

CENNI DI BIOLOGIA MOLECOLARE

All'interno dei microrganismi sono presenti strutture chiamate “**elementi genetici**” contenenti **materiale genetico**

DNA
RNA (alcuni virus)

Il **genoma** è l'insieme di tutti i geni contenuti in una cellula o in un virus.

Il **cromosoma**, solitamente di **forma circolare**, è il principale elemento genetico della cellula.

Borrelia burgdorferi → lineare
Streptomyces coelicolor → lineare

...

La maggior parte dei procarioti contiene un **singolo cromosoma**. Alcuni possono avere un genoma distribuito in più di un cromosoma.

Rhodobacter spaeroides (Bacteria) → 2
Halobacterium sp. NRC1 (Archaea) → 3

...

Esistono microrganismi con più copie del cromosoma generate per duplicazione di un singolo genoma

Tab. 7.1 Tipi di elementi genetici		
Organismo	Elemento	Descrizione
Procarioti	Cromosoma	DNA a doppio filamento, estremamente lungo, generalmente circolare
	Plasmide	DNA a doppio filamento, extracromosomico, perlopiù di piccole dimensioni e generalmente circolare
Eucarioti	Cromosoma	DNA a doppio filamento, estremamente lungo, lineare
	Plasmide ^a	DNA a doppio filamento, extracromosomico, perlopiù di piccole dimensioni, circolare o lineare
Tutti gli organismi	Elemento trasponibile	DNA a doppio filamento, sempre inserito all'interno di un'altra molecola di DNA
Mitocondrio o cloroplasto	Cromosoma	DNA di dimensioni intermedie, generalmente circolare
Virus	Genoma	DNA o RNA a singolo o doppio filamento

^a Tra gli eucarioti i plasmidi sono piuttosto rari.

a)

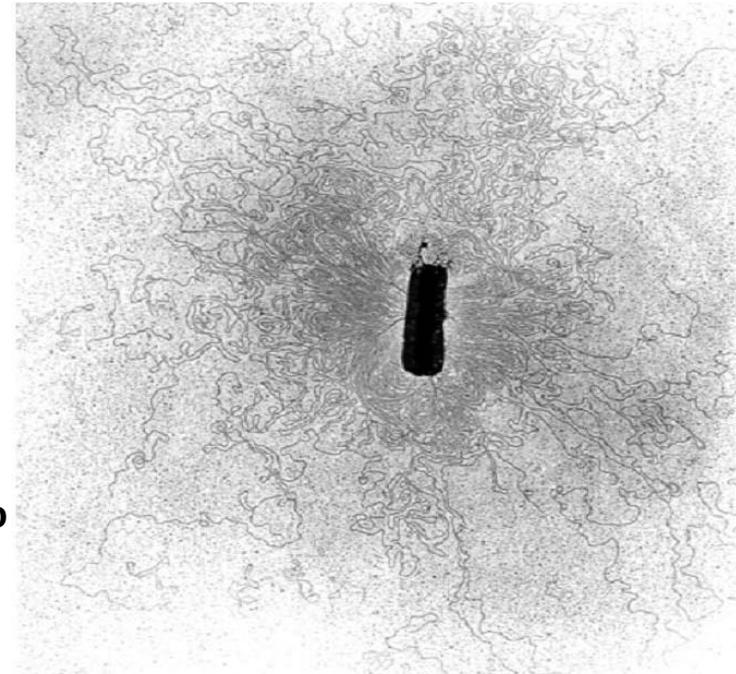


b)



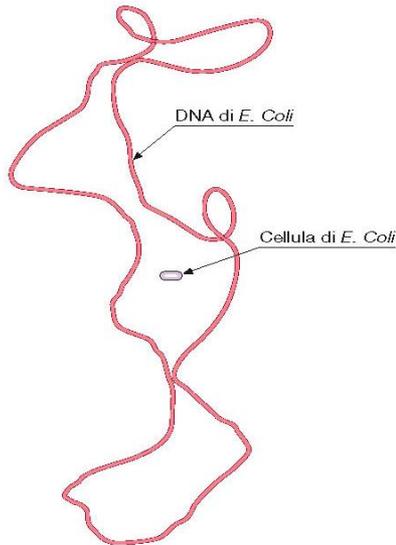
Nucleoide in cellule procariotiche (*S. pyogenes* ed *E. coli*)

Aspetto del cromosoma batterico dopo lisi della cellula di *E. coli*



Lunghezza genoma *E. coli* → ~1,58 mm

Lunghezza *E. coli* → ~2 μm



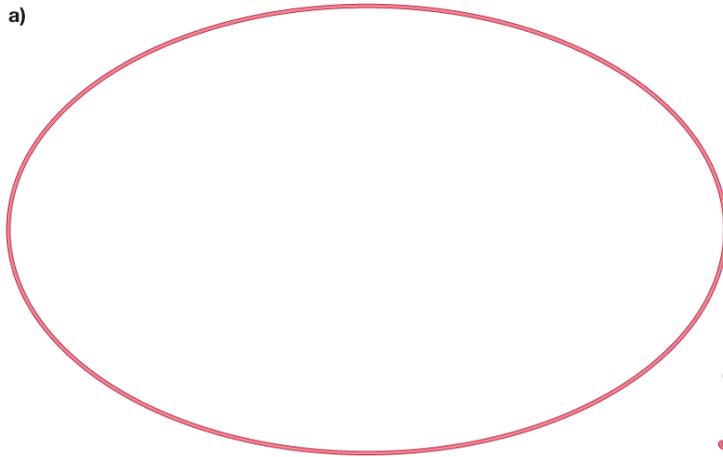
Aspetto del cromosoma batterico non compattato (molecola continua di DNA)

Nei procarioti la compattazione del cromosoma avviene in seguito all'interazione del DNA con

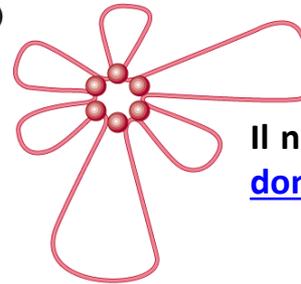
- **NAP**, *nucleoid-associated proteins* (una classe eterogenea di proteine a basso peso molecolare, *histone-like proteins*)
- **SMC**, *structural maintenance of chromosome proteins* (proteine presenti anche negli eucarioti)

Durante la **fase stazionaria** il cromosoma assume un aspetto più compatto rispetto alla **fase esponenziale**.
Le condizioni ambientali possono influire sullo stato topologico del cromosoma.

a)



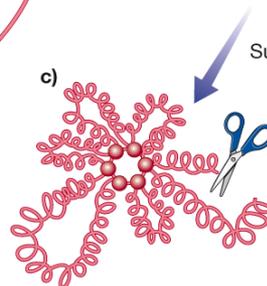
b)



Il nucleotide (cromosoma) è organizzato in domini topologici indipendenti

Superavvolgimento

c)



La rottura dei filamenti in uno dei domini non induce il rilassamento negli altri domini

Elementi genetici extracromosomici rinvenibili nella cellula procariotica

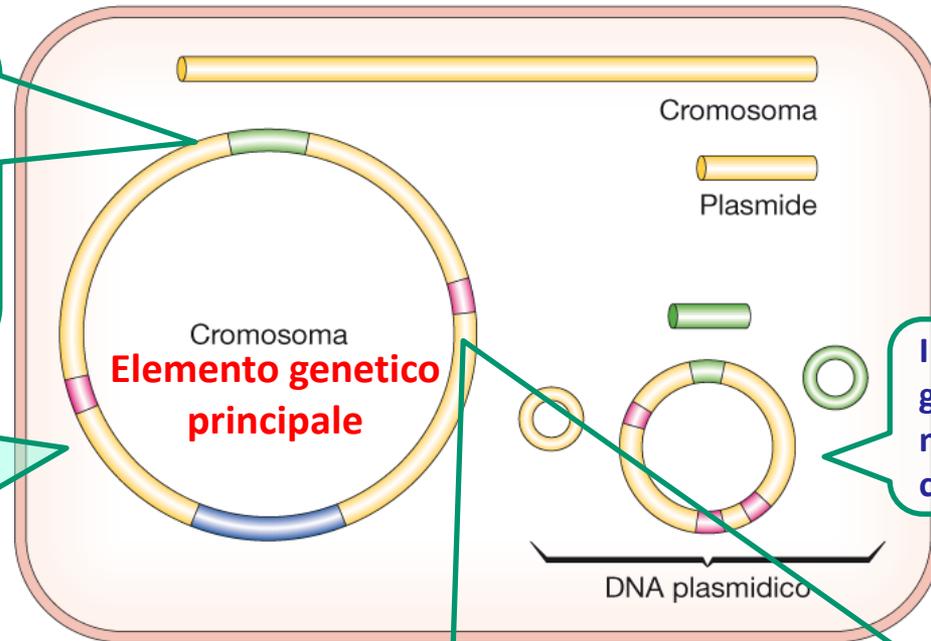
- Genomi virali
- Plasmidi
- Elementi trasponibili
- (Genomi di organelli)

Diversamente dai virus, i plasmidi non arrecano danni alla cellula ospite e non hanno vita extracellulare. Normalmente non sono essenziali per la crescita del batterio. Si replicano indipendentemente dal cromosoma.

■ Elementi virali ■ Elementi plasmidici ■ Elementi trasponibili

Genoma virale, a DNA o RNA (a singolo e doppio filamento), che controlla la replicazione del virus ed il trasferimento da cellula a cellula; contiene geni essenziali per il virus e non per la cellula ospite.

Il **CROMOSOMA** è il depositario dei geni per le funzioni essenziali della cellula (*geni housekeeping*)



I **plasmidi** portano geni non essenziali, ma utili in alcune condizioni

Elementi trasponibili

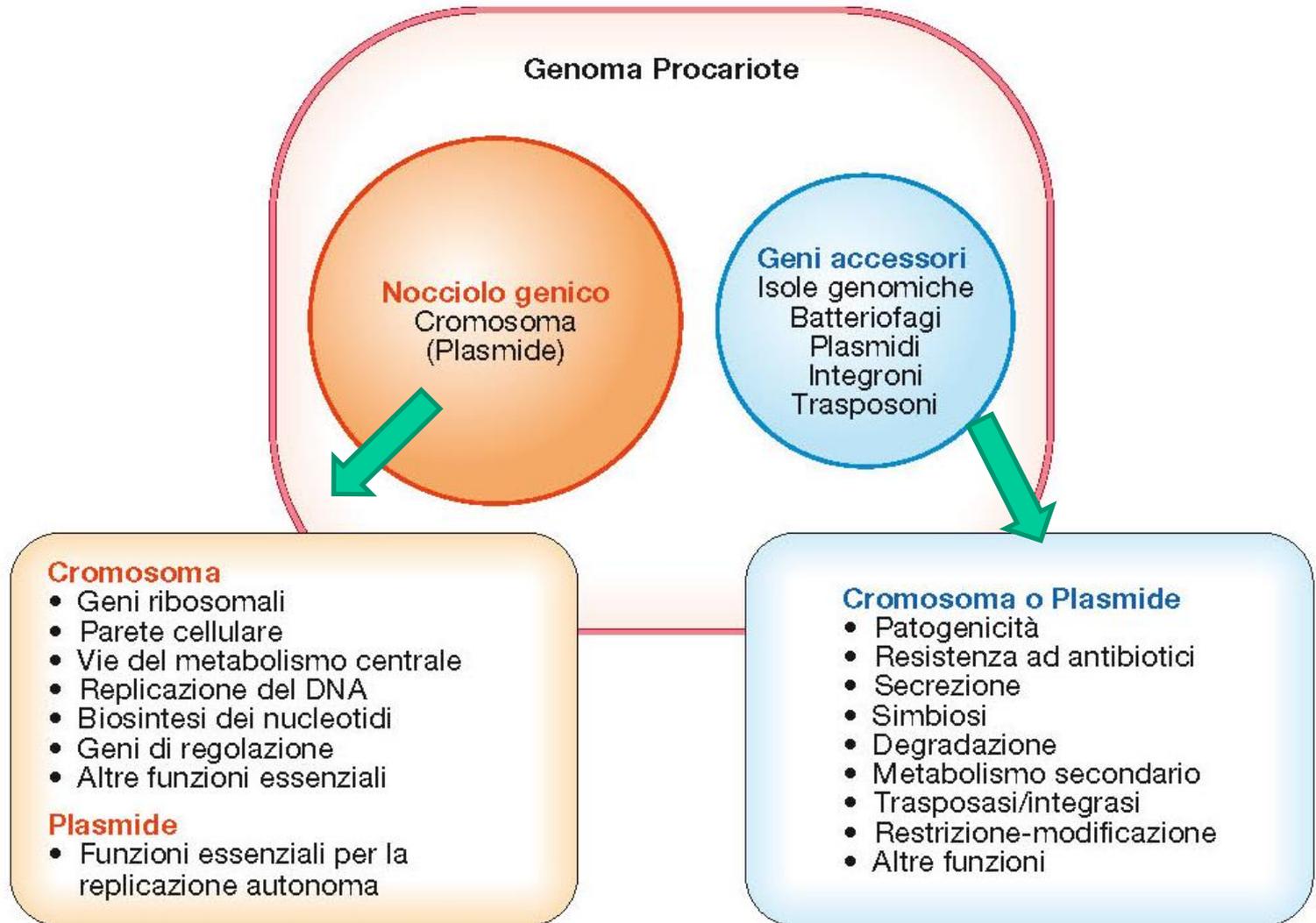
- Molecole di DNA che, all'interno del genoma eucariotico o procariotico, possono spostarsi da un punto all'altro della stessa molecola o di molecole diverse.
- Non hanno origine di replicazione autonoma, ma si replicano come parte della molecola di DNA ospite. Esistono solo come molecole integrate nei cromosomi, nei plasmidi, nei genomi virali.
- Contribuiscono alla variabilità genetica.

Sequenze d'inserzione (IS) → contengono solo l'informazione genetica per la propria trasposizione.

Trasposoni (Tn) → oltre ai geni per la trasposizione portano altri geni (es. resistenza antibiotici).

Alcuni virus (profagi o batteriofagi trasponibili).

