

Indice

DALLA SCOPERTA DEL DNA AL CODICE GENETICO E STRUTTURA DEGLI ACIDI NUCLEICI

1

CAPITOLO 1

Introduzione alla Biologia Molecolare

3

1.1 Che cos'è la Biologia Molecolare?

3

1.2 Il gruppo del fago e la nascita della Biologia Molecolare

4

1.3 Dalla scoperta del DNA alla dimostrazione del suo ruolo
come materiale genetico

6

Lecture di approfondimento e siti web

11

CAPITOLO 2

Struttura degli acidi nucleici

12

2.1 Struttura chimica degli acidi nucleici

12

2.2 Struttura fisica del DNA: la scoperta della struttura a doppia elica

17

2.3 Struttura fisica del DNA: i parametri strutturali della doppia elica

21

Stabilità della doppia elica di DNA in soluzione

23

Strutture alternative e strutture superiori degli acidi nucleici

25

2.4 Topologia del DNA e DNA topoisomerasi

33

DNA topoisomerasi

39

Finestra 2.1 - Varietà e classificazione delle DNA topoisomerasi

42

2.5 Struttura dell'RNA

43

Finestra 2.2 - L'RNA Tie Club

44

Finestra 2.3 - Struttura dell'RNA ed energia libera

47

Lecture di approfondimento

54

A

CAPITOLO 3**Codice genetico**

3.1	Il “dogma centrale” e prime ipotesi sul codice genetico	55
3.2	Decifrazione del codice genetico	56
3.3	Fasi di lettura e ORF	60
3.4	Mutazioni a soppressione e codice genetico	61
	Finestra 3.1 - Origine del nome <i>Amber suppressor</i>	62
3.5	Struttura del codice genetico e sue proprietà	63
3.6	Origine ed evoluzione del codice genetico	65
	Lecture di approfondimento e siti web	68

B**ORGANIZZAZIONE ED EVOLUZIONE
DI GENI, CROMOSOMI E GENOMI**

69

CAPITOLO 4**Impacchettamento del DNA genomico:
cromosomi e cromatina**

71

4.1	Impacchettamento dei genomi virali	72
4.2	Impacchettamento del genoma batterico	74
4.3	Organizzazione e impacchettamento del DNA eucariotico	75
4.4	Cromatina interfase e cromosomi mitotici	76
4.5	Organizzazioni atipiche di cromosomi e genomi	78
	Cromosomi a spazzola	78
	Cromosomi politenici	78
	Micronucleo e macronucleo dei ciliati	80
4.6	Centromeri	80
4.7	Telomeri	81
4.8	Nucleosomi e proprietà strutturali e funzionali della cromatina	84
	Posizionamento in fase (<i>phasing</i>) dei nucleosomi	90
	Il posizionamento di un nucleosoma può essere “intrinseco” o “estrinseco”	90
	Nucleosomi e replicazione del DNA	92
	Nucleosomi e trascrizione dei geni	92
	Modificazioni post-traduzionali degli istoni e modulazione dell’attività trascrizionale della cromatina	94
	Lecture di approfondimento	95

CAPITOLO 5**Genomi procariotici ed eucariotici**

96

5.1	Era genomica	96
5.2	Genomi procariotici	97
	Caratteristiche, struttura e plasticità dei genomi procariotici	97
	Contenuto genico e composizione in basi dei genomi procariotici	99

Geni non codificanti proteine ed elementi mobili nei genomi procariotici	100
Applicazioni della Genomica microbica	101
5.3 Genomi eucariotici	102
Struttura e organizzazione dei genomi eucariotici	102
Caratteristiche composizionali dei genomi eucariotici	103
Contenuto genico dei genomi eucariotici	104
Caratteristiche dei geni eucariotici	105
Ruolo degli introni nell'evoluzione dei geni eucariotici	106
Pseudogeni	108
Sequenze ripetute dei genomi eucariotici	110
DNA satellite o altamente ripetitivo	111
DNA mediamente ripetitivo: microsattelliti e minisattelliti	113
Finestra 5.1 - Il test del DNA	114
Sequenze di DNA ripetitivo intersperse nel genoma	116
Duplicazioni segmentali	119
Famiglie geniche	119
Geni reiterati ed evoluzione parallela	121
5.4 Genoma mitocondriale	123
Finestra 5.2 - Patologie mitocondriali	127
5.5 Genoma dei cloroplasti	129
5.6 Genoma dei virus	130
Lecture di approfondimento e siti web	130

