SBOBINE BIOLOGIA MOLECOLARE

Prof. Di Bernardo

RAPPRESENTIAMOCI

Melania Di Maio
Annaclaudia Marino
Clea Barbarisi
Mosè Troiano

SBOBINE DI BIOLOGIA MOLECOLARE
A.A. 2020/2021
PROF. DI BERNARDO

LEZIONE I - 12 Novembre

STUDI SUGLI ACIDI NUCLEICI

La **Biologia molecolare** è una disciplina scientifica che ha permessi di colmare il divario fra la **Biochimica**, che applicava un approccio *riduzionistico*, cioè isolavano, purificavano ed analizzavano i vari componenti per poi unire tutte le analisi e comprendere il quadro generale, e la **Genetica**, caratterizzata da un approccio *olistico*, osservavano l'aspetto macroscopico della materia e ne traevano delle conclusioni, usavano per lo più piante per poter migliorare le specie per gli agricoltori, l'aspetto umano fu studiato successivamente da Mendel.

I primi esperimenti molecolari sono quelli che si riferiscono agli acidi nucleici.
Tutto inizia nel 1869 quando il chimico svizzero Miescher isolò dal nucleo di alcune cellule una sostanza di natura acida ricca di fosforo; non sapendo cosa avesse individuato battezzò questa sostanza "**nucleina**" data la sua localizzazione.
Circa 20 anni dopo fu denominata "**acido nucleico**" e infine, quando fu chiarita la sua composizione chimica, "**acido desossiribonucleico (o deossiribonucleico)**"

Nel corso della storia, ci sono state varie teorie su quale fosse la molecola depositaria dell'informazione; secondo Mendel, nel 1866, l'ereditarietà era controllata da fattori unitari chiamati "geni"; ma nel 1903 con la "Teoria cromosomica", mediante la citochimica, fu dimostrato che i cromosomi fossero composti da DNA e proteine, in proporzioni più o meno uguali. Ma non era ancora chiaro quale fosse la macromolecola che conteneva l'informazione genica, l'opinione prevalente era che il DNA avesse un ruolo strutturale, poiché pensarono che la sua quantità fosse variabile, mentre le proteine un ruolo informazionale, poiché più complesse in quanto costituite da 20 amminoacidi ("mattoncini") in grado di combinarsi nei modi più disparati su un numero illimitato di posti, mentre nel DNA sono possibili solo combinazioni di 4 elementi, cioè i nucleotidi; questa teoria si mantenne valida fino al 1940.

Per comprendere appieno in quale macromolecola è contenuta l'informazione genica, bisogna tener conto di determinate caratteristiche di cui deve essere dotato il materiale genetico:
1. Deve possedere, in forma stabile, l'INFORMAZIONE per la struttura, la funzione, lo sviluppo e la riproduzione delle cellule di un organismo.
2. Deve essere in grado di REPLICARE ACCURATAMENTE, in modo che le cellule della progenie siano dotate della stessa informazione genica della cellula parentale.
3. Deve essere in grado di andare incontro a CAMBIAMENTO, poiché senza variabilità (eventi di mutazione e ricombinazione) gli organismi non sarebbero in grado di mutare ed adattarsi e l'evoluzione non potrebbe avvenire.

Per il primo esperimento importante sull'individuazione della macromolecola informazionale, bisogna aspettare il 1928 quando **Griffith** scoprì l'esistenza del *PRINCIPIO TRASFORMANTE*:
egli studiò il ceppo patogeno di un batterio (Streptococcus Pneumoniae), uno pneumococco in grado di causare una polmonite letale negli animali; osservò che questi batteri potevano presentarsi in due forme:
- Patogeni, provvisti di capsula che chiamò "S" da smooth, poiché erano in grado di formare colonie di tipo liscio e possono presentarsi in 3 forme IS, IIS, IIIS (in base alla composizione della capsula polisaccaridica esterna);
- Non patogeni, sprovvisti di capsula che chiamò "R" da rough, poiché erano in grado di formare colonie di

tipo rugoso e anch'essi possono essere di 3 tipi. Questo fu individuato come ceppo benigno, poiché non avendo la capsula protettiva, vengono riconosciuti e distrutti dal sistema immunitario; questa situazione è apparsa in seguito ad una mutazione che fa avvenire il passaggio da IIS a IIR, ma può essere anche invertita con una retromutazione.