Sia il cromosoma che i plasmidi contengono **geni essenziali** (nocciolo genico) e **geni accessori**

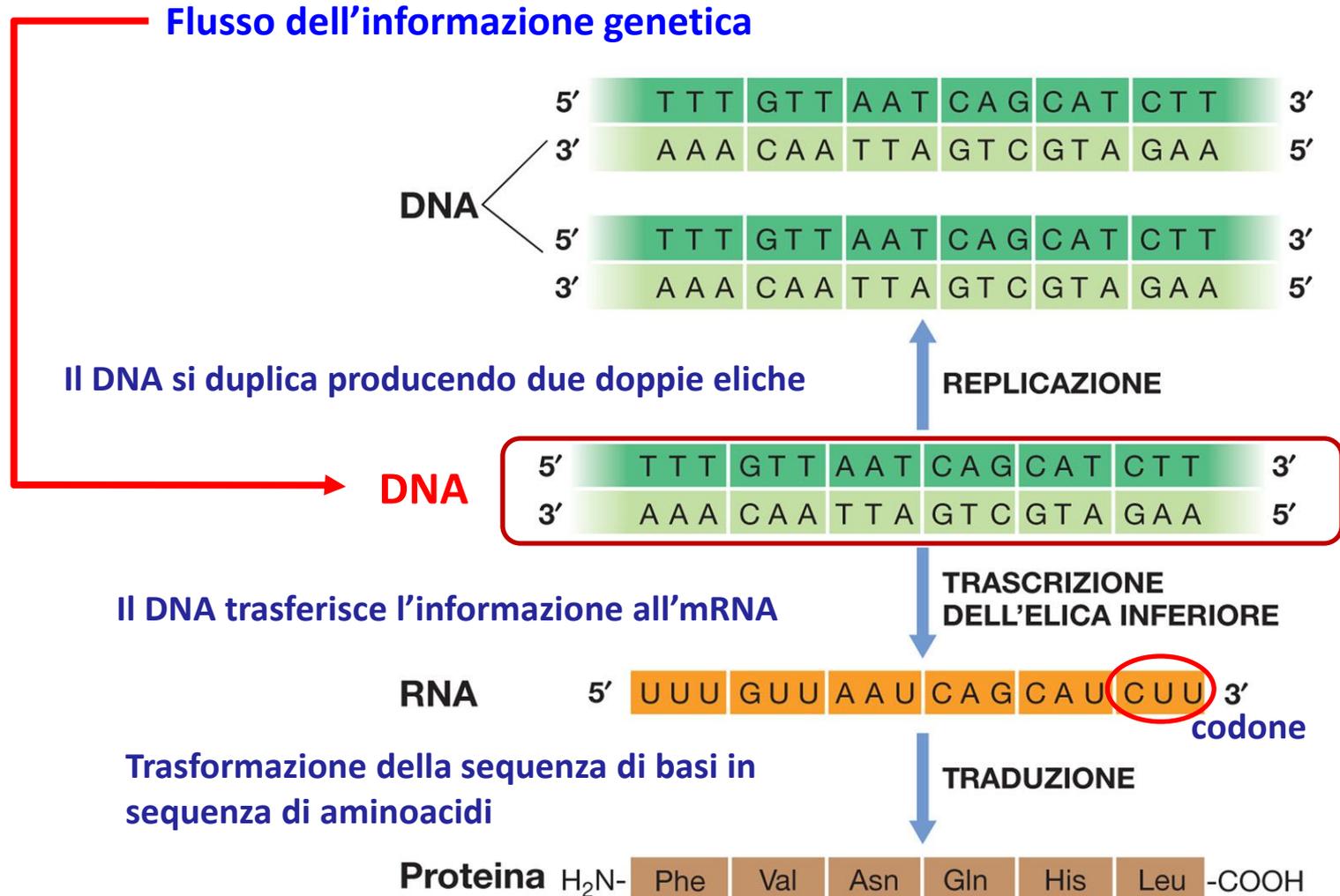


L'informazione genetica degli organismi viventi è organizzata in **geni (unità funzionali)**.

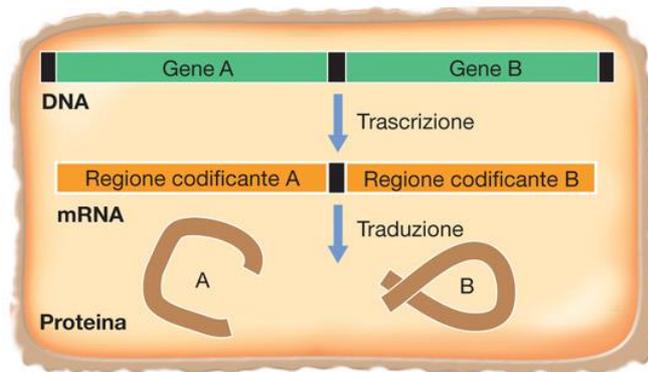
Il **gene** è un segmento di DNA codificante una proteina, un tRNA o un rRNA

Dogma centrale della biologia molecolare:
Trasferimento dell'informazione genetica
DNA → RNA → Proteine

Alcuni virus (RNA) non rispettano questa sequenza!



Il genoma dei batteri è generalmente organizzato sotto forma di un'unica molecola di **DNA circolare**.



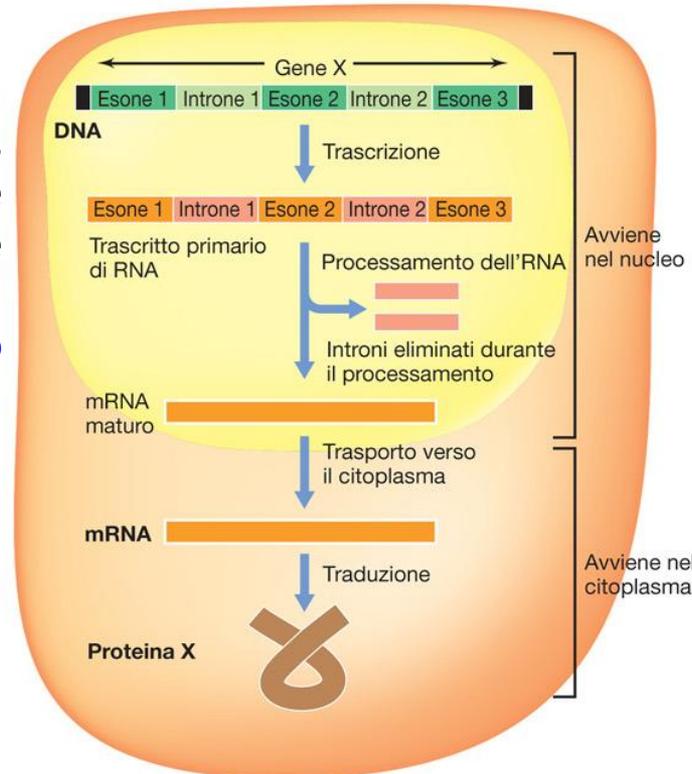
(a) **Procariote**

Procarioti

Più geni possono essere trascritti su un unico mRNA (policistronico).

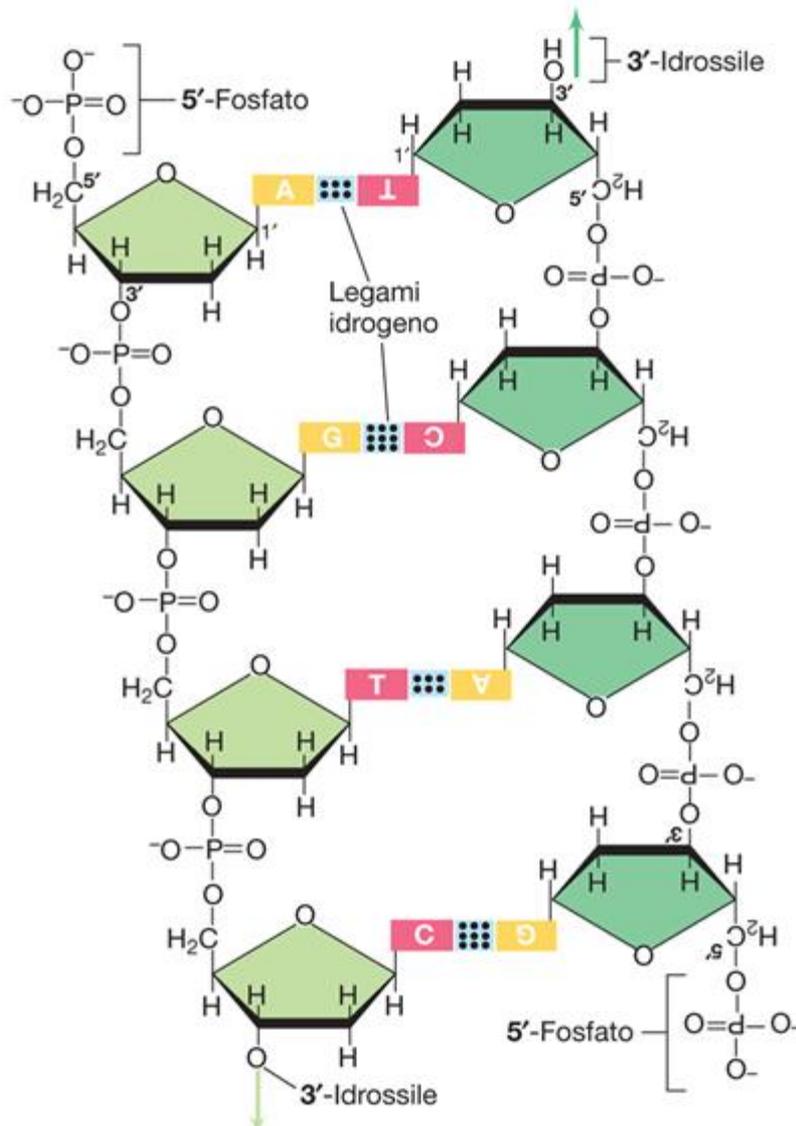
Eucarioti

- I geni sono, molto spesso, costituiti da sequenze codificanti (**esoni**) e sequenze non codificanti (**introni**).
- Un singolo gene è trascritto come singolo mRNA.



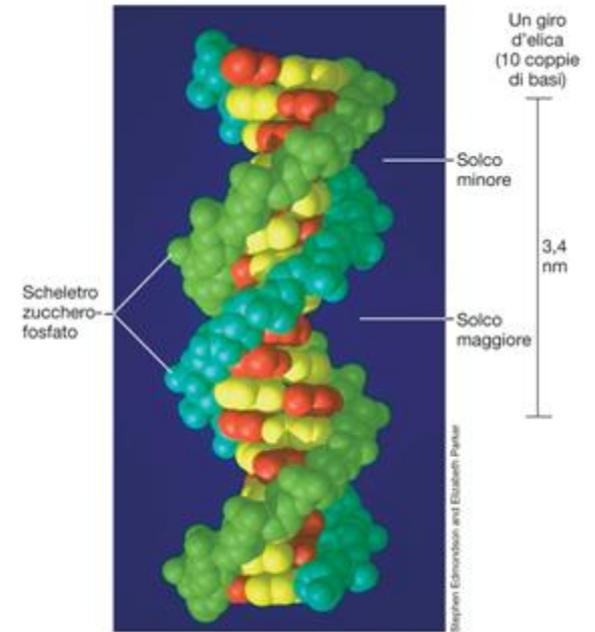
(b) **Eucariote**

I filamenti polinucleotidici, in una doppia elica di DNA, sono complementari ed antiparalleli



Il DNA, costituito da due catene elicoidali avvolte intorno allo stesso asse, assume una struttura a doppia elica destrorsa.

I filamenti sono avvolti uno intorno all'altro in modo da formare una doppia elica



Le dimensioni del DNA si esprimono in numero di migliaia di basi (o paia di basi): kb (o kbp).

E. coli → circa 4640 paia di basi (Kbp)

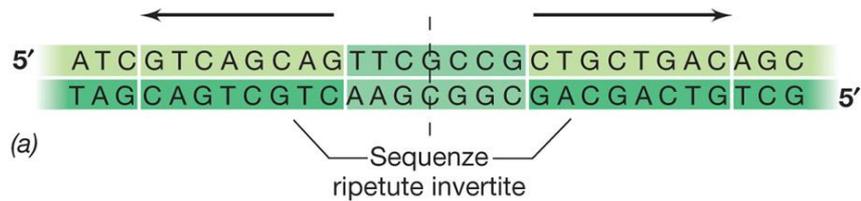
Struttura primaria → sequenza dei nucleotidi

Informazione genetica? → sequenza delle basi azotate

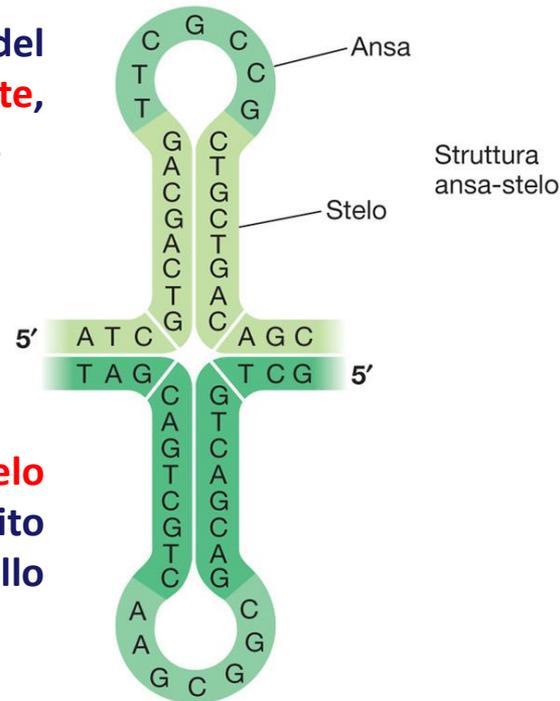
Alcuni tratti di DNA possono ripiegarsi in seguito all'interazione con alcune **proteine** o per la presenza di **brevi sequenze di adenine (5-6)** separate da 4-5 basi (*DNA curvo*)



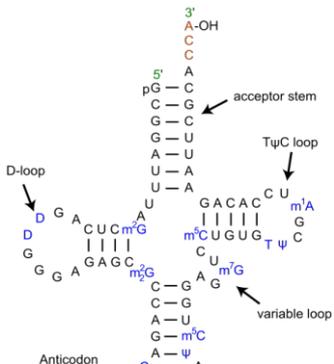
Le curvature del DNA contribuiscono alla regolazione dell'espressione genica



Alcune proteine, interagendo con regioni del DNA contenenti **sequenze ripetute invertite**, generano tratti di DNA a doppia simmetria.



La formazione di **strutture ansa stelo** possono formarsi anche in seguito all'appaiamento di basi presenti sullo stesso filamento (tRNA, rRNA)



(b)

Effetto della **temperatura** sulla struttura del DNA

I numerosi **legami ad idrogeno** (legami deboli) consentono alla molecola di DNA di assumere la forma a doppia elica.

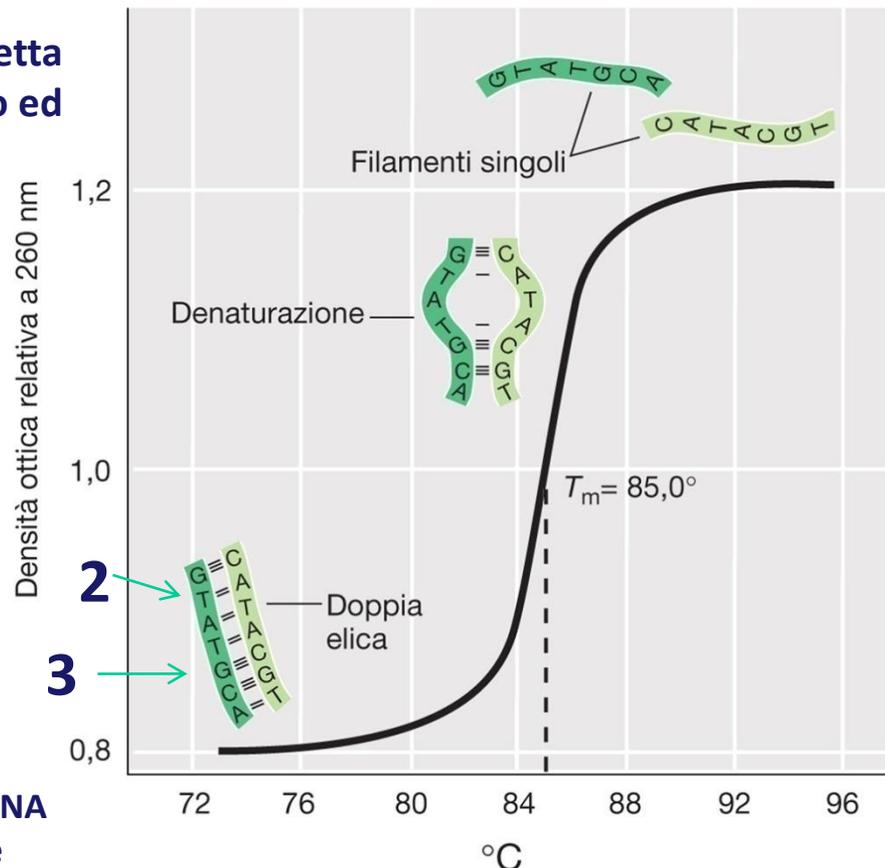
All'aumentare della temperatura i legami ad idrogeno si rompono e i due filamenti si separano (**denaturazione** o melting).

L'assorbimento di luce ultravioletta (260 nm) è diverso tra DNA a doppio ed a singolo filamento.

Il DNA con una maggiore quantità in coppie di basi GC sarà più stabile quando esposto a temperature più elevate.

In seguito all'abbassamento della temperatura il DNA può riacquistare la forma nativa (**rinaturazione**).