REPLICAZIONE E MANTENIMENTO DEL GENOMA

131

C

CAPITOLO 6

Replicazione del DNA

133

6.1 Replicazione semiconservativa del DNA	134
L'esperienza di Meselson e Stahl	134
6.2 Modello del replicone	136
6.3 Identificazione delle origini di replicazione	138
Origine di replicazione di <i>Escherichia coli</i>	138
Origini di replicazione negli eucarioti	140
ARS del lievito <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	143
Origini precoci e origini tardive: influenza della struttura del cromosoma	144
Finestra 6.1 - Mappatura fisica delle origini di replicazione	146
6.4 Meccanismo della replicazione del DNA nei procarioti	147
Isolamento di mutanti letali-condizionali di <i>Escherichia coli</i> alterati nella replicazione del DNA	147
"Replisoma" di <i>Escherichia coli</i>	148
Finestra 6.2 - Isolamento di mutazioni temperatura-sensibili in <i>Escherichia coli</i>	148
Scoperta della DNA polimerasi e sue proprietà biochimiche	150

■ Finestra 6.3 - In <i>Escherichia coli</i> non tutte le DNA polimerasi sono coinvolte nella replicazione del DNA	151
Fedeltà di replicazione del DNA	152
Forcella di replicazione: sintesi del filamento continuo e del filamento discontinuo	154
Innesco della sintesi di DNA	154
Saggi di complementazione <i>in vitro</i>	156
Proteine replicative di <i>Escherichia coli</i>	157
■ Finestra 6.4 - Purificazione di una proteina e saggio di complementazione <i>in vitro</i>	158
■ Finestra 6.5 - Modalità di generazione dell'estremità 3'OH richiesta come innesco dalle DNA polimerasi	162
6.5 Meccanismo della replicazione del DNA negli eucarioti	164
Isolamento di proteine replicative negli eucarioti	164
Sistemi di ricostituzione <i>in vitro</i> del processo di replicazione	164
■ Finestra 6.6 - Replicazione del DNA del virus SV40 e proteine umane richieste in tale processo	165
Sintesi di DNA translesione	168
6.6 Replicazione dei telomeri nei cromosomi lineari degli eucarioti	169
Replicazione del DNA nella sua struttura cromatinica	172
6.7 Controllo della replicazione del DNA durante il ciclo cellulare	173
Aspetti generali del ciclo cellulare	173
Motore del ciclo cellulare	175
Controllo della replicazione del DNA durante il ciclo cellulare	177
Letture di approfondimento	179
CAPITOLO 7	
Riparazione del DNA	180
7.1 Mutazioni	180
7.2 Sistemi di riparazione del DNA	183
■ Finestra 7.1 - I meccanismi di riparazione sono funzionalmente conservati in tutti gli organismi viventi, dai procarioti agli eucarioti	184
Riparazione per escissione delle basi (BER)	186
Riparazione per escissione di nucleotidi (NER)	188
Riparazione di errori replicativi (MMR)	191
Meccanismi di tolleranza al danno (PRR)	191
Riparazione di rotture su entrambi i filamenti del DNA	193
7.3 Risposta cellulare a danni sul DNA e connessioni tra riparazione e ciclo cellulare	196
Letture di approfondimento	199
CAPITOLO 8	
Ricombinazione	200
8.1 Introduzione e ricombinazione in meiosi	200

8.2	Ricombinazione omologa o generalizzata	201
	■ Finestra 8.1 - Conversione genica	204
	Ricombinazione sito-specifica	205
	■ Finestra 8.2 - Proprietà e ciclo vitale del batteriofago lambda	206
8.3	Trasposizione	208
	■ Finestra 8.3 - I retrovirus	210
	Letture di approfondimento	216

