

DNA

L'acido desossiribonucleico o deossiribonucleico (DNA) è un acido nucleico che contiene le informazioni genetiche necessarie alla biosintesi di RNA e proteine, molecole indispensabili per lo sviluppo ed il corretto funzionamento della maggior parte degli organismi viventi.

Il DNA fu inizialmente isolato dal biochimico svizzero Friedrich Miescher, il quale, nel 1869, individuò una sostanza microscopica contenuta nel pus di bende chirurgiche utilizzate. Dal momento che tale molecola aveva la sua localizzazione nel nucleo, egli la chiamò **nucleina**.

Nel 1919 Phoebus Levene individuò la struttura del nucleotide, composta da base azotata, zucchero e fosfato e suggerì che il DNA consistesse di un filamento di nucleotidi legati tra loro attraverso i fosfati. Egli, però, era convinto che tale filamento fosse corto e che le basi fossero disposte secondo un preciso ordine ripetuto.



Nel 1928 Frederick Griffith scoprì che i caratteri della forma smooth ("liscia") di *Pneumococcus* potevano essere trasferiti alla forma rough ("rugosa"), miscelando i resti di batteri smooth morti con batteri rough vivi. Questo sistema, pur non fornendo nessuna evidenza su quale fosse la sostanza che determinava il cambiamento, mostrava che qualcosa potesse trasportare l'informazione genetica dai resti dei batteri morti a quelli vivi. Si parlò quindi di un principio trasformante in grado di modificare i batteri vivi.

Esperienza di Griffith

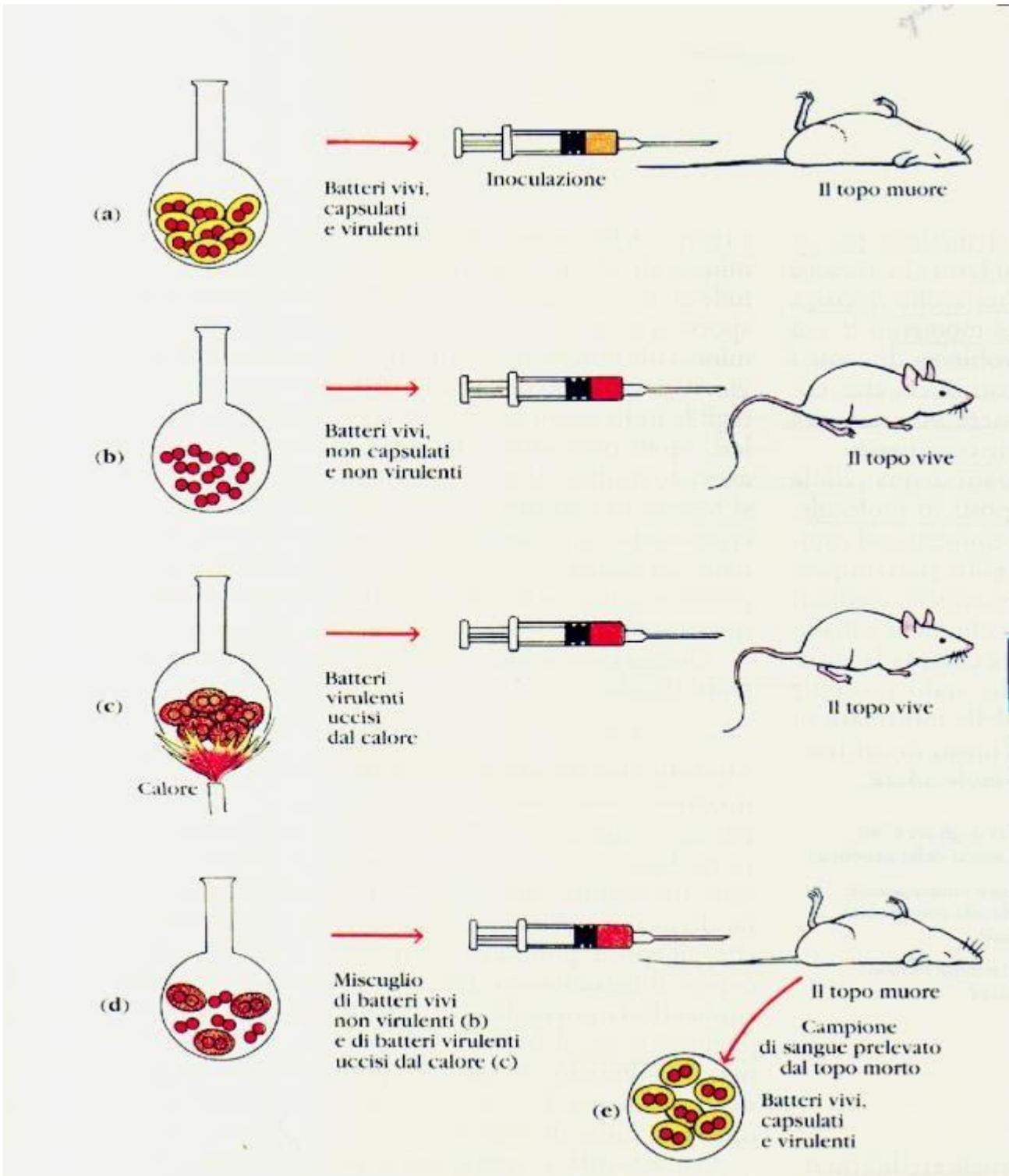
La polmonite umana può essere causata dal batterio *Streptococcus pneumoniae*.