E' possibile la formazione di molecole di DNA con filamenti provenienti da doppie eliche diverse (**ibridazione**).

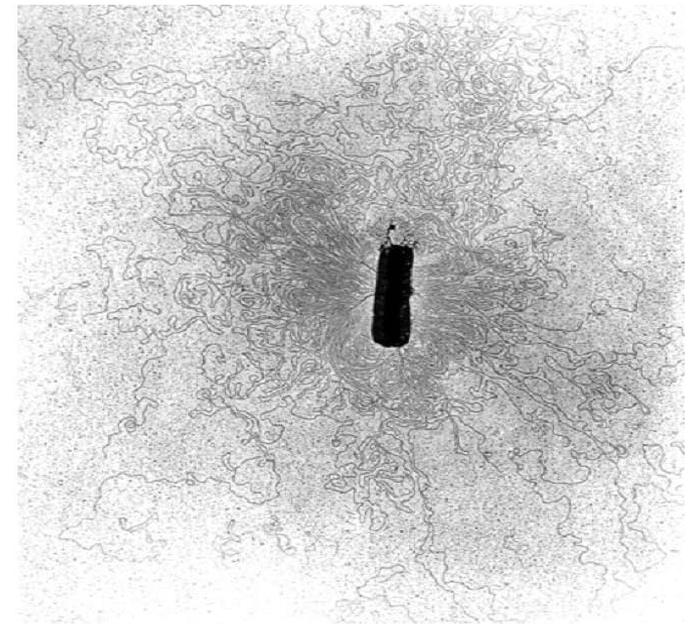
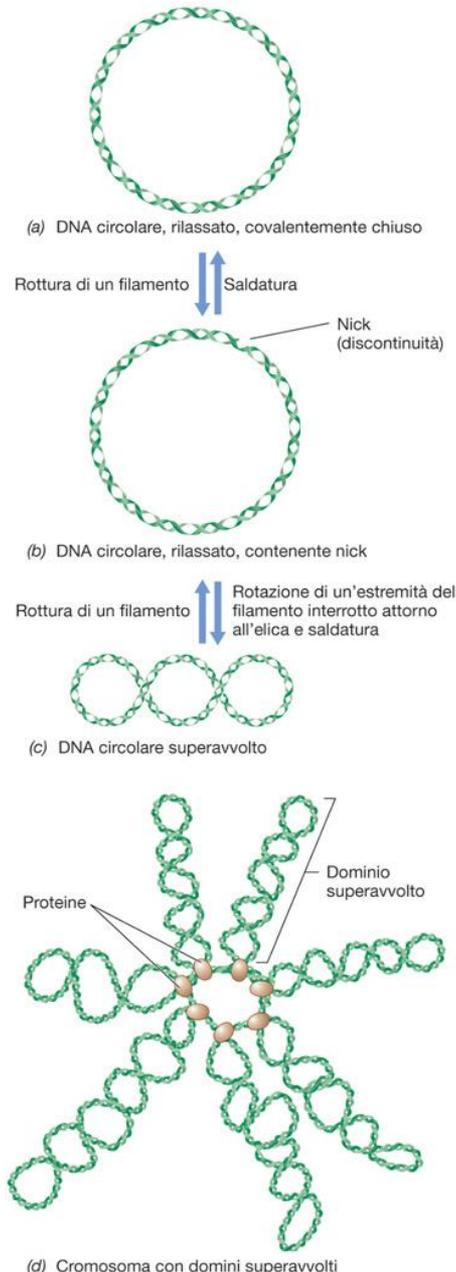


Superavvolgimento del DNA (Supercoiling)

La lunghezza del DNA di *E. coli* misura oltre 1 mm (circa 700 volte più lungo del batterio).

Alla condensazione del DNA contribuisce il legame con polipeptidi a basso peso molecolare (**NAP, nucleoid-associated proteins**).

In *E. coli* si possono osservare circa 100 **domini superavvolti**, ognuno stabilizzato da legami con proteine specifiche.



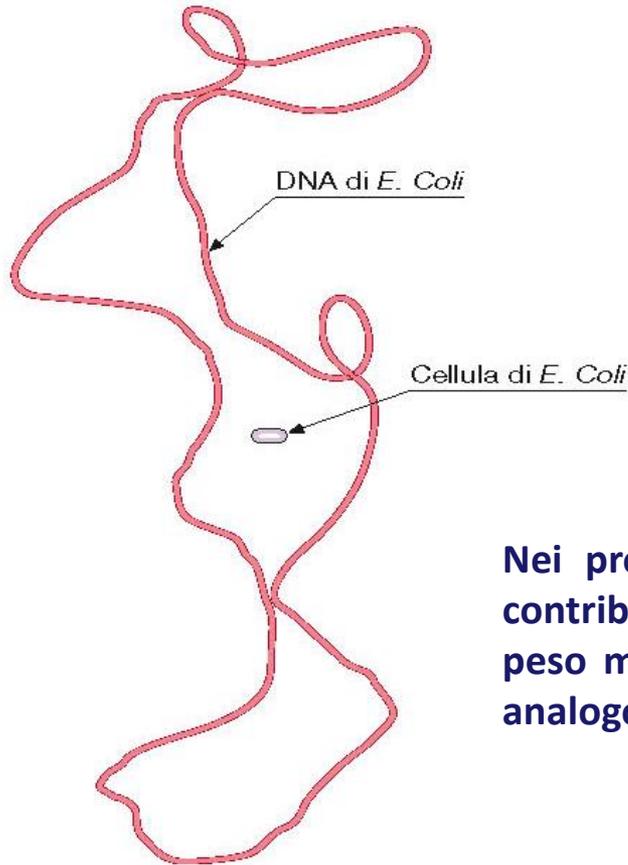
Cromosoma di *E. coli* dopo lisi delle cellule

Se una molecola di DNA circolare viene linearizzata, qualsiasi superavvolgimento viene perso e il DNA si "rilassa".

Quando è rilassata, una molecola di DNA ha esattamente il numero di giri dell'elica previsto dal numero di coppie di basi.

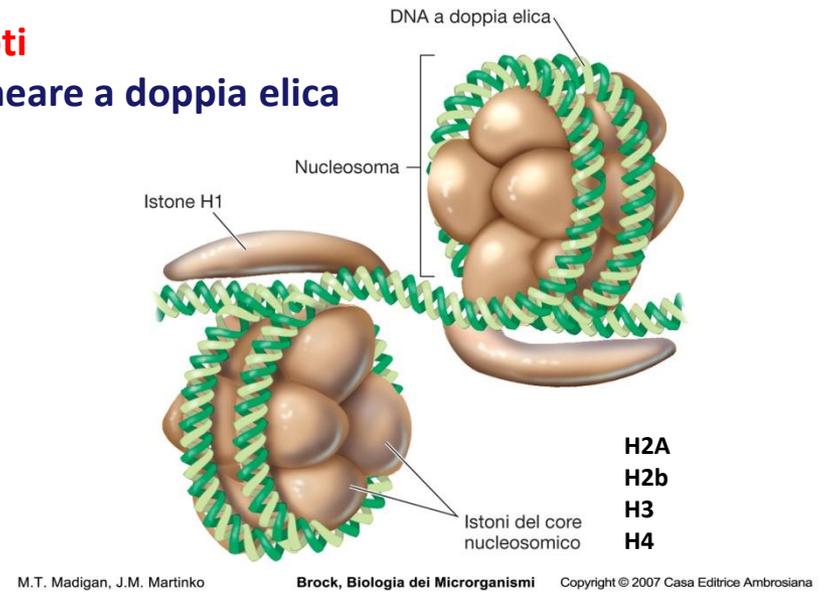
Procarioti

DNA circolare a doppia elica



Eucarioti

DNA lineare a doppia elica



Nei procarioti alla condensazione del DNA contribuisce il legame con polipeptidi a basso peso molecolare (**NAP**), che hanno un ruolo analogo agli istoni.

Le **topoisomerasi** intervengono nel controllo dei superavvolgimenti del DNA

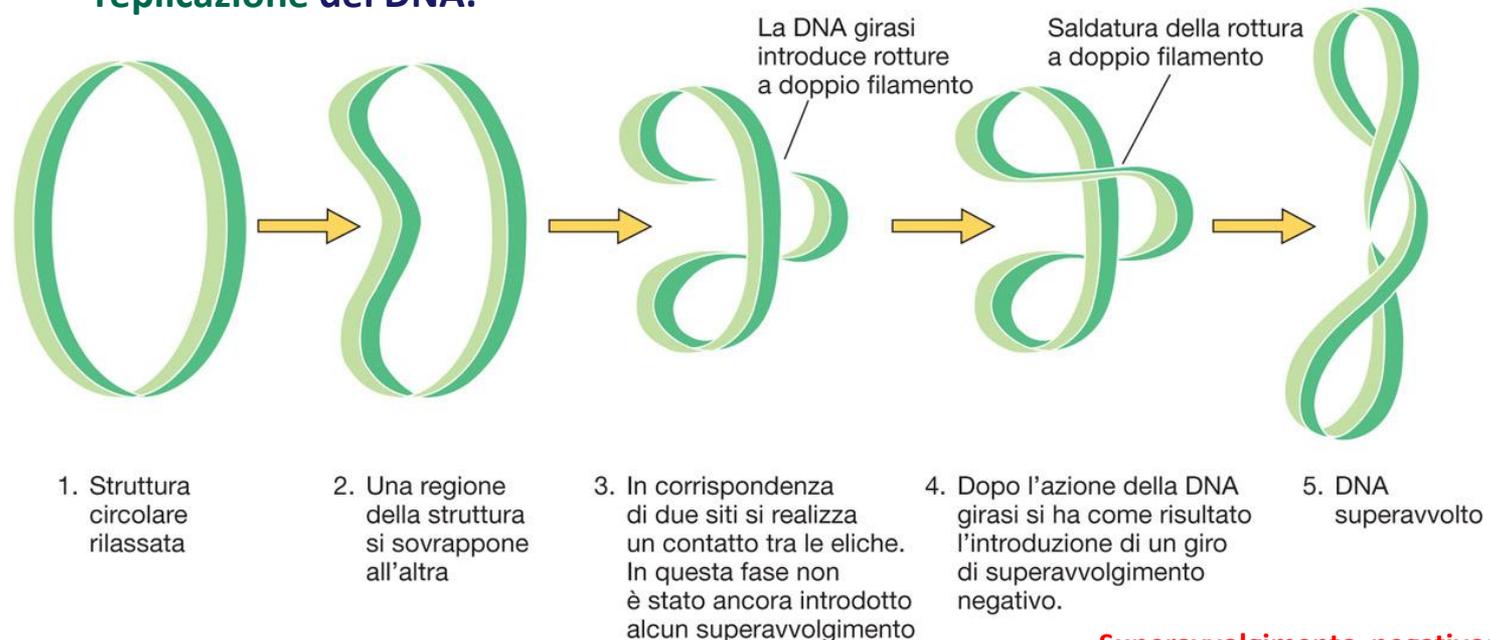
- **Topoisomerasi I**: induce la rottura di un singolo filamento del DNA riducendo gli eccessi di superavvolgimenti.
- **Topoisomerasi II**: rompono entrambi i filamenti di DNA rimuovendo o aggiungendo superavvolgimenti nella molecola di DNA.

La **DNA girasi** (una **topoisomerasi II**) introduce **superavvolgimenti negativi** nel DNA circolare.

rotazione nella direzione opposta all'avvolgimento dell'elica

Il **superavvolgimento** è importante per l'impacchettamento del DNA nel batterio.

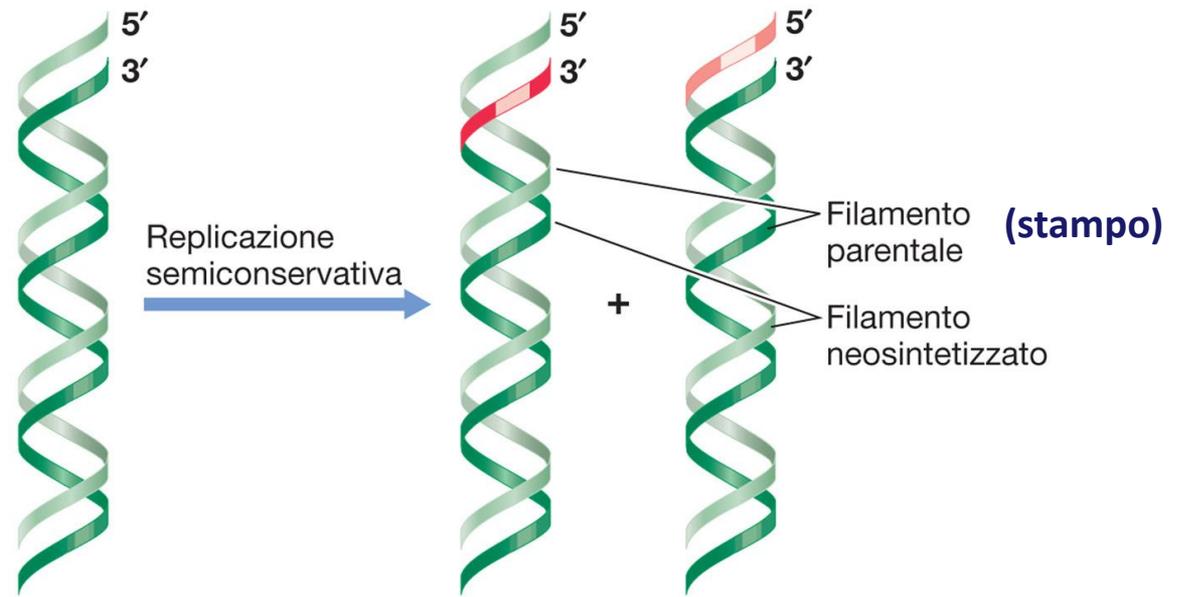
Il **rilassamento**, mediato dalla **topoisomerasi I**, consente la **replicazione del DNA**.



Superavvolgimento negativo: il DNA si ripiega intorno al suo asse in direzione opposta a quella della doppia elica.

Alcuni **Archaea**, soprattutto gli ipertermofili, possiedono una **girasi inversa** che introduce **superavvolgimenti positivi** nel DNA in grado di proteggerlo da esposizioni ad alte temperature (rende più difficile la separazione dei filamenti).