TRASCRIZIONE E SUE REGOLAZIONI 217

CAPITOLO 9

Trascrizione nei procarioti 219

9.1	Unità di trascrizione	220
9.2	Le tre fasi della trascrizione	221
9.3	Struttura delle RNA polimerasi	224
9.4	Inizio della trascrizione nei procarioti	226
	Promotori e fattore sigma	228
	Diversi fattori sigma controllano promotori diversi	229
	■ Finestra 9.1 - Interazioni del fattore σ e dei suoi domini con l'RNA polimerasi e con il promotore	230
9.5	Distacco della RNA polimerasi dal promotore e allungamento dell'RNA	232
	Topologia e trascrizione	233
9.6	Terminazione della trascrizione nei procarioti	234
	Terminatori intrinseci	234
	Terminatori Rho-dipendenti	236
	Letture di approfondimento	238

CAPITOLO 10

Regolazione della trascrizione nei procarioti 239

10.1	Elementi di controllo nella trascrizione dei procarioti	239
	Attivatori trascrizionali, repressori e operatori	239
	Organizzazione degli operoni procariotici	240
10.2	Operone <i>lac</i>	241
	Controllo negativo dell'operone <i>lac</i>	241
	■ Finestra 10.1 - Gli esperimenti di Jacob e Monod	242
	Repressore Lac e sue interazioni con il promotore	246
	Controllo positivo dell'operone <i>lac</i> e ruolo di CAP	248
	Interazione della regione promotore/operatore con CAP, repressore Lac e RNA polimerasi	252
10.3	Operone del triptofano	253
	■ Finestra 10.2 - Operoni inducibili e reprimibili, controlli negativi e controlli positivi	254
	Regolazioni a livello di terminazione della trascrizione	256
10.4	Controllo dell'espressione genica nel fago lambda	258

D

I due cicli vitali del fago lambda: ciclo litico e ciclo lisogenico	259
Ciclo litico	261
Ciclo lisogenico	263
Regione di controllo del fago	263
Struttura del repressore e di Cro	264
CI e Cro si legano con diversa affinità alla regione di controllo	266
Il repressore CI e Cro controllano in modo mutuamente esclusivo la trascrizione nella regione di controllo del fago lambda	267
Legame cooperativo del repressore al DNA	268
Induzione del ciclo litico di lambda in un batterio lisogenico	270
Ruolo dell'attivatore trascrizionale CII	271
■ Finestra 10.3 - Identificazione di mutazioni nella regione di controllo	271
Controllo dell'integrazione e dell'escissione del fago nel cromosoma di <i>Escherichia coli</i>	273
Letture di approfondimento	275
CAPITOLO 11	
Trascrizione e regolazione negli eucarioti	276
11.1 Tre sistemi di trascrizione nel nucleo	277
11.2 Promotore dei geni per gli rRNA e fattori che regolano la trascrizione della RNA polimerasi I	279
11.3 RNA polimerasi III: promotori di Pol III interni ed esterni e suoi fattori di trascrizione	282
11.4 RNA polimerasi II: struttura del promotore minimo di Pol II	282
Fattori basali di Pol II e assemblaggio del complesso d'inizio	285
Ruolo del "mediatore" nella trascrizione di Pol II	287
■ Finestra 11.1 - Il "mediatore" e la sua scoperta	289
Struttura di Pol II e reazione di allungamento nella sintesi dell'RNA	290
11.5 Regolazione	292
Struttura modulare dei promotori eucariotici	292
11.6 Struttura modulare e domini dei fattori di trascrizione (trans-attivatori)	297
11.7 Domini funzionali dei transattivatori:	
domini di legame al DNA	299
Elica-giro-elica (<i>helix-turn-helix</i>) e omeodominio	300
Dominio a dita di zinco (<i>zinc finger</i>)	301
Domini a cerniere di leucina (<i>leucine zipper</i>)	302
Dominio elica-ansa-elica (<i>helix-loop-helix</i>)	303
Controllo combinatoriale della trascrizione	304
Reclutamento del complesso di trascrizione	307
Attivatori e cromatina	307
■ Finestra 11.2 - I fattori di trascrizione agiscono attraverso una vasta rete di interazioni	308
Attivazione e segnali	311
I recettori degli ormoni steroidei	311
Risposta all'AMP ciclico e fattore CREB	311
Fattore trascrizionale NF-kB	312
Letture di approfondimento	313