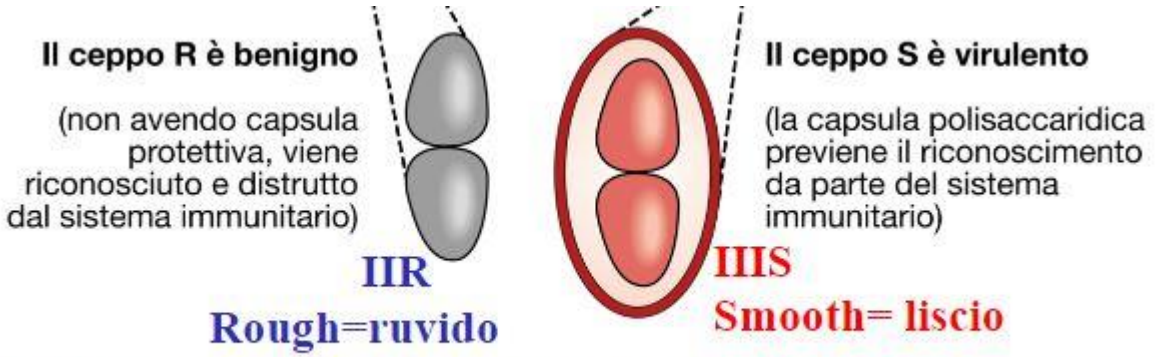


Figura 1.6 *Streptococcus pneumoniae*: il ceppo benigno R (*rough*, rugoso) e il ceppo virulento S (*smooth*, liscio).

Griffith osservò gli effetti di questo batterio sui topi:
- quelli infettati con batteri di tipo "S": morivano, e venivano ritrovati batteri di questo tipo durante l'autopsia;
- quelli infettati con batteri di tipo "R": sopravvivevano;
- quelli infettati con batteri "S" uccisi con il calore: riuscivano a sopravvivere;
- quelli infettati con una miscela di batteri "R" vivi ed "S" uccisi con il calore: morivano e durante l'autopsia veniva osservata la presenza di batteri di tipo "S" vivi.

Questo risultato inaspettato fece sospettare l'esistenza di qualcosa, nei batteri di tipo "S", che potesse essere trasmesso a quelli di tipo "R" e fosse in grado di modificare le caratteristiche geniche, in particolare introducendo la capacità di produrre la capsula tipica dei batteri virulenti.
Griffith chiamò questo processo "**Trasformazione Genica**" e la sostanza in grado di indurlo "**principio trasformante**", egli sostenne che fossero state le proteine.