Replicazione del DNA



M.T. Madigan, J.M. Martinko

Brock, *Biologia dei Microrganismi*

Copyright © 2007 Casa Editrice Ambrosiana

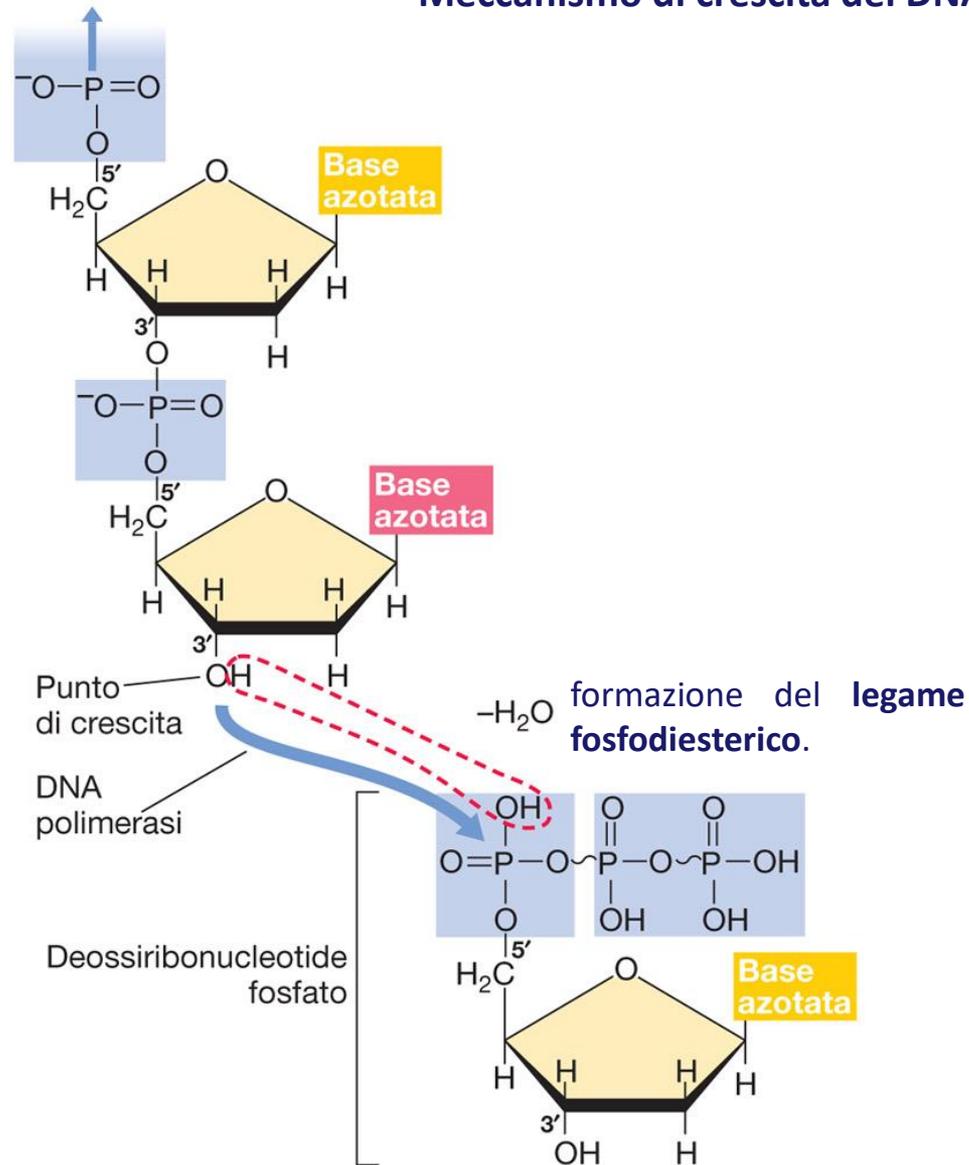
Meccanismo importante per la divisione delle cellule nella formazione di nuovi organismi.



elevata fedeltà

per garantire che le cellule figlie siano identiche alla cellula madre.

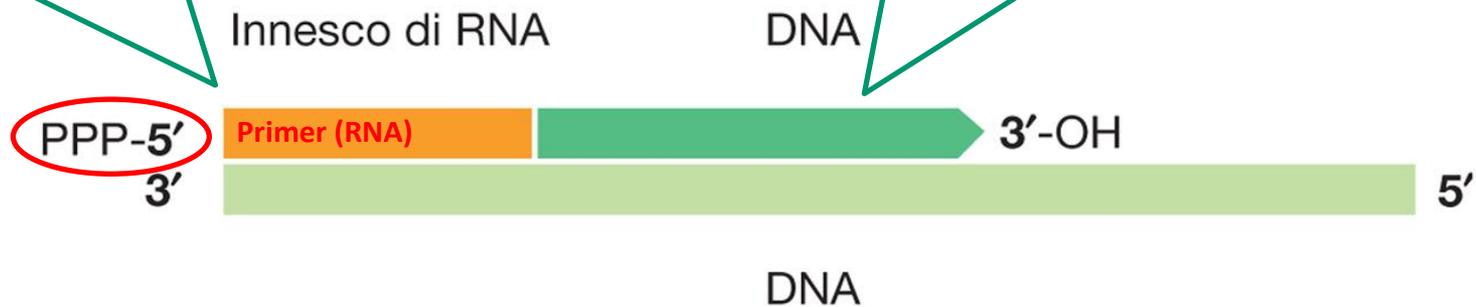
Meccanismo di crescita del DNA



La replicazione del DNA procede sempre in direzione **5' → 3'**

Per replicare una catena di DNA è necessario un innesco (**primer**) sintetizzato da una **primasi**. Il primer rappresenta una corta sequenza di **RNA** che presenta un **gruppo 3'-OH** a cui la polimerasi può legare il primo deossinucleotide.

L'aggiunta dei nucleotidi avviene ad opera della **DNA polimerasi**.

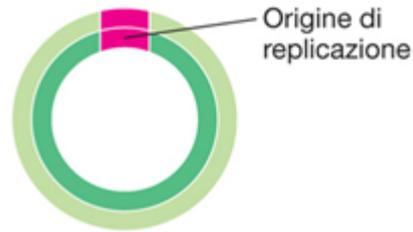


Alla fine della replicazione la sequenza **primer** viene sostituita da una sequenza a DNA.

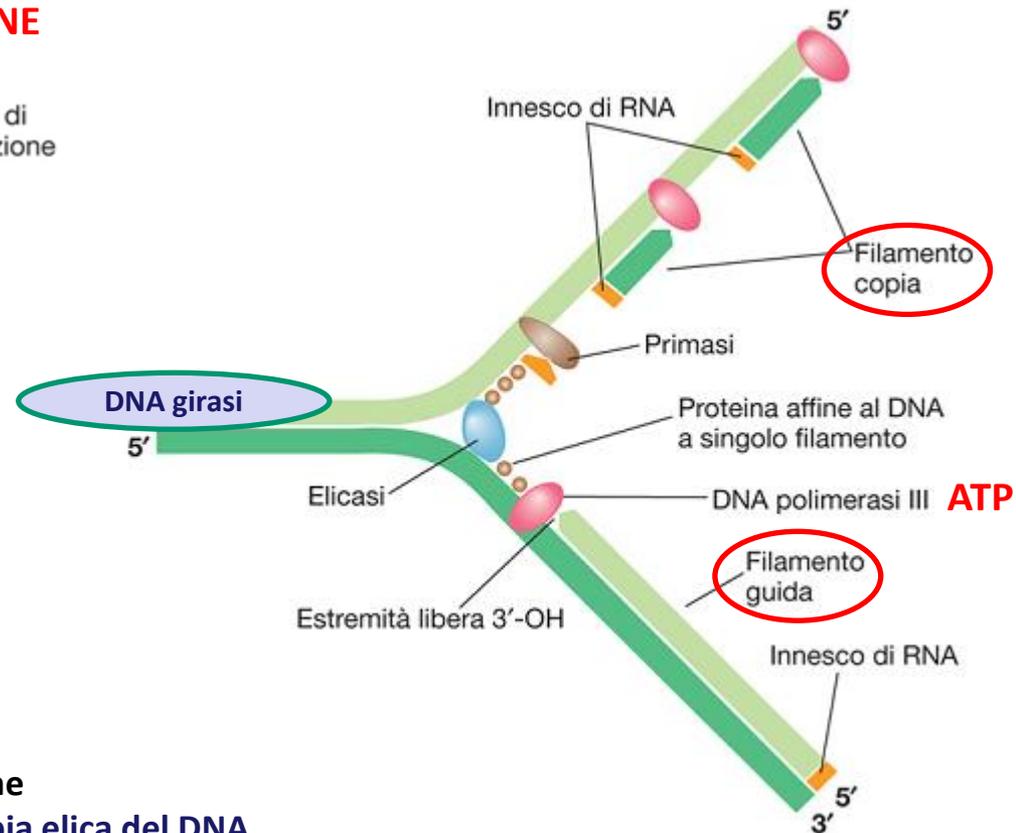
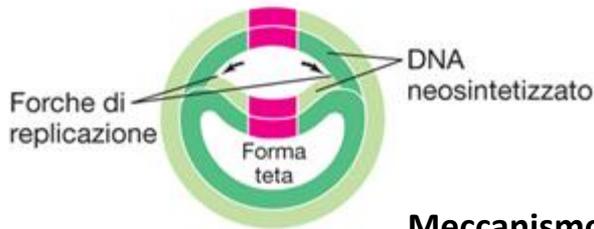
REPLICAZIONE DEL DNA E FORCA DI REPLICAZIONE

E. coli (Bacteria)

Nei procarioti esiste un'unica **origine di replicazione** (*oriC*).



Una proteina (**DnaA**) si lega all'origine della replicazione ed apre la doppia elica. Si formano due forche di replicazione e la replicazione procede in entrambe le direzioni.



Meccanismo della replicazione

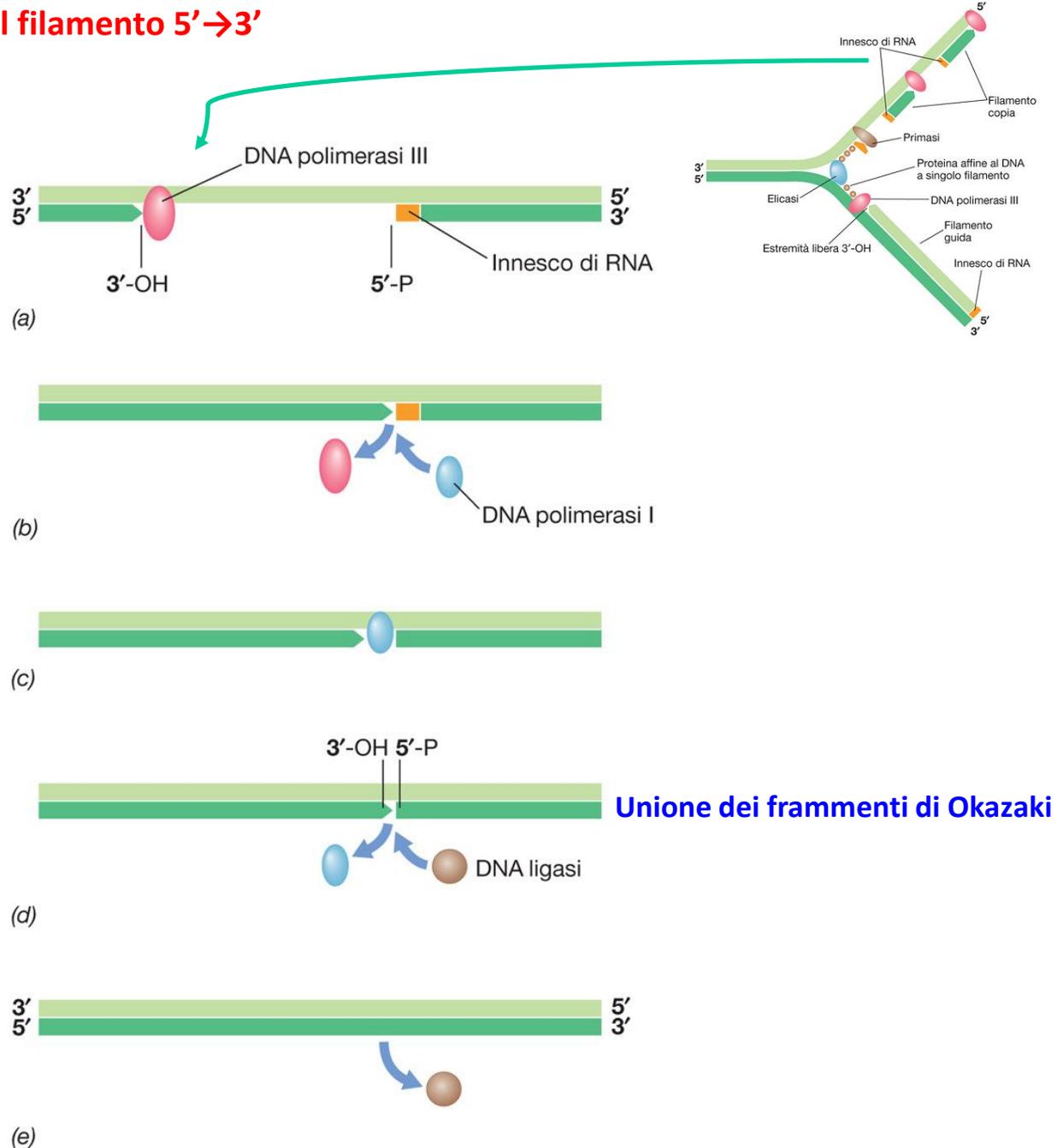
- Le **elicasi** srotolano la doppia elica del DNA.
- I singoli filamenti di DNA generati vengono stabilizzati e protetti in seguito al legame con **proteine affini al DNA a singolo filamento**.
- Le **DNA girasi** eliminano i superavvolgimenti positivi indotti dall'attività dell'elicasi a monte della forca replicativa.
- Dopo l'aggiunta di un **innesco di RNA**, la **DNA polimerasi III** dirige l'allungamento (continuo) del nuovo filamento di DNA in direzione 5'→3', utilizzando come stampo il filamento 3'→5'.
- Sull'altro filamento (5'→3') la forza la replicazione può procedere solo in seguito alla sintesi di **inneschi di RNA** da parte della **primasi**.
- Alla primasi succede la **polimerasi III** che procede con l'allungamento della catena (discontinuo).

Replicazione del DNA sul filamento 5'→3'

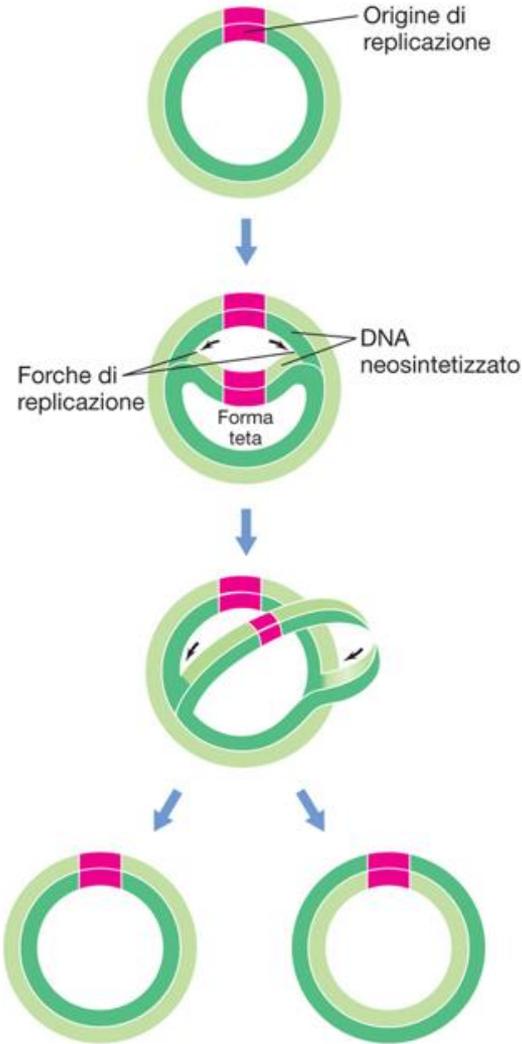
Alla **primasi** succede la **polimerasi III** che procede con l'allungamento della catena in modo discontinuo.

Quando il frammento in crescita raggiunge il frammento adiacente, la PolIII viene sostituita dalla **DNA polimerasi I** che continua ad aggiungere nucleotidi all'estremità 3'-OH e **digerisce i ribonucleotidi dell'innescio**.

Dopo eliminazione dell'innescio, la PolI viene rilasciata e l'intervento della **DNA ligasi** permette la formazione del **legame fosfodiesterico** tra i due nucleotidi adiacenti.