Griffith lavorava su vari ceppi al fine di trovare un vaccino per questa malattia, che mieteva, all'epoca, numerose vittime.

Griffith lavorava su due ceppi

il ceppo rough (R) era costituito da cellule con superficie ruvida, perché non possedevano capsula esterna e non erano cellule virulente

il ceppo smooth (S) era costituito da cellule con superficie liscia, perché possedevano una capsula esterna che li proteggeva dagli attacchi del sistema immunitario dell'ospite. Per tale motivo le cellule erano virulente.



- 1- Se si iniettano cellule di ceppo R, il topo vive. questo è secondo le attese, il ceppo R non è virulento. nel cuore del topo non sono presenti batteri vivi.
- 2- Se si iniettano cellule di ceppo S, il topo muore. questo è secondo le attese, il ceppo S è virulento nel cuore del topo sono presenti batteri vivi del ceppo S.
- 3- Se si iniettano cellule di ceppo S, ma uccise col calore, il topo vive. questo è secondo le attese, se uccido le cellule, non possono infettare il topo e il topo vive . nel cuore del topo non sono presenti batteri vivi.

- 4- Se si iniettano cellule di ceppo R, mescolate con cellule di ceppo S uccise col calore, il topo muore. questo è contro le attese, il ceppo R non dovrebbe uccidere il topo, e neanche le cellule del ceppo S. L'unica spiegazione è che qualcosa presente nelle cellule del ceppo S morte sia passato alle cellule del ceppo R vive, trasformandole e dandole l'abilità di formare la capsula. Nel cuore del topo sono presenti batteri vivi del ceppo S.

Questo dimostra che qualche sostanza, allora chiamata **FATTORE DI TRASFORMAZIONE**, estratta da pneumococchi S morti, poteva agire sulle cellule R provocando un cambiamento ereditario.

Nel 1943 Oswald Theodore Avery dimostrò, in un celebre esperimento insieme a Colin MacLeod e Maclyn McCarty, che il DNA è il principio trasformante alla base di questo fenomeno.

Esperienza di Avery

Gli esperimenti di Avery permisero di rispondere alla domanda: **QUAL E' IL FATTORE DI TRASFORMAZIONE** tra le principali biomolecole: carboidrati, lipidi, proteine e acidi nucleici ??????

COME SVOLSE GLI ESPERIMENTI?

Sottopose i campioni contenenti le diverse biomolecole a trattamenti (ENZIMI) che le distruggevano una alla volta.