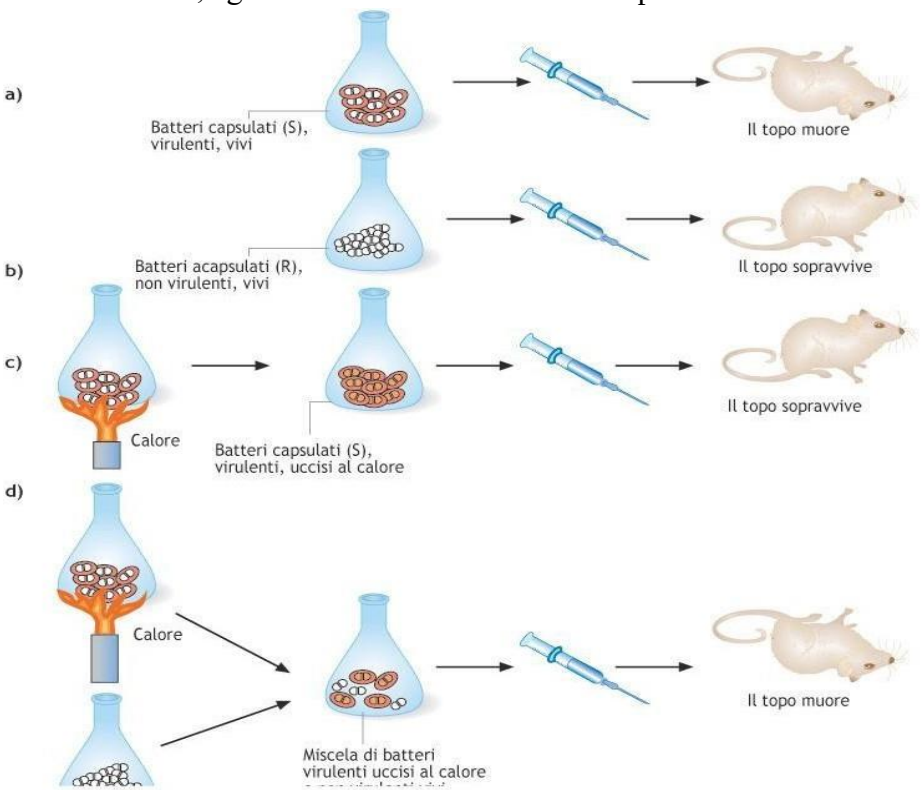
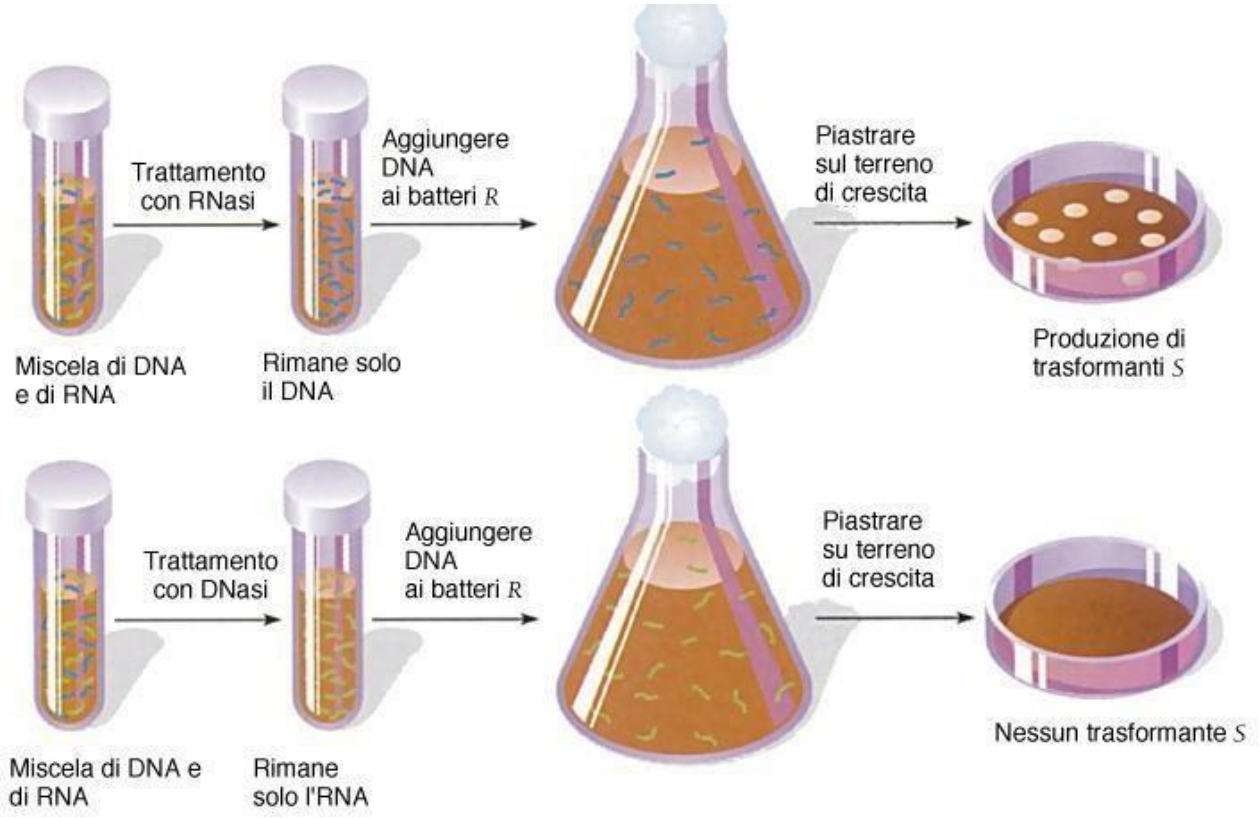


Figura 1.44 Esperimento di Griffith. Dimostrazione dell'esistenza del "principio trasformante". **(a)** L'iniezione di batteri S causa la morte del topo; **(b)** i batteri R sono innocui; **(c)** l'iniezione di batteri S uccisi con calore non ha effetto; **(d)** l'iniezione di una miscela di batteri S uccisi con calore e batteri R vivi risulta letale per il topo.