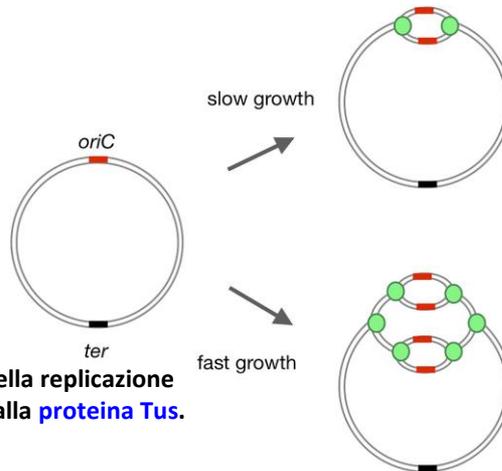
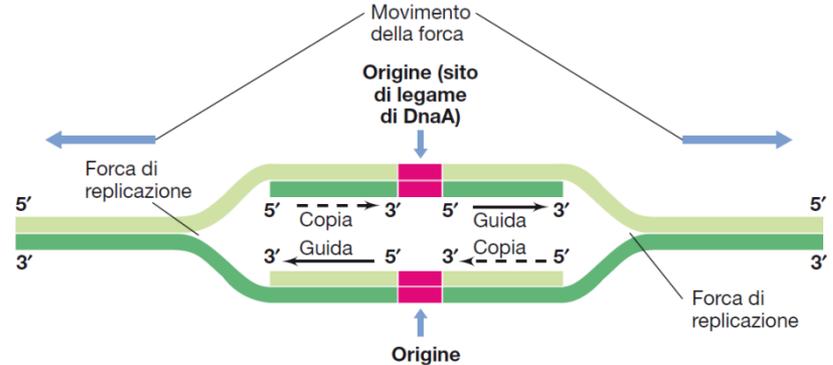
Replicazione di una molecola circolare di DNA



L'intervento di una **topoisomerasi IV** separa di due cromosomi circolari.

La proteina specifica **DnaA** riconosce il sito di **origine della replicazione (oriC)**

Replicazione bidirezionale



Terminatore della replicazione riconosciuto dalla **proteina Tus**.

La replicazione bidirezionale di una molecola di DNA circolare riduce i tempi di replicazione.

E. coli → ~40'

- █ oriC
- █ ter
- replisome

In condizioni ottimali *E. coli* ha un tempo di duplicazione di ~20'



Replication of the bacterial chromosome is initiated at a single *oriC* region, proceeds in both directions, and terminates at the *ter* region. During slow growth, replication is initiated once per cell cycle. In fast growers under optimal conditions, another round of replication is initiated before the previous round has been completed, resulting in the inheritance by daughter cells of partially replicated chromosomes.

le proteine coinvolte nella replicazione del DNA formano il **replisoma**

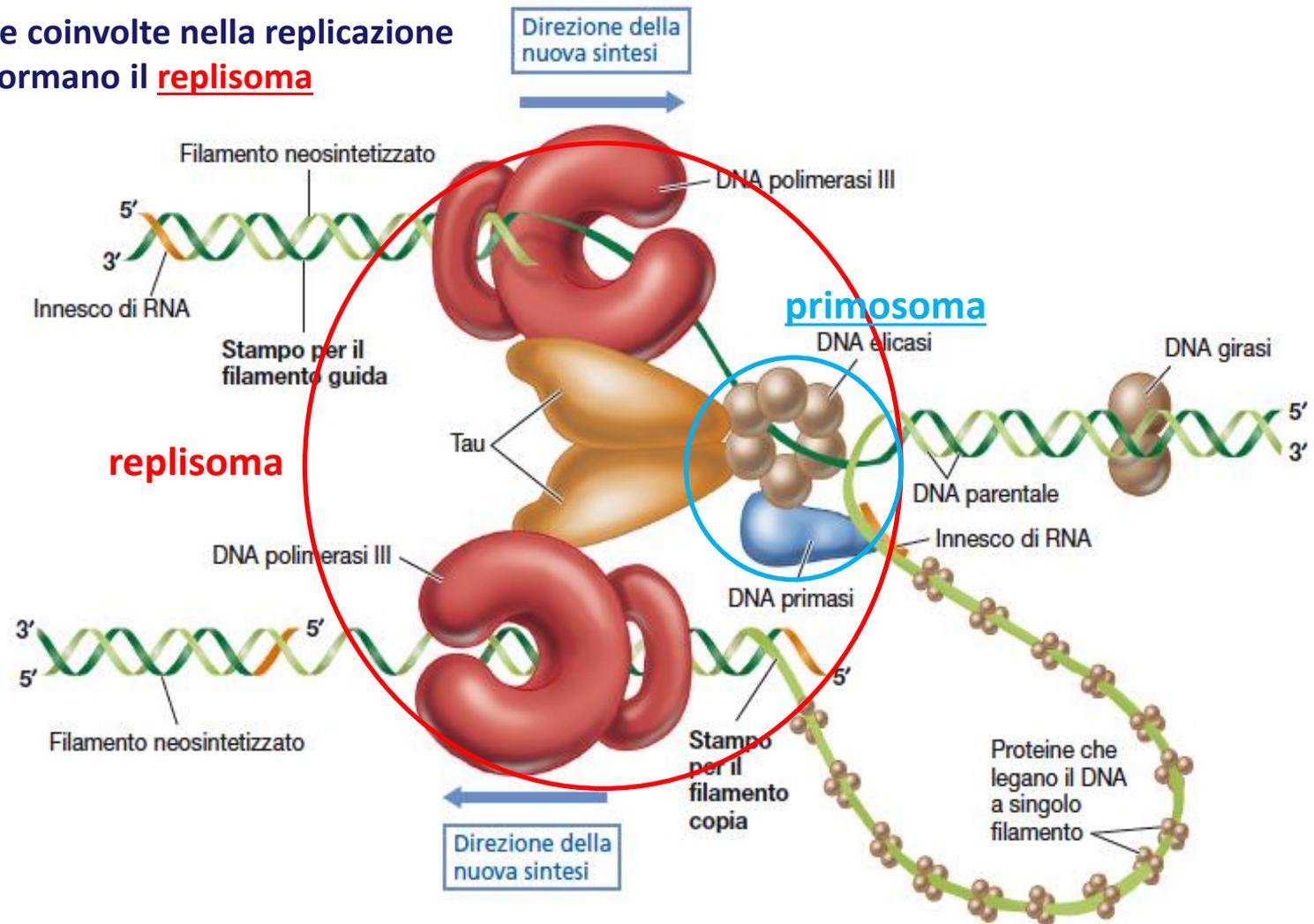
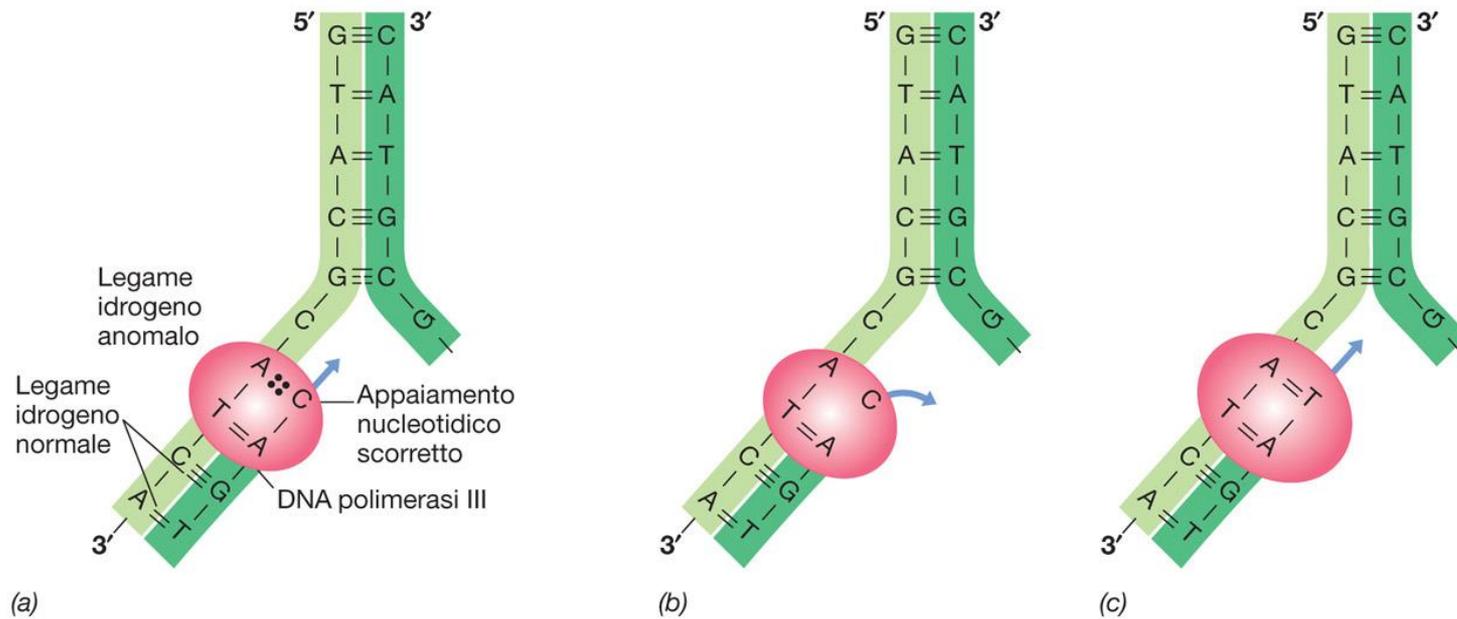


Figura 6.22 Replisoma. Il replisoma è costituito da due copie della DNA polimerasi III, oltre che dall'elicasi e dalla primasi (che a loro volta insieme costituiscono il primosoma) e da molte copie della proteina che lega il DNA a singolo

filamento. La subunità Tau mantiene unite le due DNA polimerasi e l'elicasi. Il replisoma è preceduto dalla DNA girasi, che rimuove i superavvolgimenti nel DNA in via di replicazione. Si noti che le polimerasi replicano i due filamenti del DNA in direzioni

opposte, ma anche che la disposizione ad ansa dello stampo del filamento copia permette all'intero replisoma di muoversi in un'unica direzione lungo il cromosoma.

Nel corso della replicazione possono avvenire degli appaiamenti di basi scorretti (A=C, ...).



Le **DNA polimerasi I e III** sono in grado di rimuovere gli appaiamenti scorretti (attività di **“correzione di bozze”**).

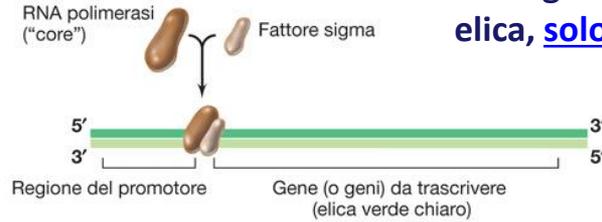
Sintesi dell'RNA e trascrizione ...

Per ogni gene, nella molecola di DNA a doppia elica, solo uno dei due filamenti funge da stampo.

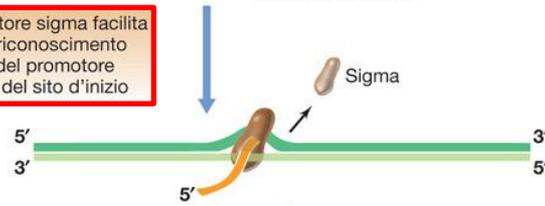
La sintesi dell'RNA avviene ad opera della **RNA polimerasi** e **senza** bisogno di innesco.

L'RNA polimerasi si lega a specifiche sequenze di DNA (**promotori**).

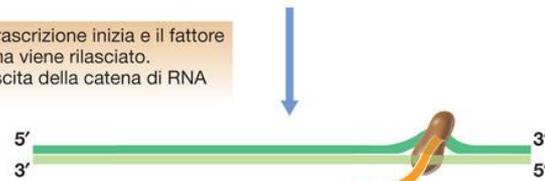
Il **promotore** orienta l'RNA polimerasi nella direzione di trascrizione.



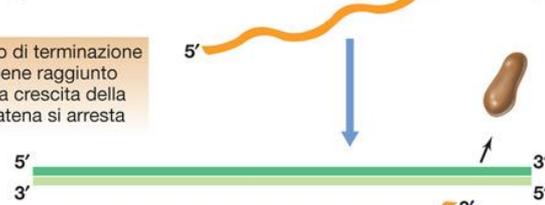
Il fattore sigma facilita il riconoscimento del promotore e del sito d'inizio



La trascrizione inizia e il fattore sigma viene rilasciato. Crescita della catena di RNA



Il sito di terminazione viene raggiunto e la crescita della catena si arresta

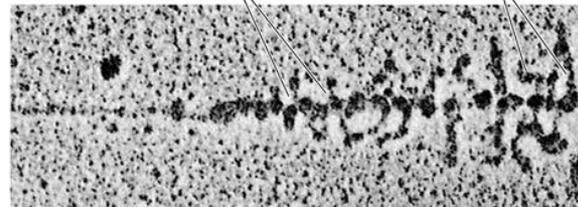


Rilascio dell'RNA polimerasi e dell'RNA



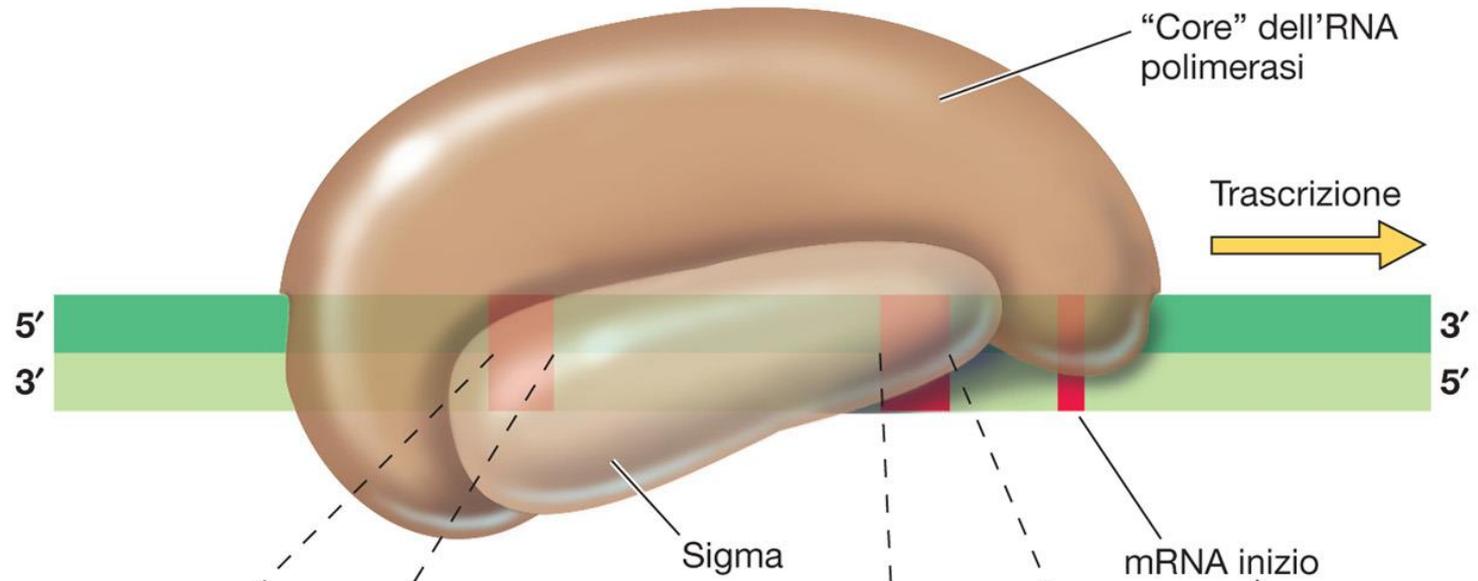
(a)

Trascritti corti
Trascritti più lunghi



(b)

... sintesi dell'RNA e trascrizione ...