PROCESSAMENTO E MATURAZIONE DELL'RNA 315

CAPITOLO 12

Maturazione mediante tagli endonucleolitici ed esonucleolitici 317

12.1 Processamento degli rRNA nei procarioti e negli eucarioti 317

■ **Finestra 12.1** - Le nucleasi 318

12.2 Processamento dei tRNA nei procarioti e negli eucarioti 320

12.3 Ribozimi autocatalitici a "testa di martello" 321

12.4 Maturazione dei microRNA 323

Lecture di approfondimento 324

CAPITOLO 13

Modificazioni chimiche dell'RNA 325

13.1 Modificazioni chimiche delle basi e del ribosio 325

Modificazioni chimiche delle basi nei tRNA procariotici ed eucariotici 325

Modificazioni chimiche degli rRNA eucariotici 327

■ **Finestra 13.1** - Il nucleolo 327

13.2 Aggiunta del "cap" agli mRNA eucariotici 329

13.3 Poliadenilazione e terminazione della trascrizione degli mRNA eucariotici 332

Funzioni della coda di poli(A) 335

Turnover della coda di poli(A) 335

Poliadenilazione nei procarioti e negli organelli 335

Lecture di approfondimento 336

CAPITOLO 14

Splicing ed editing 337

14.1 Splicing 337

Geni "discontinui" e splicing 337

Meccanismo dello splicing nucleare 340

■ **Finestra 14.1** - Splicing e patologie 346

Autosplicing: introni di gruppo I e II 347

Splicing del tRNA 349

■ **Finestra 14.2** - L'origine della vita e il mondo a RNA 350

Trans-splicing 351

Accoppiamento tra splicing e trascrizione 353

Splicing alternativo 354

Regolazione dello splicing 356

14.2 Editing 359

Editing per conversione di basi 360

Editing inserzionale 363

14.3 Traslocazione nucleo-citoplasmatica degli RNA 366

Lecture di approfondimento 367

E

F

TRADUZIONE E SUE REGOLAZIONI 369**CAPITOLO 15****Apparato di traduzione e suoi componenti** 371

- 15.1 Ribosoma 371
 rRNA 373
 r-proteine 373
 Struttura tridimensionale 376
 Ribosoma come ribozima 380
- 15.2 RNA transfer (tRNA, RNA di trasferimento) e amminoacil-tRNA sintetasi 381
 ■ **Finestra 15.1** - Quanti amminoacidi sono codificati dal codice genetico? 383
- 15.3 RNA messaggero (mRNA) 387
 ■ **Finestra 15.2** - La coda di poli(A) come maniglia per purificare l'mRNA 388
- Letture di approfondimento** 389

CAPITOLO 16**Meccanismo della sintesi proteica** 390

- 16.1 Inizio nei procarioti 392
 tRNA di inizio 392
 Riconoscimento del sito di inizio sull'mRNA 393
 Fattori di inizio nei procarioti 394
 Processo di inizio della traduzione nei procarioti 395
- 16.2 Inizio negli eucarioti 396
 Fattori di inizio negli eucarioti 397
 Processo di inizio della traduzione negli eucarioti 398
 Meccanismo di inizio alternativo cap-indipendente negli eucarioti 402
- 16.3 Allungamento 402
 ■ **Finestra 16.1** - Mimetismo molecolare dei fattori che interagiscono con il sito A del ribosoma 407
- 16.4 Terminazione 408
- 16.5 Bilancio energetico 408
- 16.6 Velocità e accuratezza della sintesi proteica 410
 ■ **Finestra 16.2** - Sistemi di sintesi proteica *in vitro* 410
- 16.7 Traduzione a livello strutturale 411
 ■ **Finestra 16.3** - Inibitori della sintesi proteica e antibiotici 412
- Letture di approfondimento** 414