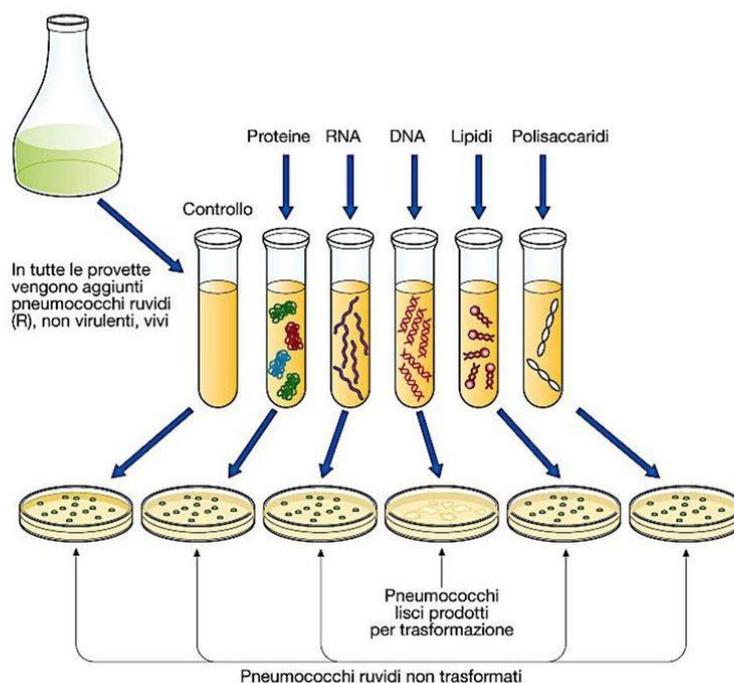
Controllarono se tali cambiamenti portavano o meno a trasformare i ceppi R in ceppi S.

I RISULTATI

Il campione contenente DNA era l'unico che manteneva l'attività di trasformazione.

Gli altri campioni contenenti RNA, carboidrati, proteine o lipidi non mostravano la capacità di trasformazione.

L'esperimento di Avery



CONCLUSIONE:

La sostanza trasformante è il DNA.

Il ruolo del DNA nell'ereditarietà è stato provato, infine, nel 1953 da Alfred Hershey e Martha Chase attraverso un altro classico esperimento, che dimostrò che il materiale genetico del fago T2 è effettivamente il DNA.

Esperimento di Alfred D. Hershey e Martha Chase

L'esperimento di Alfred D. Hershey e Martha Chase prova definitivamente nel 1953 che il materiale genetico è costituito da DNA e non da proteine

Hershey e Chase svolgevano studi su un fago, ovvero un virus in grado di infettare i batteri, nel loro caso il batterio Escherichia coli (E. coli); in particolare il fago di loro interesse era noto come "T2".

All'epoca era noto che T2 era formato esclusivamente da DNA protetto da un involucro proteico.

I due scienziati prepararono in parallelo due colture di Escherichia Coli:

Nel terreno di coltura della prima introdussero fosforo (l'isotopo ^{32}P).

Nel terreno di coltura della seconda introdussero zolfo (l'isotopo ^{35}S).

I batteri delle due colture metabolizzarono da una parte il fosforo e dall'altra lo zolfo introducendo questi atomi radioattivi nelle biomolecole presenti all'interno delle cellule.

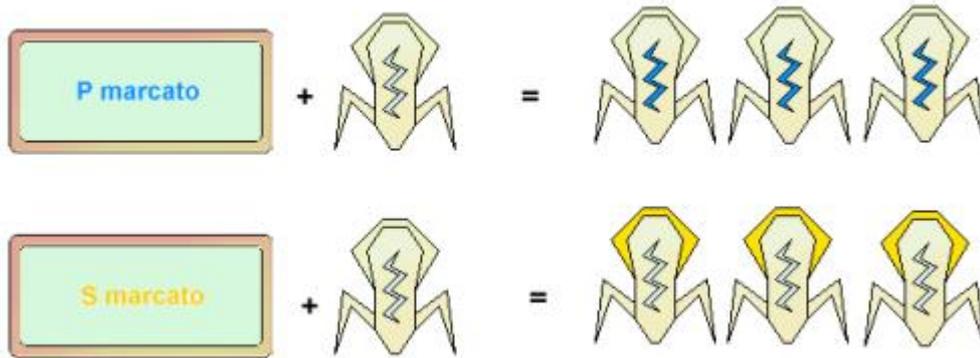
In particolare:

Il fosforo si troverà in gran parte nei nucleotidi e di conseguenza anche negli acidi nucleici; non sarà presente invece nelle proteine.