6 diversi promotori

	5'		3'
1.	CTG	TTGACA	ATTAATCATCGAACTAG TTAACT TAGTACGCAAG
2.	CTA	TTCTGT	GGATAACCATGTGTAT TAGAGT TAGAAAACA
3.	TGG	TTCAA	AATCGCCTTTTGCTGTA TATACT CACAGCATA
4.	TTT	TTGAGT	TGTGTATAACCCCTCAT TCTGAT CCCAGCTT
5.	TAG	TTGCAT	GAACTCGCATGTCTCCAT TAGAAT GCGCGCTACT
6.	TTCT	TTGACA	CCTTTTCGGCATCGCCC TAAAAT TCGGC GTC

Sequenza -35

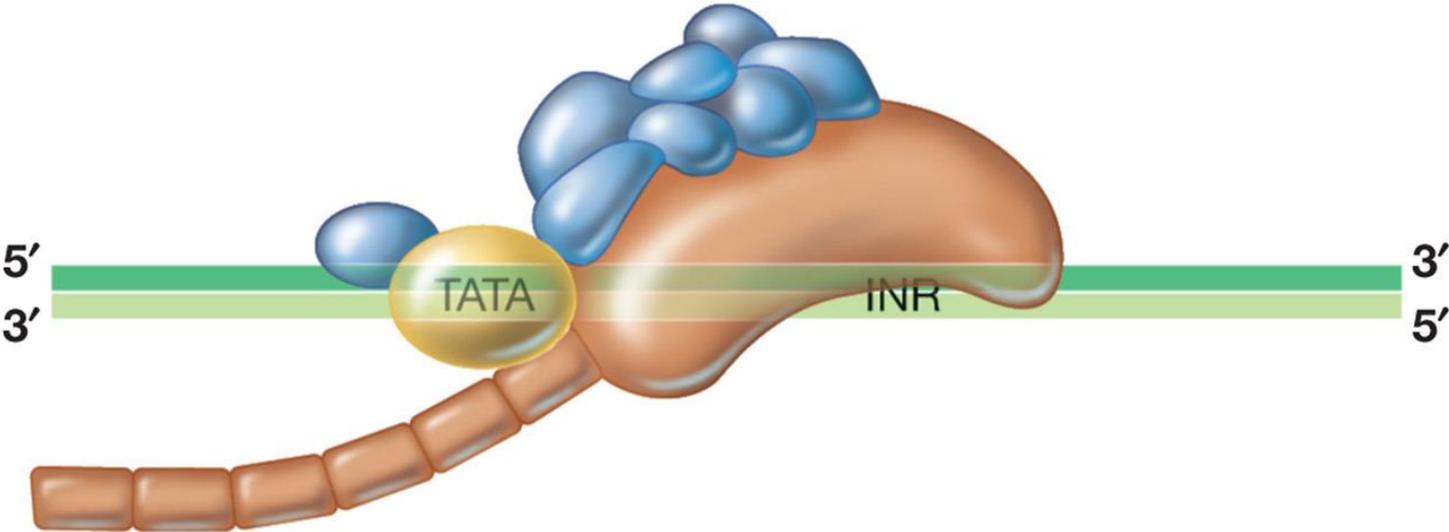
Pribnow box
sequenze -10

Sequenza consenso **TTGACA**

TATAAT

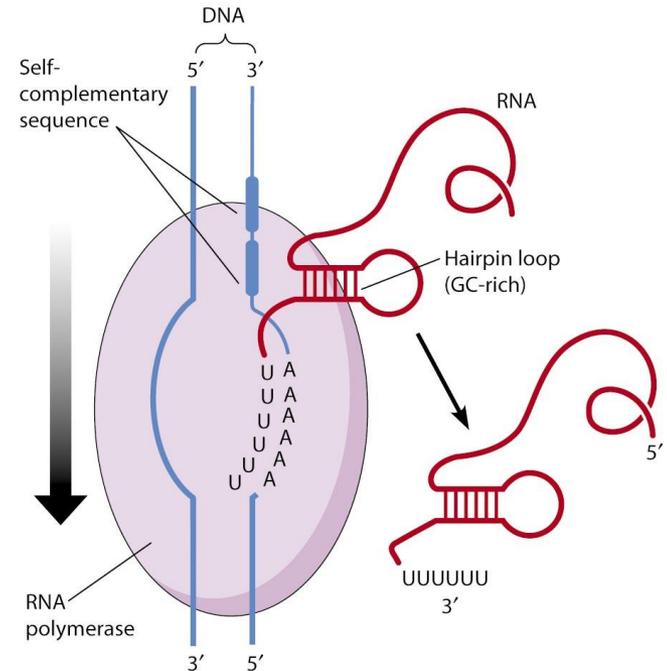
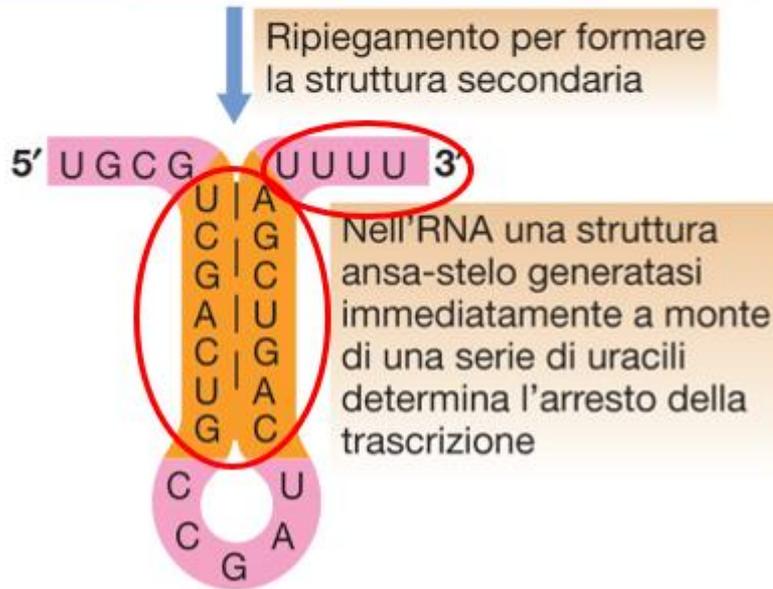
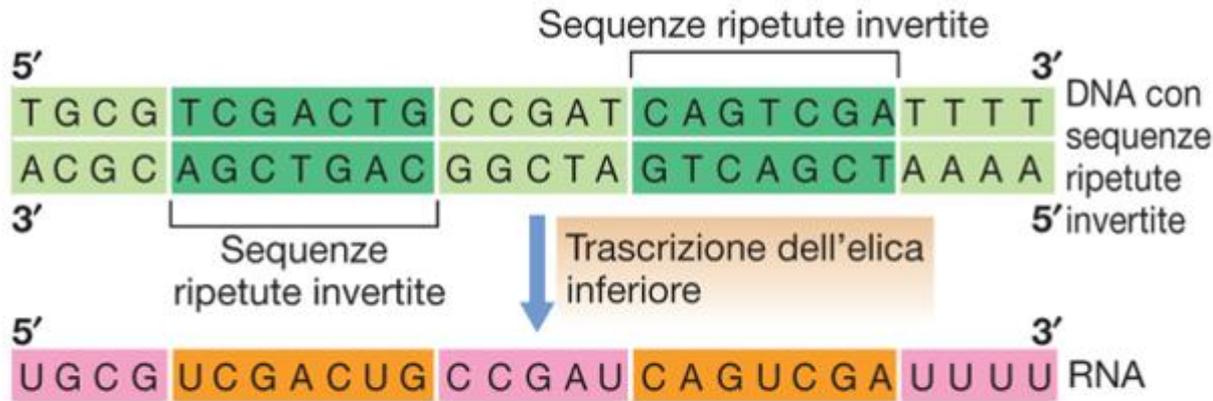
Sequenza del promotore

... sintesi dell'RNA e trascrizione ...



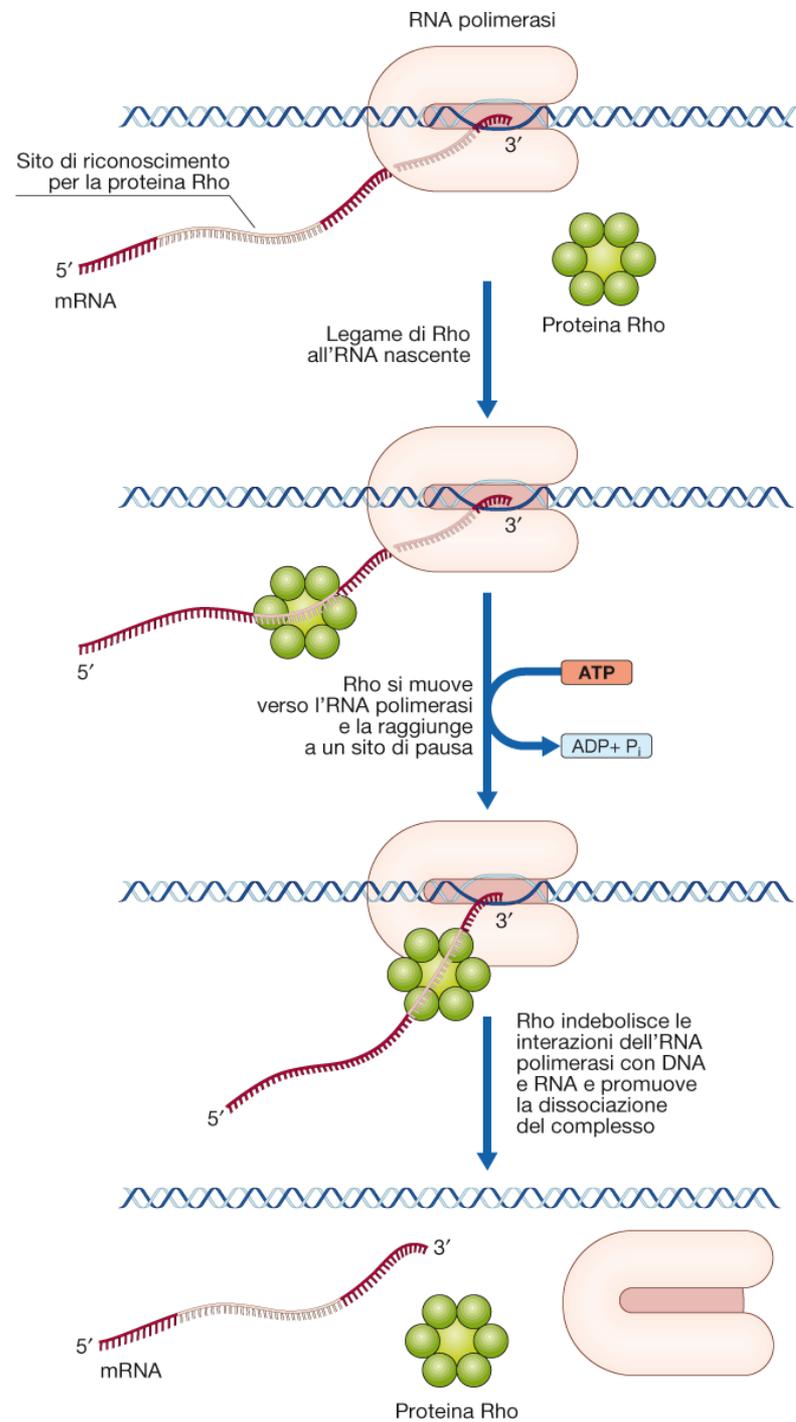
... sintesi dell'RNA e trascrizione ...

Arresto trascrizione Rho-indipendente

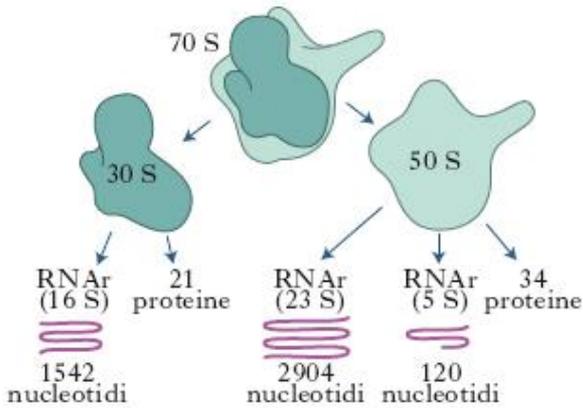


... sintesi dell'RNA e trascrizione ...

