversi prodotti genici
- 2 subunità = di β → anello
- α → produce DNA sia su lagging che leading
- β → aggancia lo stampo; CLAMP → pinza; sequenze aa diverse in eucarioti e procarioti ma la struttura è uguale
- τ → fa da ponte
- δ → aggancia la PRIMASI

EUCARIOTI:

In un pezzo di cromosoma di *D.melanogaster* sono state trovate + bolle e + punti di inizio:

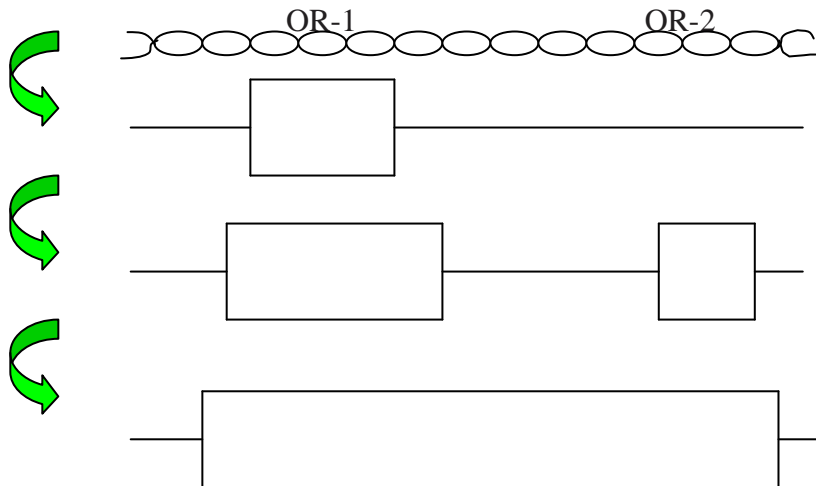


Bolle di diverse dimensioni ma non sono un artefatto.

- 1) la velocità di propagazione è diversa oppure l'inizio è simultaneo dappertutto ma la velocità è diversa;
- 2) è l'inizio che è diverso e l'accensione non è simultanea

RISPOSTA → ATTIVAZIONE ORIGINI NON SIMULTANEA e BIDIREZIONALE

Cromosoma eucaristico con + origini (OR)



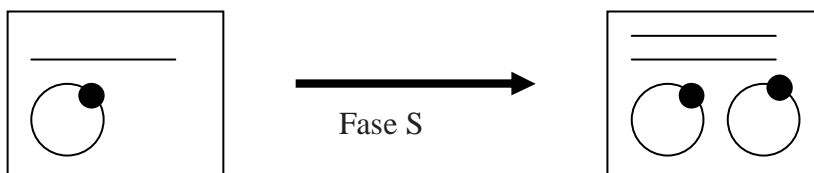
Le origini sono sparate in modo asincrono ma non è chiaro il perché. I sistemi + studiati sono lievito e virus.

L'origine di replicazione è **NUCLEOSOME FREE**.

Il sistema di replicazione è origine dipendente o indipendente?

PROCEDURA:

- lavoro su mutazioni → approccio genetico (in vivo)
- lievito è l'ideale per approccio biochimico e genetico in quanto è possibile trasformarlo
- dentro la cellula sparò il DNA manipolato
- il DNA può integrarsi nel cromosoma ma deve prima entrare nel nucleo e ricombinarsi
- il DNA può circularizzare ed essere stabile per una generazione e durante la replicazione può migrare con le generazioni e si perderà
- un DNA EPISOMALE replicabile autonomamente è l'IDEALE per cui il pezzo di DNA eterologo deve avere caratteristiche pseudocromosomali
- se il mio minicromosoma ha origini di replicazione allora può segregare



A questo punto per individuare l'origine di replicazione:

- occorrono pezzi di DNA di lievito e li ottengo tagliando con enzimi di restrizione
- uso **DNA genomico** e NON cDNA perché il cDNA non ha promotori (è DNA di espressione) né origini di replicazione

- metto questi pezzi di DNA in un plasmide (tanti plasmidi) e costruisco una banca genomica (molecole ricombinanti con pezzi genomici all'interno di uno scheletro plasmidico)
- trasformo
- analizzo le colonie col mio costrutto per trovare quelle con la sequenza OR
- per rilevare questi eventi metto nel plasmide un marcatore selettivo → geni che consentono di crescere in assenza di un aa per es. TRP1 → gene per l'enzima che sintetizza TRP. Se ho la mutazione su questo gene ($trp1\Delta$) → enzima alterato e la cellula muore.
- La banca ha il plasmide col marcatore di selezione TRP1
- I plasmidi sono inseriti in lieviti che presentano la mutazione $trp1\Delta$
- Trasformo e piaastro senza mettere TRP
- Crescono solo le colonie che in seguito a trasformazione hanno ricevuto le molecole
- Per crescere la colonia si deve duplicare → trasmissione geni → mantenute solo le molecole con OR
- Le colonie cresciute contengono i plasmide con le OR e quindi prelevo le cellule ed estraggo il DNA plasmidico
- Sequenziamento
- Tutta questa procedura dura ~ 1 settimana
- Per capire la regione necessaria sufficiente dell'OR → **mutagenizzo**: cambio sequenza e vedo cosa succede:
 - 1) 6 nu che mi danno l'origine
 - 2) nucleosome free
 - 3) bolle replicative
 - 4) un po' ovunque

Origini → sequenze simili tra loro e intervallate nel cromosoma.

A questo punto: COME e CHI le fa ATTIVARE?

IPOTESI: una struttura particolare o + proteine.

RISPOSTA: sono delle PROTEINE i FATTORI che legano le OR e si chiamano **ORC** (Origin Complex).