Lo zolfo si troverà nelle proteine (in particolare nell'amminoacido cisteina) e non si troverà nei nucleotidi e, quindi, nel DNA.

A questo punto i ricercatori infettarono parallelamente le colture batteriche con il fago T2. Questo virus utilizza l'apparato biosintetico delle cellule di E. coli per replicare il proprio DNA e per sintetizzare le proteine del rivestimento .

Dal momento che i nucleotidi e gli amminoacidi utilizzati nella sintesi del DNA e delle proteine virali sono quelli presenti all'interno della cellula infettata, ne risulta che i fagi sviluppati dall'infezione nella prima coltura avranno un DNA marcato radioattivamente, mentre quelli sviluppati dall'infezione della seconda coltura avranno il rivestimento proteico esterno marcato radioattivamente.



Hershey e Chase separarono i fagi neoformati (quelli marcati) dai due terreni di coltura e, separatamente, li utilizzarono per infettare altre due colture di E. coli, in questo caso cresciute su terreni "standard" privi di isotopi radioattivi.

Nel caso in cui i fagi infettanti avessero il DNA marcato, in seguito all'infezione gran parte della radioattività veniva misurata all'interno delle cellule batteriche colpite (e nel DNA di una parte dei nuovi fagi sviluppatasi in seguito a questa infezione).

Nel caso in cui i fagi infettanti avessero il rivestimento proteico marcato, la radioattività veniva misurata solamente all'esterno delle cellule batteriche colpite (e non era presente sul rivestimento proteico dei nuovi fagi sviluppatasi in seguito a questa infezione).

Dal momento che il fago per replicarsi ha bisogno di introdurre all'interno della cellula ospite il suo materiale genetico per poter sfruttare l'apparato batterico di replicazione del DNA, appare evidente che questo materiale genetico deve per forza essere il DNA poiché, come dimostrato, le proteine non entrano nella cellula colpita, mentre il DNA sì.

Il 1953 è anche l'anno in cui, attraverso ulteriori immagini da diffrazione a raggi X realizzate da Rosalind Franklin, James Watson e Francis Crick presentarono, sulla rivista Nature, quello che è oggi accertato come il primo modello accurato della struttura del DNA, ovvero il modello a doppia elica. A disegnarne il bozzetto fu Odile Speed, pittrice e moglie di Crick. Le evidenze sperimentali a supporto del modello di Watson e Crick furono riportate in una serie di cinque articoli pubblicati sullo stesso numero di Nature.

p.s. Watson ha fatto commenti razzisti e sessisti per buona parte della sua carriera, ma nel 2007 si superò quando disse al Sunday Times di essere "pessimista per natura sul destino dell'Africa" perché "tutte le nostre politiche sociali sono basate sul fatto che la loro intelligenza sia la stessa della nostra, benché tutti i test dicano che la verità sia ben diversa". Disse poi che anche se confidiamo che l'intelligenza sia uguale in tutte le razze, "le persone che hanno a che fare con impiegati neri sanno che le cose stanno diversamente".