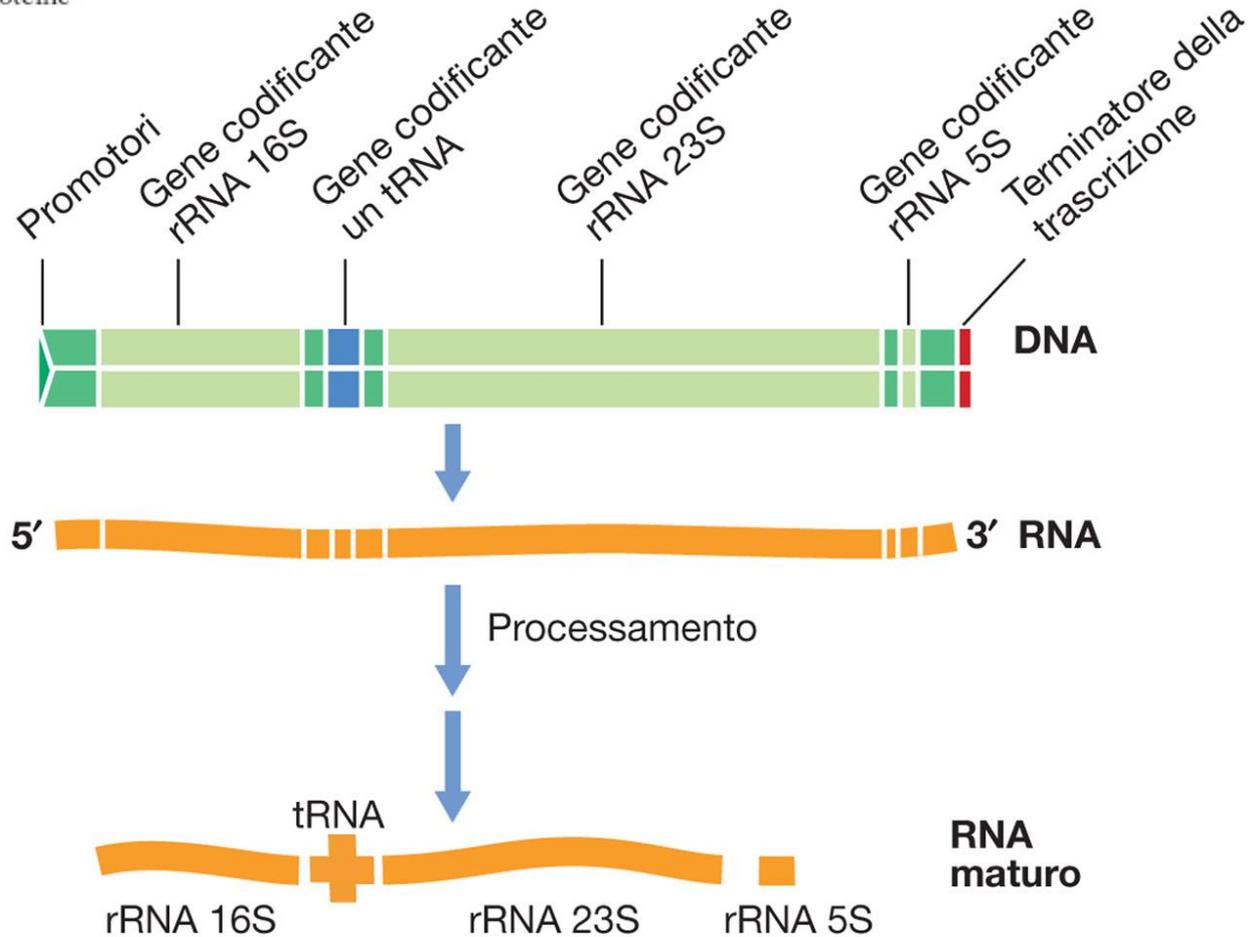
Arresto trascrizione Rho-dipendente

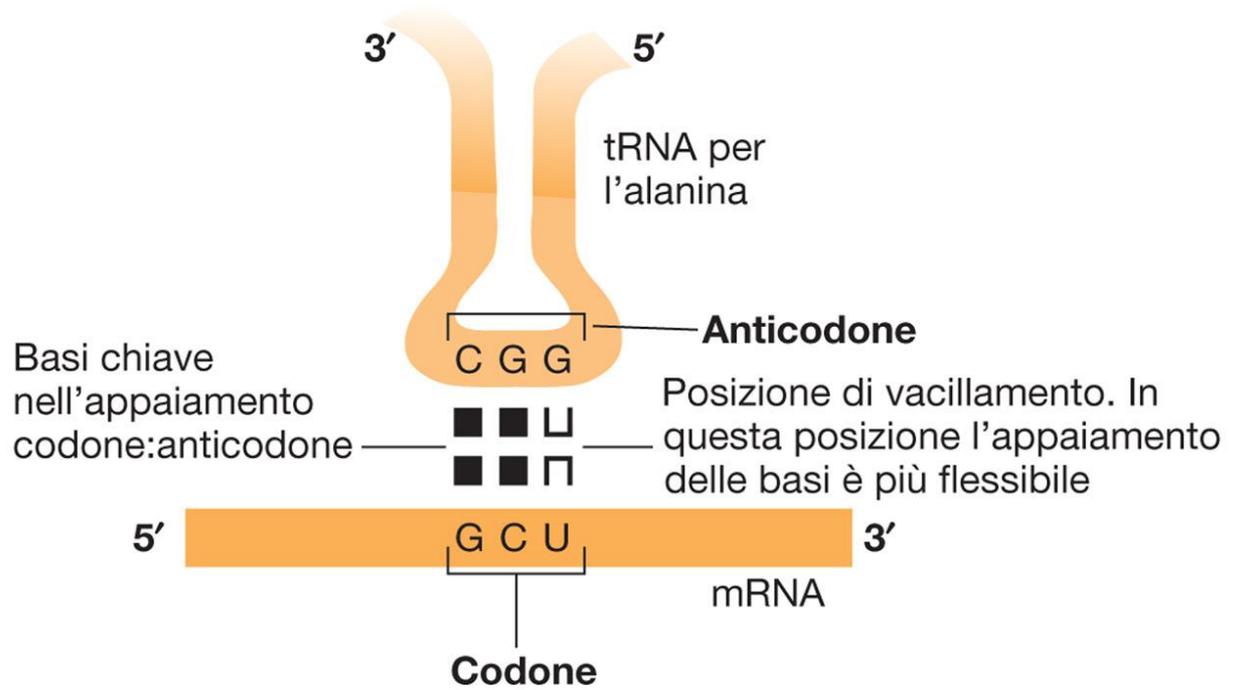


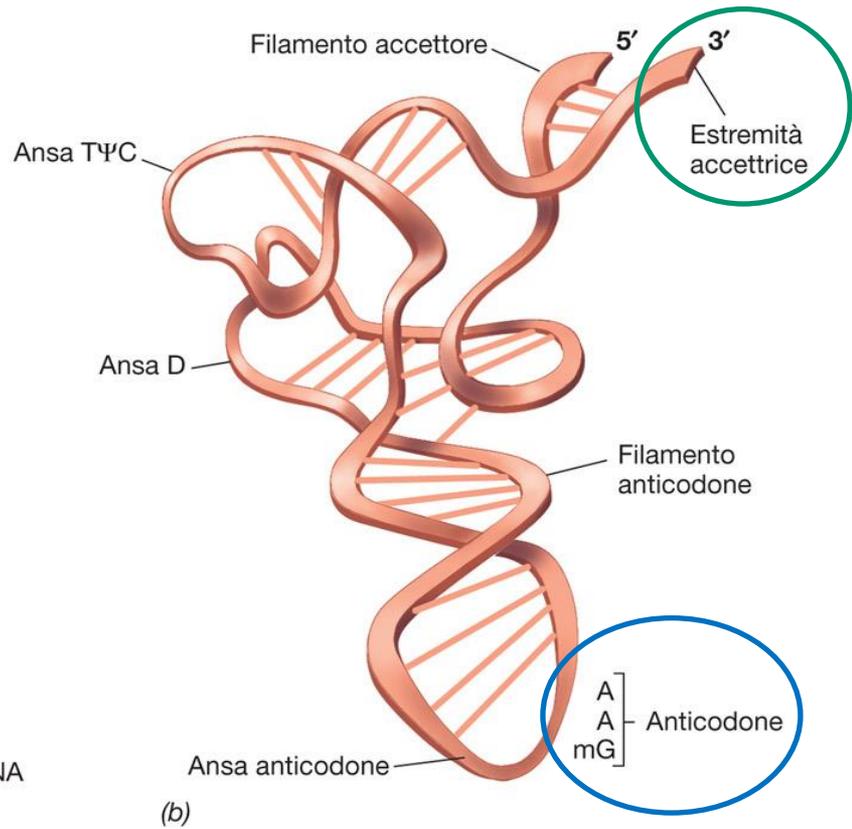
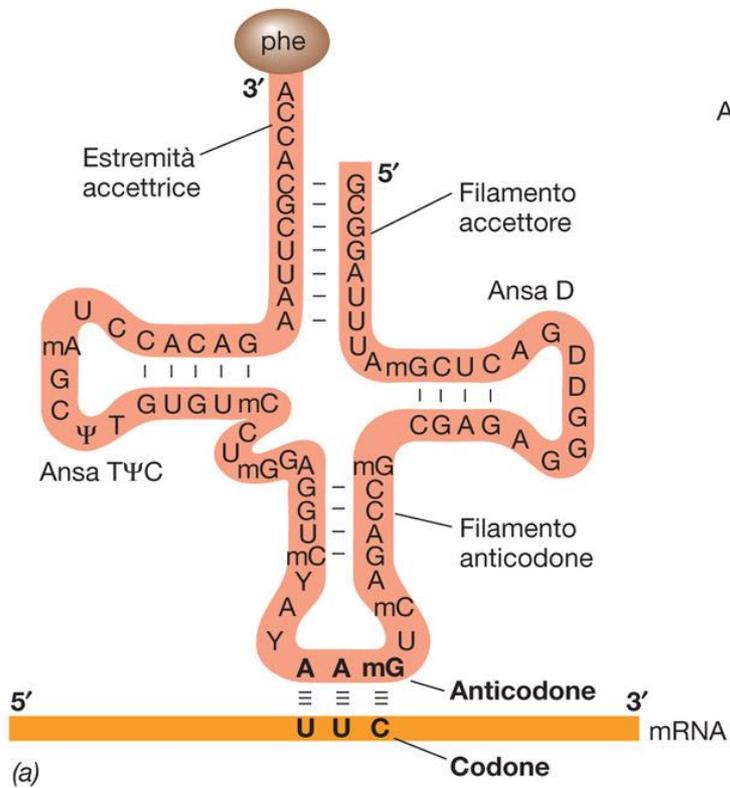
... sintesi dell'RNA e trascrizione



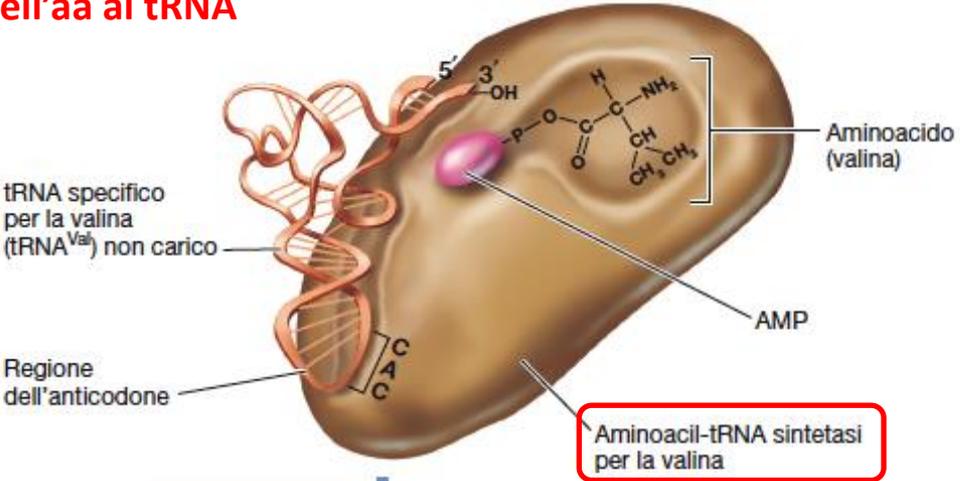
Unità di trascrizione degli rRNA batterici



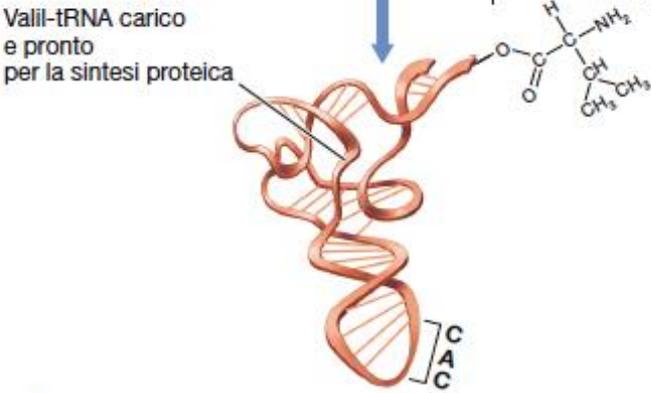




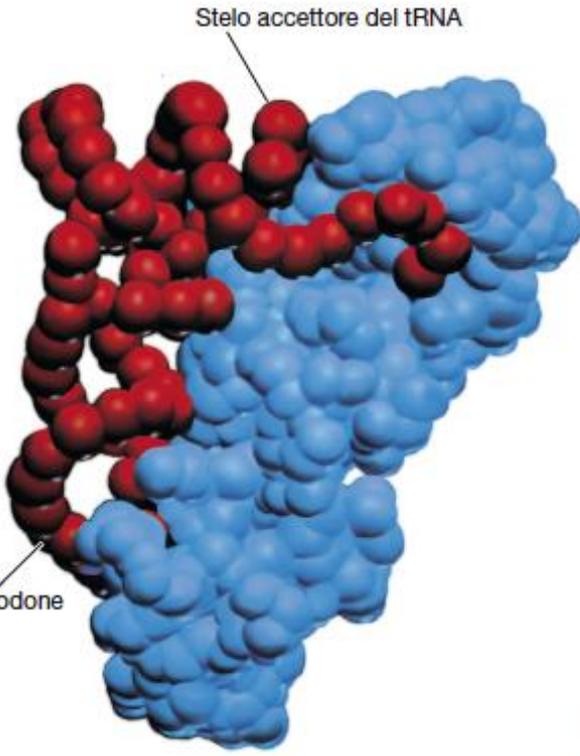
Legame dell'aa al tRNA



Legame della valina al tRNA^{Val}



(a)



(b)

Figura 6.34 Aminoacil-tRNA sintetasi. (a) Meccanismo d'azione di una aminoacil-tRNA sintetasi. Il riconoscimento del tRNA corretto da parte di una particolare sintetasi richiede contatti tra sequenze nucleotidiche specifiche, presenti nell'ansa D

e nell'estremità accettrice del tRNA, e alcuni particolari aminoacidi della sintetasi. Nel disegno è rappresentata la valil-tRNA sintetasi mentre catalizza la fase finale della reazione, cioè quando la valina nel complesso valil-AMP viene trasferita

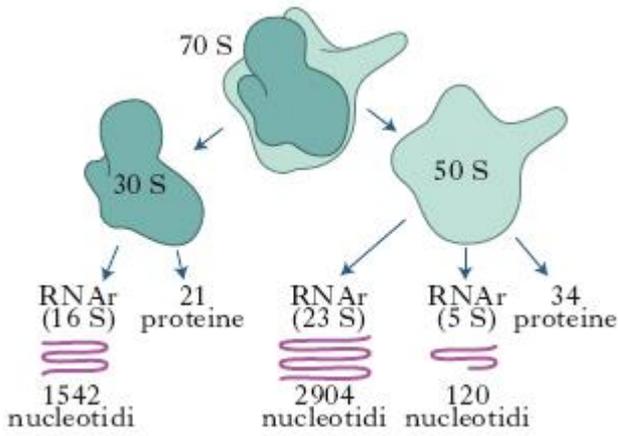
al tRNA. (b) Modello al computer che mette in evidenza le interazioni della glutamini-tRNA sintetasi (in blu) con il suo tRNA (in rosso). Riproduzione autorizzata da M. Ruff et al. 1991, *Science* 252: 1682-1689. © 1991, AAAS.

Dino Moras

Traduzione

Nei *Bacteria* inizia con la **f-metionina**

Negli *Archaea* e negli *Eukarya* con la **metionina**.



rRNA 23S catalizza il legame peptidico (attività enzimatica)

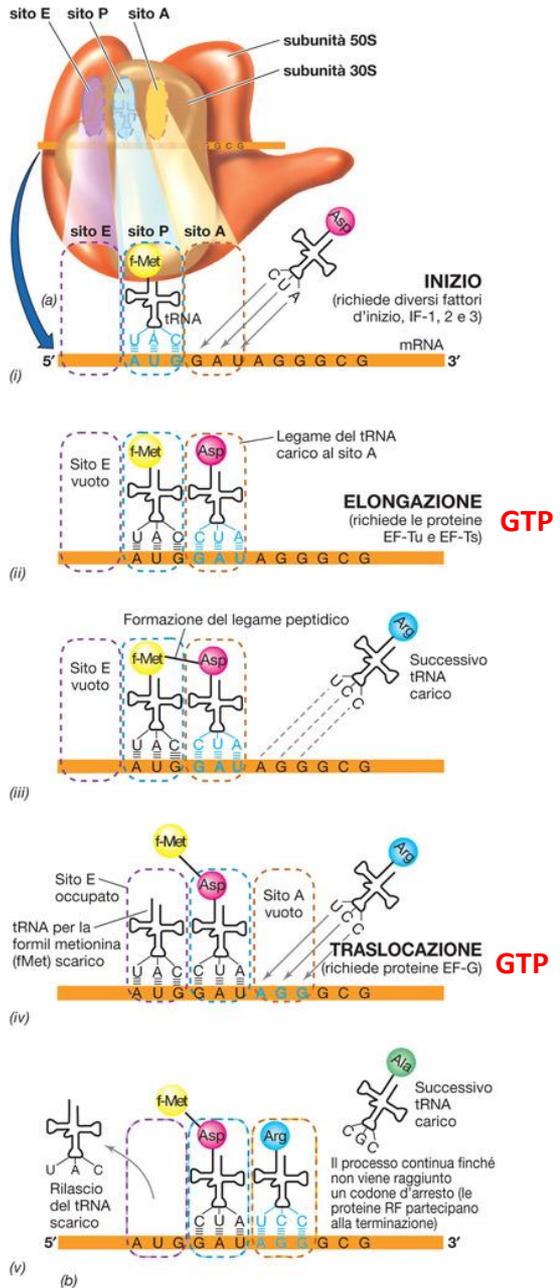
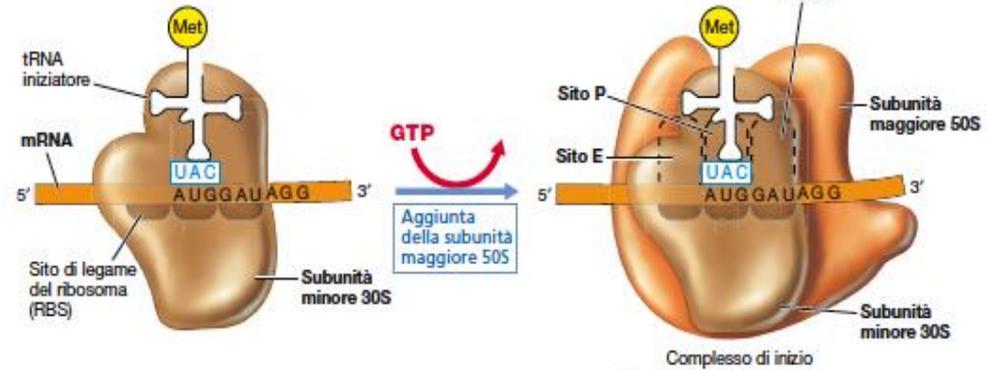
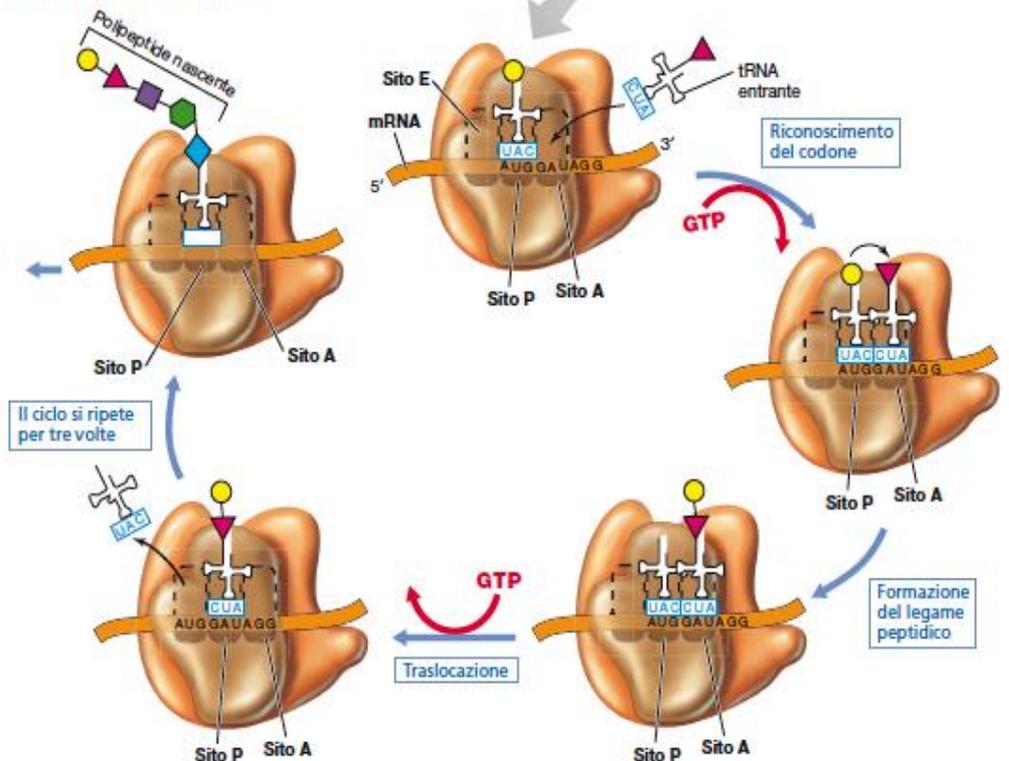