EdiSES
De Leo - Fasano - Ginelli
Biologia e Genetica II Ed.
EdiSES

Ma furono Avery, MacLeod e McCarty nel 1944 ad identificare nel DNA il principio trasformante (ovvero dimostrarono la natura non proteica del "principio trasformante").
Loro sfruttarono particolari enzimi, le nucleasi, che sono in grado di degradare gli acidi nucleici (DNA-asi e RNA-asi) e verificarono in provetta la capacità di poter trasformare ceppi IIR in IIIS:
presero il ceppo IIIS e lo sottoposero a lisi: da questa fase si ottennero lipidi, proteine, polisaccaridi e acidi nucleici; osservarono. effettuando esperimenti di piastrazione di tutte le componenti, che solo questi ultimi erano in grado di essere il principio trasformante; bisognava però capire quali acidi nucleici della miscela di DNA e RNA ottenuta.
Quindi trattarono la miscela prima con delle RNasi, ottenendo una provetta con solo DNA e successivamente la aggiunsero i batteri di tipo "R" e li piastrarono su un terreno di crescita; ripeterono lo stesso procedimento utilizzando come enzimi de DNasi, ottenendo una provetta con solo RNA. Alla fine dell'esperimento individuarono nella piastra contenente DNA la produzione di batteri trasformanti "S"; quindi il principio trasformante apparteneva al DNA. Ma in quegli anni molti studiosi erano contrariati verso questo tipo di esperimenti perché accusavano che comunque il DNA era ricoperto di proteine ed erano proprio quest'ultime (secondo le loro opinioni) ad essere il principio trasformante.



Il risultato definitivo si ebbe nel 1952 con gli esperimenti di **Hersey** e **Chase.**
Loro utilizzarono il fago T2, il quale è costituito essenzialmente da acido nucleico nella parte interna della testa (DNA) e proteine (parte superficiale) e marcarono differentemente questi due principali costituenti.
Usarono come marcatori delle molecole radioattive: Fosforo 32 (poiché presente solo nel DNA) e Zolfo 35 (poiché presente solo nelle proteine).
L'esperimento sfruttava secondo requisito del materiale genetico: cioè che esso deve essere replicato accuratamente.
Così i ricercatori prepararono due popolazioni di fagi, marcate in modi differenti: una marcata con lo Zolfo 35 e l'altra con Fosforo 32 e le misero in presenza di batteri intatti (Escherichia coli).

In questo modo riuscirono a seguire il destino delle proteine e del DNA: la prima popolazione andò ad infettare il batterio e si ottenne che il Fosforo 32 veniva trasmesso alla progenie; mentre la seconda popolazione non presentava nel pellet radioattività (ovvero lo Zolfo 35 non era presente nella progenie.
La conclusione logica fu: il DNA del fago entra nel batterio al momento dell'infezione; mentre il fatto che la radioattività, dovuta al Fosforo 32 la si ritrovava, successivamente, nelle particelle fagiche della progenie (cosa che non si verificava con lo Zolfo 35), dimostrava che il DNA era trasmesso di generazione in generazione.