CAPITOLO 17**Regolazione della traduzione** 415

- 17.1 Regolazione generale della traduzione 415
 "Risposta stringente" nei procarioti 415
 Controllo generale della traduzione negli eucarioti 416
- 17.2 Regolazioni traduzionali di geni specifici 417
 Controlli traduzionali autogeni 418

Controlli traduzionali non autogeni	420
17.3 Regolazione della stabilità e degradazione degli mRNA	424
Degradazione dell'mRNA nei procarioti	424
Degradazione dell'mRNA nelle cellule eucariotiche	424
Meccanismi di "controllo qualità" dell'mRNA	427
17.4 Controllo della traduzione e della stabilità degli mRNA da parte di RNA regolatori	431
sRNA procariotici	431
Riboswitch	433
MicroRNA	434
Finestra 17.1 - Patologie dell'apparato di traduzione	434
Finestra 17.2 - RNA non codificanti (ncRNA), lunghi RNA non codificanti (lncRNA) e reti (network) regolative del trascrittoma	436
17.5 Trasporto e localizzazione degli mRNA	437
Localizzazione dell'mRNA di ASH1 in lievito	439
Localizzazione di mRNA nell'uovo di <i>Drosophila</i>	439
Localizzazione di mRNA nei dendriti neuronali	441
17.6 Granuli citoplasmatici di RNA	442
Lecture di approfondimento	443

ALTRI LIVELLI DI REGOLAZIONE: MODIFICAZIONI GENOMICHE, EPIGENETICHE E POST-TRADUZIONALI

445

CAPITOLO 18

Riarrangiamenti genomici come meccanismi di regolazione dell'espressione genica

447

18.1 Cambiamenti quantitativi delle sequenze genomiche	448
Amplificazione genica	448
Politenizzazione	449
Diminuzione genica, cromatinica e cromosomica	450
Micro- e macronucleolo dei protozoi ciliati	451
18.2 Riarrangiamenti delle sequenze di DNA	452
Cambiamento della specificità d'ospite del fago Mu	452
Variazione di fase di <i>Salmonella</i>	454
Cambiamento del tipo sessuale in lievito (locus <i>MAT</i>)	455
Variazione antigenica in <i>Trypanosoma</i> (geni <i>VSG</i>)	456
Ricombinazione V(D)J nei vertebrati	458

Lecture di approfondimento 459

CAPITOLO 19

Regolazioni epigenetiche: metilazione del DNA e rimodellamento della cromatina

460

19.1 Metilazione del DNA ed espressione genica	460
Metilazione del DNA genomico nei mammiferi	461

G

■ Finestra 19.1 - Epigenesi, epigenetica e regolazioni epigenetiche	461
■ Finestra 19.2 - Identificazione delle CpG metilate nel DNA genomico	462
Isole CpG	463
Metilazione delle CpG e trascrizione	465
Imprinting genetico	465
■ Finestra 19.3 - Regolazioni epigenetiche e patologia	467
19.2 Rimodellamento della cromatina	467
Modificazioni post-traduzionali degli istoni	468
Complessi di rimodellamento (rimodellatori) ATP-dipendenti	469
Sostituzione di varianti istoniche	471
Letture di approfondimento	471
CAPITOLO 20	
Modificazioni e regolazioni post-traduzionali di proteine	472
20.1 Stabilità e processamento di proteine	473
20.2 Ubiquitinazione di proteine	475
20.3 Sumoilazione di proteine	478
20.4 Fosforilazione e defosforilazione di proteine	480
20.5 Acetilazione di proteine	485
20.6 Metilazione di proteine	486
20.7 Glicosilazione e modificazioni lipidiche di proteine	487
Letture di approfondimento	490