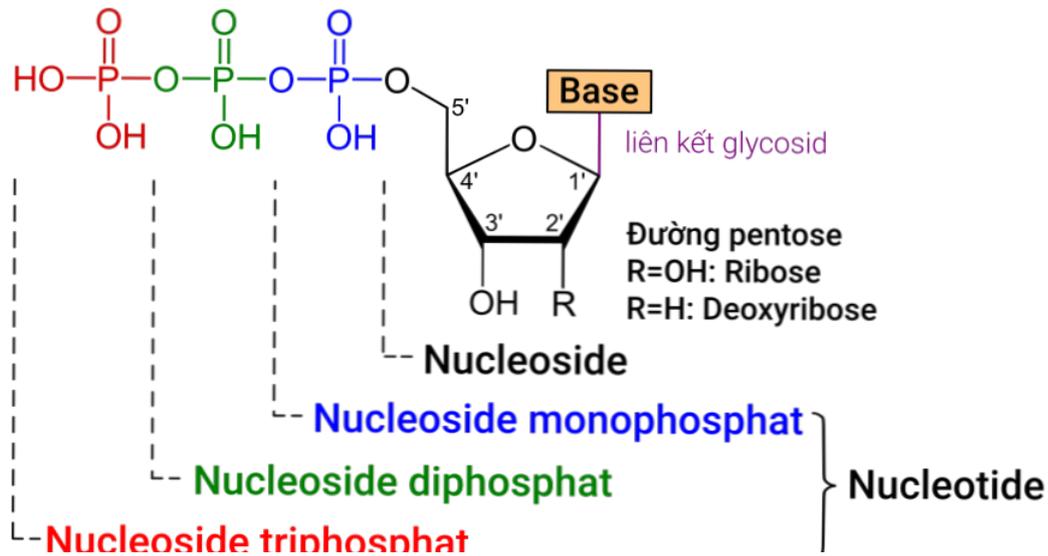
Composizione

Dal punto di vista chimico, il DNA è un polimero organico costituito da monomeri chiamati nucleotidi (deossiribonucleotidi). Tutti i nucleotidi sono costituiti da tre componenti fondamentali: un gruppo fosfato, il deossiribosio (zucchero pentoso) e una base azotata che si lega al deossiribosio con legame N-glicosidico. Le basi azotate che possono essere utilizzate nella formazione dei nucleotidi da incorporare nella molecola di DNA sono quattro: adenina, guanina, citosina e timina mentre nell'RNA, al posto della timina, è presente l'uracile.

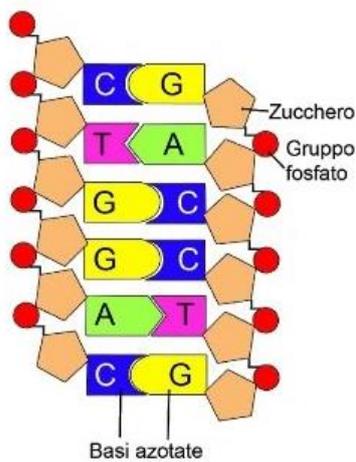
Ogni nucleotide è costituito da uno scheletro laterale, che ne permette il legame covalente con i nucleotidi adiacenti, e da una base azotata, che instaura legami idrogeno con la corrispondente base azotata presente sul filamento opposto.

Il composto formato da una base azotata legata allo zucchero è definito nucleoside

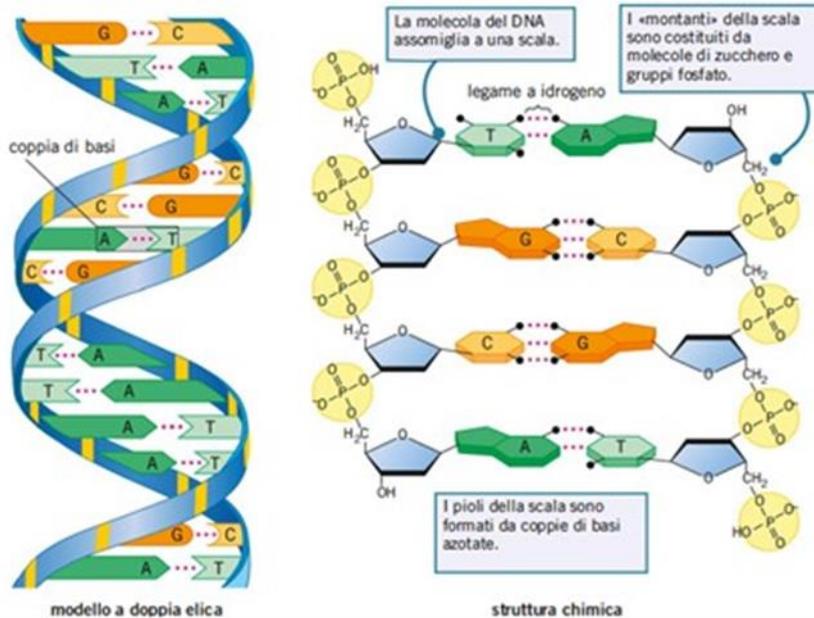
Un nucleotide è invece un nucleoside a cui sono legati uno o più gruppi fosfato.