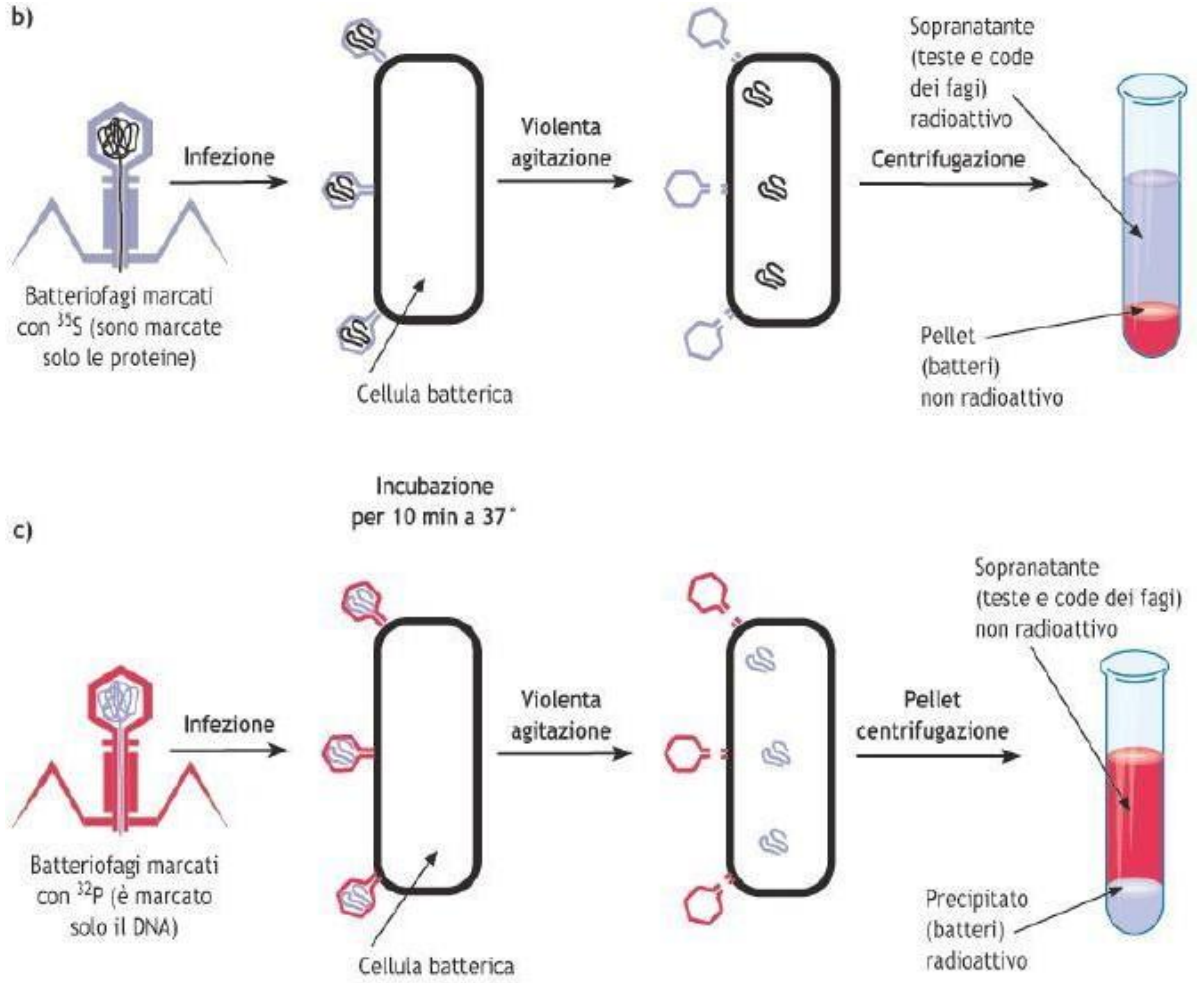


FIGURA 1.46 Esperimento di Hershey e Chase – dimostrazione che è il DNA del fago che viene inserito nel batterio nel momento dell'infezione. (a) Struttura di un fago della serie T4 e relativa immagine al ME; **(b)** infezione di batteri da parte di fagi che hanno le proteine del capside marcate con ^{35}S.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

Da qui si ottenne la dimostrazione definitiva che il DNA ha un ruolo informazionale, mentre le proteine hanno un ruolo strutturale.

LEZIONE II – 17 NOVEMBRE

STRUTTURA DEGLI ACIDI NUCLEICI

Ogni organismo possiede un genoma che contiene le informazioni biologiche necessarie alla costituzione e al mantenimento di sé stesso, il genoma umano si suddivide in:
NUCLEARE: poiché contenuto nel nucleo, costituito da 24 molecole lineari, chiamate cromosomi, di cui 22 vengono definiti autosomi e 2 sessuali, e contiene 20.000/25.000 geni, è lungo circa 3200Mb e può essere suddiviso in "sequenze di geni e geni correlati", lungo 1200Mb, e in "DNA intergenico", lungo 2000Mb. Dei 1200Mb solo 48Mb sono rappresentate dai geni veri e propri, le altre 1152Mb sono pseudogeni,