H

APPROCCI, TECNICHE E MODELLI IN BIOLOGIA MOLECOLARE	491
CAPITOLO 21	
Tecniche della Biologia Molecolare	493
21.1 Tecniche spettrofotometriche per l'analisi della denaturazione e riassociazione del DNA	493
Spettro di assorbimento	493
Denaturazione del DNA, T_m	494
Riassociazione del DNA, cinetica di riassociazione, Cot	495
21.2 Uso di sonde di DNA per l'identificazione e analisi di sequenze nucleotidiche	498
■ Finestra 21.1 - Marcatura del DNA con atomi radioattivi	499
Ibridazione a saturazione	499
Ibridazione <i>in situ</i> o citologica	499
Southern e Northern blot	500
Ibridazione su colonia o su placca	501
Microarray (o microchip)	501
21.3 Ultracentrifugazione	503
Sedimentazione in gradienti di saccarosio	504
Gradienti di densità di cloruro di cesio (CsCl)	506

■ Finestra 21.2 - Ultracentrifuga analitica	508
21.4 Tecnologie di base per l'isolamento e la manipolazione di geni	508
■ Finestra 21.3 - Utilizzo dell'elettroforesi per separare molecole di acidi nucleici e proteine	510
Enzimi di restrizione e DNA ligasi	512
Vettori di clonaggio	515
Plasmidi	515
Trasformazione di cellule di <i>Escherichia coli</i> e selezione dei trasformanti	517
Plasmidi della serie pUC: selezione bianco o blu	518
Vettori di espressione e produzione di proteine ricombinanti	518
Batteriofago lambda come vettore di clonaggio	524
Cosmidi	525
Vettori per il clonaggio e l'espressione in cellule eucariotiche	525
Vettori di lievito	527
Vettori per il trasferimento genetico in cellule animali	530
Trasferimento di DNA nei vegetali	531
21.5 Banche di DNA	532
Banche genomiche	532
Rappresentatività di una libreria di DNA genomico	534
Librerie di cDNA	535
Identificazione del clone contenente il DNA d'interesse da una libreria	537
21.6 PCR: reazione a catena della polimerasi	543
21.7 Determinazione della sequenza nucleotidica del DNA	546
21.8 Piattaforme di sequenziamento di nuova generazione	550
21.9 Valutazione dell'espressione di un gene	558
■ Finestra 21.4 - Il Northern blot e il Western blot	559
21.10 Inibizione dell'espressione di geni specifici: RNA antisenso e interferenza da RNA	561
■ Finestra 21.5 - Mutagenesi sito-specifica o mutagenesi mirata	562
21.11 Interazioni tra macromolecole biologiche	564
Interazioni proteina-DNA	564
Interazioni proteina-proteina	569
Lecture di approfondimento	577
CAPITOLO 22	
Bioinformatica e Genomica	578
22.1 Sequenziamento e assemblaggio di genomi completi	578
22.2 Sequenziamento del trascrittoma	582
22.3 Identificazione e annotazione di geni	586
22.4 Confronto e allineamento di sequenze	587
22.5 Identificazione e annotazione di regioni regolatorie e caratterizzazione delle proprietà epigenetiche della cromatina	589
■ Finestra 22.1 - Rappresentazione di motivi regolativi mediante il sequence logo	591
22.6 Annotazione delle sequenze proteiche	591

22.7	Banche dati e browser genomici	592
22.8	Evoluzione molecolare	594
	Indirizzi web delle principali risorse bioinformatiche	596
CAPITOLO 23		
	Organismi modello	597
23.1	Il lievito <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	599
23.2	Il moscerino della frutta <i>Drosophila melanogaster</i>	605
23.3	Il nematode <i>Caenorhabditis elegans</i>	609
23.4	L'anfibio <i>Xenopus laevis</i> e il suo successore <i>Xenopus tropicalis</i>	611
23.5	Il pesce <i>Danio rerio</i> o "zebrafish"	614
23.6	Il topo comune <i>Mus musculus</i>	617
23.7	La pianta <i>Arabidopsis thaliana</i>	623
	Lecture di approfondimento	624
	Indice analitico	625