Il DNA può essere più correttamente definito come **una doppia catena polinucleotidica (A,T,C,G), antiparallela, orientata, complementare, spiralizzata, informativa.**



L'ordine nella disposizione sequenziale dei nucleotidi costituisce l'informazione genetica, la quale è tradotta con il codice genetico negli amminoacidi corrispondenti.



Negli organismi viventi, il DNA non è quasi mai presente sotto forma di singolo filamento, ma come una coppia di filamenti saldamente associati tra loro che si intrecciano tra loro a formare una struttura definita doppia elica, una spirale destrorsa.

La struttura laterale del DNA è composta da unità ripetute ed alternate di gruppi fosfato e di 2-deossiribosio, uno zucchero pentoso (a cinque atomi di carbonio) che si lega ai fosfati adiacenti attraverso legami fosfodiesterici presso il terzo ed il quinto carbonio; in pratica, ogni molecola di fosfato forma un ponte molecolare collegando, attraverso legami fosfodiesterici, il carbonio in posizione 3' di una molecola di deossiribosio con quello in posizione 5' dello zucchero successivo.

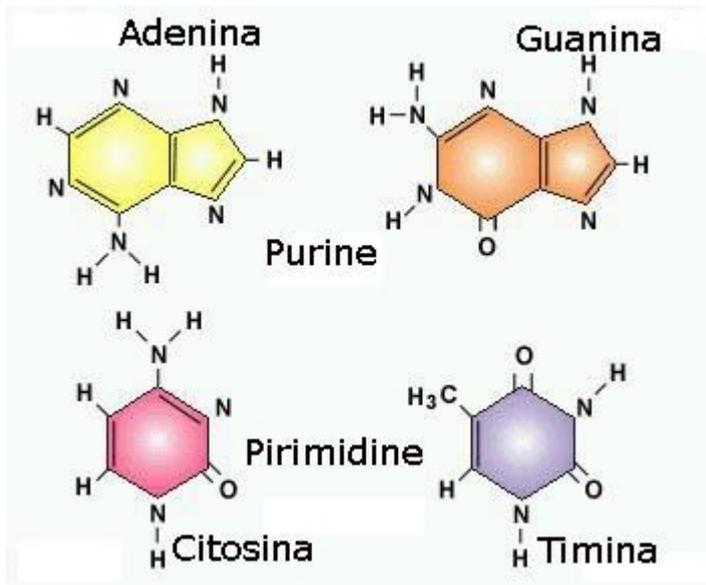
Conseguenza di questi legami asimmetrici è che ogni filamento di DNA ha un senso, determinato dalla direzione dei legami fosfodiesterici. Le basi azotate, invece, si uniscono in posizione 1' dello zucchero desossiribosio con legami N-glicosidici. In una doppia elica, il senso di un filamento è opposto a quello del filamento complementare.

Per tale motivo, i due filamenti che costituiscono una doppia elica sono detti antiparalleli. Le estremità asimmetriche di un filamento di DNA sono definite estremità 5' (cinque primo) ed estremità 3' (tre primo).

La doppia elica del DNA è stabilizzata dai legami idrogeno che si instaurano tra le basi azotate presenti sui due filamenti.