Figura 6.35 Il ribosoma e la sintesi proteica. L'inizio della sintesi proteica. L'mRNA e il tRNA iniziale, che trasporta la N-formilmetionina ("Met"), si legano alla subunità minore del ribosoma. I fattori di inizio (non mostrati in questa figura) utilizzano l'energia del GTP per promuovere, in seguito, l'unione con la subunità maggiore del ribosoma. In questa fase il tRNA iniziale si trova nel sito P. Ciclo di *elongazione* della traduzione. I fattori di elongazione (non mostrati) utilizzano il GTP per inserire nel sito A i tRNA necessari per continuare la sintesi delle proteine. Quindi l'rRNA 23S catalizza la formazione del legame peptidico. Lo scorrimento del ribosoma lungo l'mRNA da un codone a quello seguente richiede l'idrolisi di un altro GTP. I tRNA utilizzati vengono quindi rilasciati dal sito E. Il codice genetico è riportato nella Tabella 6.5.

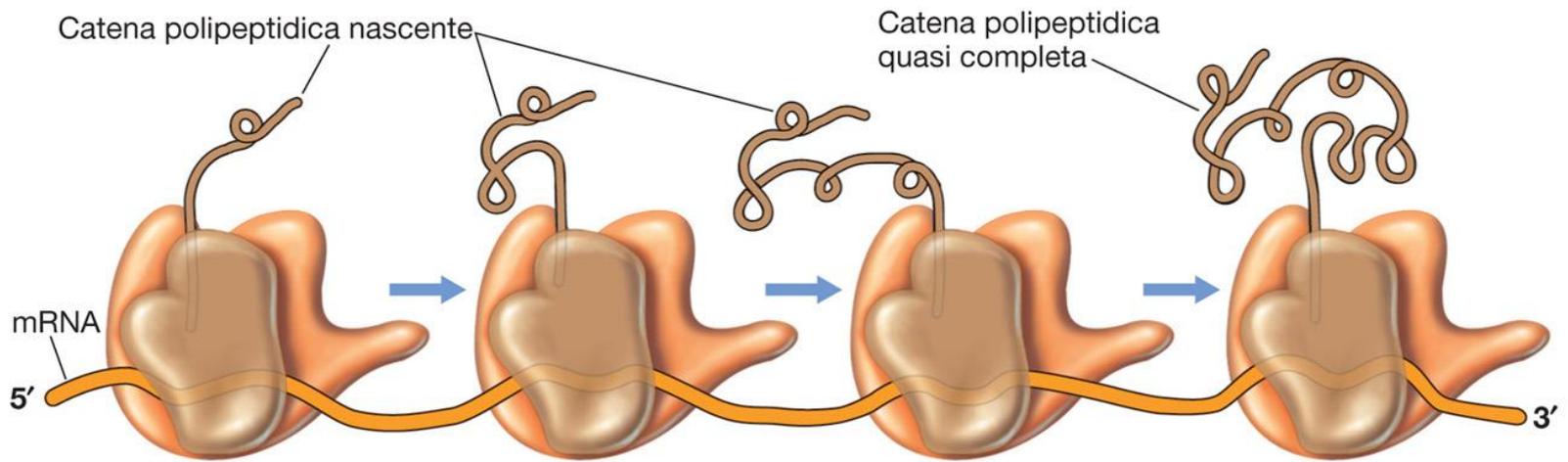
TRADUZIONE: inizio

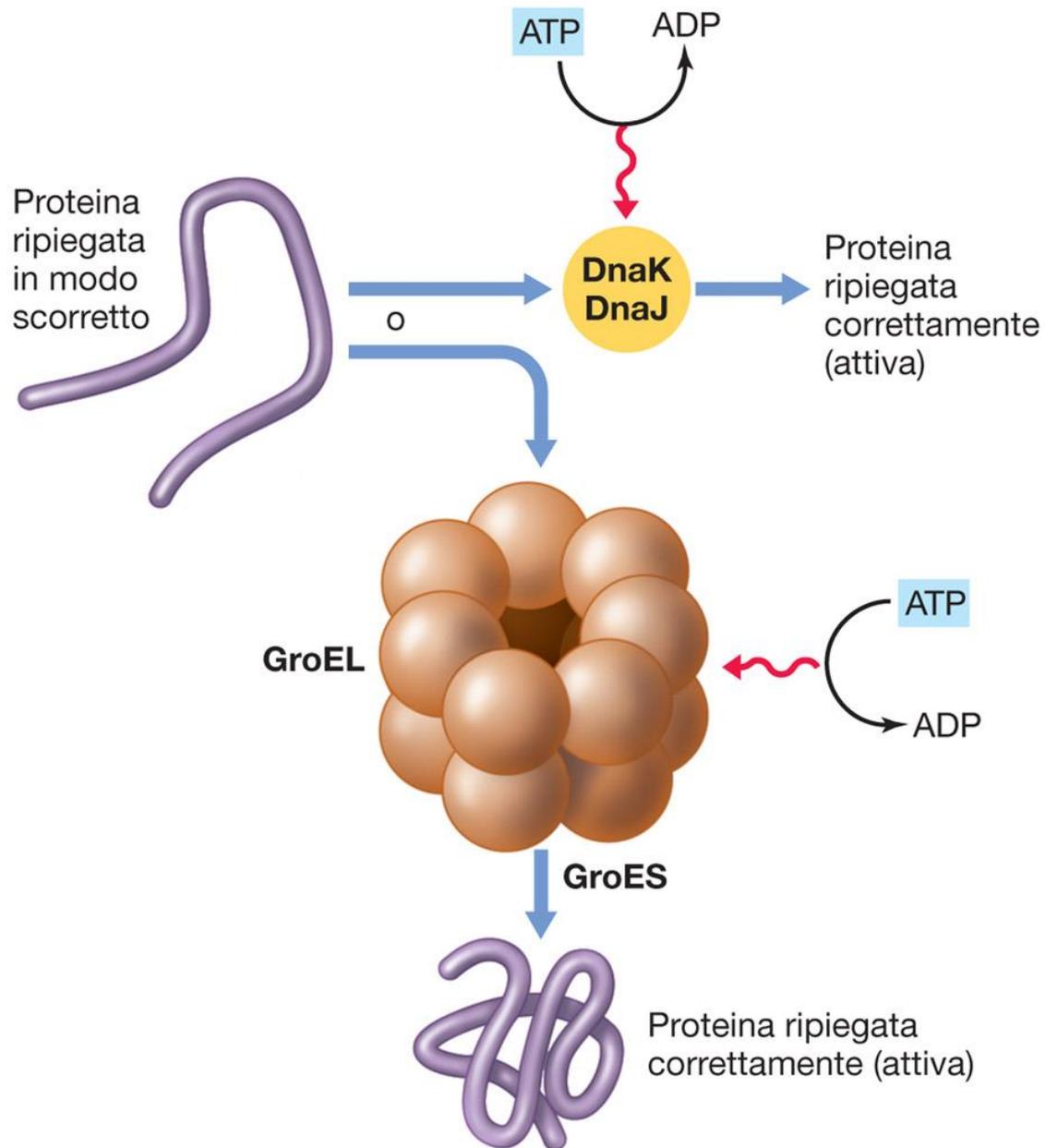


TRADUZIONE: elongazione



Polisoma

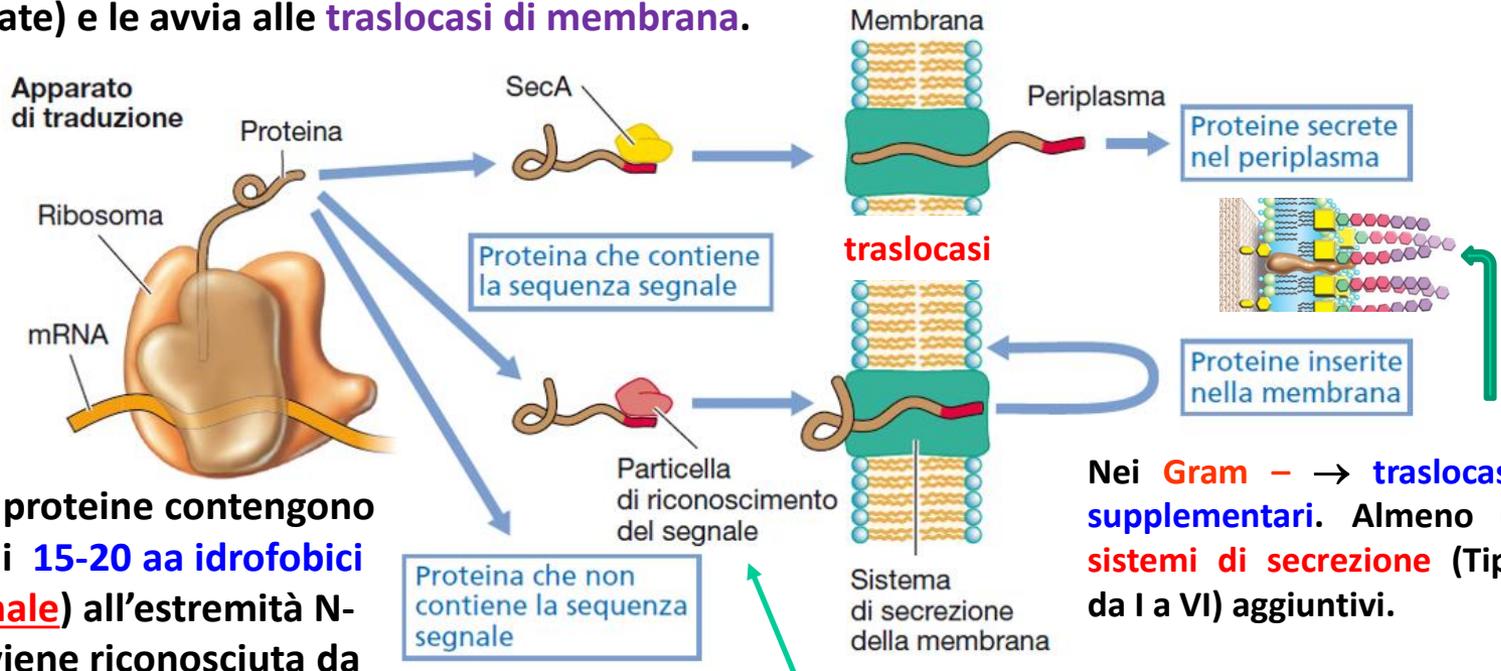




Secrezione proteine

Molte proteine esplicano la loro attività nella membrana citoplasmatica, nello spazio periplasmatico o all'esterno della cellula. Esse devono, pertanto, raggiungere o attraversare la membrana citoplasmatica.

Il **sistema Sec** riconosce le proteine da esportare (non ripiegate) e le avvia alle **traslocasi di membrana**.



Molte di queste proteine contengono una sequenza di **15-20 aa idrofobici** (**sequenza segnale**) all'estremità N-terminale che viene riconosciuta da

SecA o SRP.

Il **sistema Tat** trasporta all'esterno della membrana **proteine (con cofattori)** già **ripiegate** a livello del citoplasma.

Le proteine con brevi sequenze contenenti **coppie di arginina** vengono riconosciute dal **complesso TatBC** che le indirizza verso **TatA** (trasportatore di membrana).

Il **sistema SRP** lega le proteine che devono essere inserite nella membrana.

La proteina viene esportata nel periplasma o nell'ambiente esterno attraverso **traslocasi**; durante questa fase una proteasi rimuove la sequenza segnale (**modificazione post-traduzionale**).

Nei **Gram -** → **traslocasi supplementari**. Almeno **6 sistemi di secrezione** (Tipi da I a VI) aggiuntivi.

Codice degenerato

Tab. 7.5 Il codice genetico a triplette di basi nell'mRNA^a

Codone	Aminoacido	Codone	Aminoacido	Codone	Aminoacido	Codone	Aminoacido
UUU	Fenilalanina	UCU	Serina	UAU	Tirosina	UGU	Cisteina
UUC	Fenilalanina	UCC	Serina	UAC	Tirosina	UGC	Cisteina
UUA	Leucina	UCA	Serina	UAA	- (segnale di stop)	UGA	- (segnale di stop)
UUG	Leucina	UCG	Serina	UAG	- (segnale di stop)	UGG	Triptofano
CUU	Leucina	CCU	Prolina	CAU	Istidina	CGU	Arginina
CUC	Leucina	CCC	Prolina	CAC	Istidina	CGC	Arginina
CUA	Leucina	CCA	Prolina	CAA	Glutamina	CGA	Arginina
CUG	Leucina	CCG	Prolina	CAG	Glutamina	CGG	Arginina
AUU	Isoleucina	ACU	Treonina	AAU	Asparagina	AGU	Serina
AUC	Isoleucina	ACC	Treonina	AAC	Asparagina	AGC	Serina
AUA	Isoleucina	ACA	Treonina	AAA	Lisina	AGA	Arginina
AUG (inizio) ^b	Metionina	ACG	Treonina	AAG	Lisina	AGG	Arginina
GUU	Valina	GCU	Alanina	GAU	Acido aspartico	GGU	Glicina
GUC	Valina	GCC	Alanina	GAC	Acido aspartico	GGC	Glicina
GUA	Valina	GCA	Alanina	GAA	Acido glutamico	GGA	Glicina
GUG	Valina	GCG	Alanina	GAG	Acido glutamico	GGG	Glicina

^a La colorazione delle celle raggruppa gli aminoacidi come segue: ■ ionizzabili acidi, ■ ionizzabili basici, ■ non ionizzabili polari e ■ nonpolari (► fig. 3.12). In ogni tripletta il nucleotide a sinistra è quello all'estremità 5'.

^b Nei Batteri AUG codifica l'*N*-formilmetionina all'inizio degli mRNA.