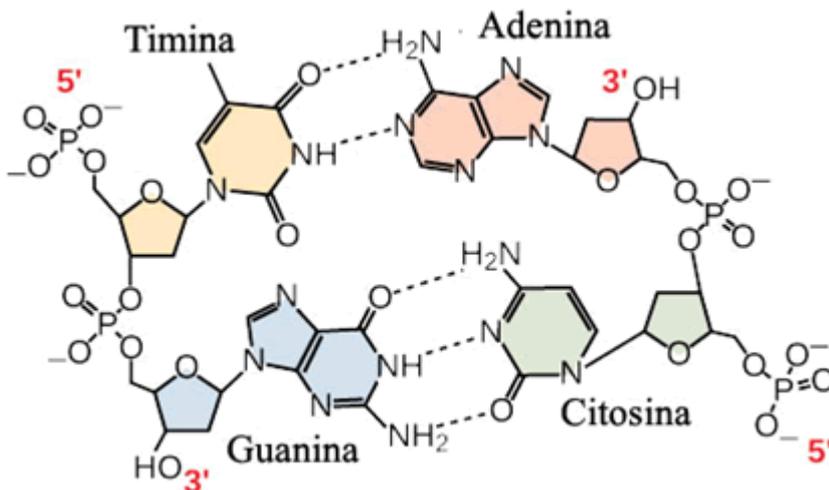
Le quattro basi che sono presenti nel DNA sono l'**adenina** (abbreviata con la lettera A), la **citocina** (C), la **guanina** (G) e la **timina** (T). Tutte e quattro le basi hanno struttura eterociclica, ma adenina e guanina sono, dal punto di vista strutturale, derivate della purina, e pertanto dette basi puriniche, mentre citosina e timina sono correlate alla pirimidina e dette basi pirimidiniche. Esiste una quinta base, di tipo pirimidinico, chiamata uracile (U), ma essa non è di norma presente nelle catene di DNA. L'uracile è altresì presente nei filamenti di RNA al posto della timina, dalla quale si differenzia per la mancanza di un gruppo metile.

Solo nel batteriofago PBS1 tale base può essere utilizzata all'interno del DNA.



Al contrario, è molto più frequente individuare la timina all'interno di molecole di RNA, a causa della metilazione enzimatica di diversi uracili. Questo evento avviene solitamente a carico di RNA con funzione strutturale o enzimatica (rRNA e tRNA).

Ogni tipo di base presente su un filamento forma un legame con la base posta sul filamento opposto. Tale evento è noto come appaiamento complementare. Le basi puriniche formano legami idrogeno con le basi pirimidiniche: **A può legare solo T** e **G può legare solo C**. L'associazione di due basi viene comunemente chiamata paio di basi ed è l'unità di misura maggiormente utilizzata per definire la lunghezza di una molecola di DNA. Dal momento che i legami idrogeno non sono covalenti, essi possono esser rotti e riuniti in modo relativamente semplice

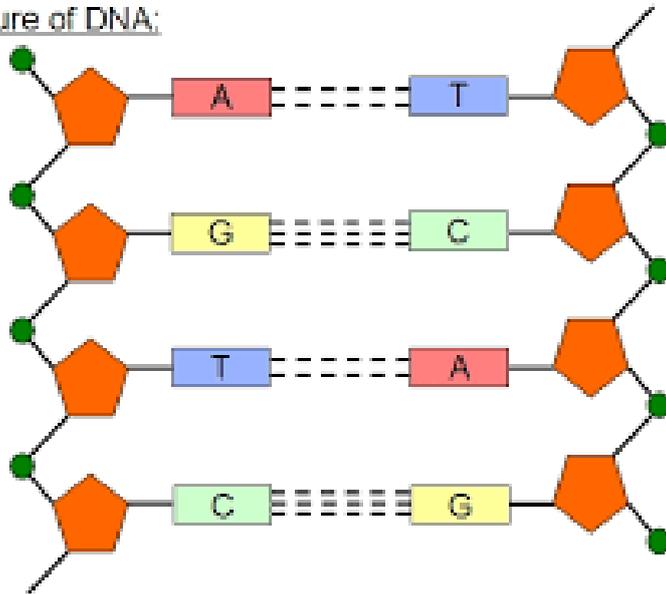


I due filamenti possono essere allontanati tra loro, come avviene per una cerniera, sia dalle alte temperature che da un'azione meccanica (come avviene durante la replicazione del DNA).

I due tipi di paia di basi formano un numero differente di legami idrogeno: **A e T ne formano due**, **G e C tre**. Per tale motivo, la stabilità del legame GC è decisamente maggiore di quello AT. Di conseguenza, la stabilità complessiva di una molecola di DNA è direttamente correlata alla frequenza di GC presenti nella molecola

stessa, nonché alla lunghezza dell'elica: una molecola di DNA è dunque tanto più stabile quanto più contiene GC ed è lunga.

Structure of DNA:



Un'altra conseguenza di tale evento è il fatto che le regioni di DNA che devono essere separate facilmente contengono un'elevata concentrazione di A e T, come avviene ad esempio per il Pribnow box dei promotori batterici, la cui sequenza è infatti TATAAT.

Il DNA può essere alterato dall'azione di numerosi agenti, genericamente definiti mutageni; è fondamentale notare però come una mutazione -ovverosia un cambiamento raro, casuale, che alteri la sequenza di basi azotate- non sia necessariamente un evento pernicioso ma anzi sia alla base dell'evoluzione: suddetta mutazione dovrà però farsi spazio nella fittissima rete cibernetica cellulare nonché nell'ambiente nel quale vive ed opera l'organismo vivente in questione; qualora vengano superati questi punti di restrizione (altamente selettivi vista la loro complessità intrinseca, la stragrande maggioranza delle mutazioni difatti si rivela non vantaggiosa od anche neutra), si avrà un organismo arricchito dalla mutazione. Tra gli agenti alteranti figurano ad esempio agenti ossidanti, agenti alchilanti ed anche radiazioni ad alta energia, come i raggi X e gli UV. Il tipo di danno causato al DNA dipende dal tipo di agente.

Agenti ossidanti come i radicali liberi o il perossido di idrogeno, invece, producono danni di tipo più eterogeneo, come modificazioni di basi (in particolare di guanine) o rotture del DNA a doppio filamento

Molti agenti devono il loro potere mutageno alla capacità di intercalarsi tra due basi azotate consecutive. Gli intercalanti sono tipicamente molecole planari e aromatiche, come la talidomide.

Perché un intercalante possa trovare posto tra le due basi, occorre che la doppia elica si apra e perda la sua conformazione standard. Tali modifiche strutturali inibiscono sia la trascrizione che la replicazione del DNA ed aumentano la possibilità di insorgenza di mutazioni. Per tale motivo, gli intercalanti sono considerati molecole cancerogene.

In ogni caso, proprio grazie alla loro capacità di inibire trascrizione e replicazione, tali molecole sono anche utilizzate in chemioterapia per inibire la rapida crescita delle cellule neoplastiche.

Disposizione del DNA

Negli eucarioti, il DNA si complessa all'interno del nucleo in strutture chiamate cromosomi. Negli altri organismi, privi di nucleo, esso può essere organizzato in cromosomi o meno (nei batteri è presente un'unica molecola di DNA circolare a doppia catena, mentre i virus possono avere genomi a DNA oppure ad RNA). All'interno dei cromosomi, le proteine della cromatina come gli istoni, le coesine e le condensine, organizzano il DNA e lo avvolgono in strutture ordinate.

La disposizione finale a cromosomi segue precise regole gerarchiche di impacchettamento. Nelle cellule, infatti, il doppio filamento di DNA non può essere disposto a casaccio, ma deve seguire precise regole di ordinamento. Tali accorgimenti si rivelano necessari perché la lunghezza dei filamenti di DNA è solitamente molto elevata e creerebbe seri problemi alla cellula ospite. Ad esempio, il cromosoma di *Escherichia coli*, il procarione più studiato nella storia della biomedicina, misura circa 1 mm. In una cellula lunga solo 2 μm , come quella di *E.coli*, la disposizione casuale di un cromosoma del genere potrebbe generare problemi. Se una molecola di questa lunghezza si disponesse casualmente, infatti, ci sarebbe bisogno di una cellula grande almeno 1000 volte tanto. Le modalità di impacchettamento sono differenti tra gli organismi procarioti e quelli eucarioti.

