

Indice

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

A

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 |
| ■ <i>Letture di approfondimento e siti web</i> | 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 |
| ■ <i>Letture di approfondimento</i> | 54 |

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
	■ <i>Lecture di approfondimento e siti web</i>	68

B**ORGANIZZAZIONE ED EVOLUZIONE
DI GENI, CROMOSOMI E GENOMI****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 (phasing) 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
	■ <i>Lecture di approfondimento</i>	95

CAPITOLO 5**Genomi procariotici ed eucariotici**

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: microsatelliti e minisatelliti	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
Letture di approfondimento e siti web	130

REPLICAZIONE E MANTENIMENTO DEL GENOMA

C

CAPITOLO 6

Replicazione del DNA	133
6.1 Replicazione semiconservativa del DNA	134
– L'esperimento 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 in <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
- Meccanismi molecolari che assicurano che la replicazione del DNA possa avvenire una volta sola ogni ciclo cellulare	177
6.8 Alterazioni nei meccanismi di replicazione possono provocare cambiamenti quantitativi di sequenze di DNA nel genoma	179
- Amplificazione genica	180
- Politenizzazione	180
- Diminuzione genica, cromatinica e cromosomica	182
- Micro- e macronucleo dei protozoi ciliati	182
■ <i>Letture di approfondimento</i>	183

CAPITOLO 7

Riparazione del DNA	184
7.1 Mutazioni	184
7.2 Sistemi di riparazione del DNA	187
■ Finestra 7.1 - I meccanismi di riparazione sono funzionalmente conservati in tutti gli organismi viventi, dai procarioti agli eucarioti	188
- Riparazione per escissione delle basi (BER)	190
- Riparazione per escissione di nucleotidi (NER)	192
- Riparazione di errori replicativi (MMR)	195
- Meccanismi di tolleranza al danno (PRR)	195
- Riparazione di rotture su entrambi i filamenti del DNA	197
7.3 Risposta cellulare a danni sul DNA e connessioni tra riparazione e ciclo cellulare	200
■ <i>Letture di approfondimento</i>	203

CAPITOLO 8

Ricombinazione	204
8.1 Introduzione e ricombinazione in meiosi	204
8.2 Ricombinazione omologa o generalizzata	205
■ Finestra 8.1 - Conversione genica	208
– Ricombinazione sito-specifica	209
■ Finestra 8.2 - Proprietà e ciclo virale del fago lambda	210
8.3 Trasposizione	212
■ Finestra 8.3 - I retrovirus	214
8.4 Riarrangiamenti di sequenze di DNA e controllo dell'espressione genica	218
– Cambiamento della specificità d'ospite nel fago Mu	218
– Variazione di fase in <i>Salmonella</i>	219
– Cambiamento del tipo sessuale in lievito (locus <i>MAT</i>)	220
– Variazione antigenica in <i>Trypanosoma</i> (geni <i>VSG</i>)	223
– Ricombinazione V(D)J dei geni per le immunoglobuline nei vertebrati	224
■ <i>Lecture di approfondimento</i>	227

TRASCRIZIONE E SUE REGOLAZIONI**D****CAPITOLO 9**

Trascrizione nei procarioti	231
9.1 Unità di trascrizione	232
9.2 Le tre fasi della trascrizione	233
9.3 Struttura delle RNA polimerasi	236
9.4 Inizio della trascrizione nei procarioti	238
– Promotori e fattore sigma	240
– Diversi fattori sigma controllano promotori diversi	241
■ Finestra 9.1 - Interazioni del fattore σ e dei suoi domini con l'RNA polimerasi e con il promotore	242
9.5 Distacco dell'RNA polimerasi dal promotore e allungamento dell'RNA	244
– Topologia e trascrizione	245
9.6 Terminazione della trascrizione nei procarioti	246
– Terminatori intrinseci	246
– Terminatori Rho-dipendenti	248
■ <i>Lecture di approfondimento</i>	250

CAPITOLO 10

Regolazione della trascrizione nei procarioti	251
10.1 Elementi di controllo nella trascrizione dei procarioti	251
– Attivatori trascrizionali, repressori e operatori	251
– Organizzazione degli operoni procariotici	252

10.2	Operone <i>lac</i>	253
	– Controllo negativo dell'operone <i>lac</i>	253
	Finestra 10.1 - Gli esperimenti di Jacob e Monod	254
	– Repressore Lac e sue interazioni con il promotore	258
	– Controllo positivo dell'operone <i>lac</i> e ruolo di CAP	260
	– Interazione della regione promotore/operatore con CAP, repressore Lac e RNA polimerasi	264
10.3	Operone del triptofano	265
	Finestra 10.2 - Operoni inducibili e reprimibili, controlli negativi e controlli positivi	266
	– Regolazioni a livello di terminazione della trascrizione	268
10.4	Controllo dell'espressione genica nel fago lambda	269
	– I due cicli vitali del fago lambda: ciclo litico e ciclo lisogenico	271
	– Ciclo litico	273
	– Ciclo lisogenico	275
	– Regione di controllo del fago	275
	– Struttura del repressore e di Cro	276
	– CI e Cro si legano con diversa affinità alla regione di controllo	278
	– Il repressore CI e Cro controllano in modo mutuamente esclusivo la trascrizione nella regione di controllo del fago lambda	279
	– Legame cooperativo del repressore al DNA	280
	– Induzione del ciclo litico di lambda in un batterio lisogenico	282
	– Ruolo dell'attivatore trascrizionale CII	283
	Finestra 10.3 - Identificazione di mutazioni nella regione di controllo	283
	– Controllo dell'integrazione e dell'escissione del fago nel cromosoma di <i>Escherichia coli</i>	285
	■ <i>Letture di approfondimento</i>	287

CAPITOLO 11

	Trascrizione e regolazione negli eucarioti	288
11.1	Tre sistemi di trascrizione nel nucleo	289
11.2	Promotore dei geni per gli rRNA e fattori che regolano la trascrizione dell'RNA polimerasi I	291
11.3	RNA polimerasi III: promotori di Pol III interni ed esterni e suoi fattori di trascrizione	294
11.4	RNA polimerasi II: struttura del promotore minimo di Pol II	294
	– Fattori basali di Pol II e assemblaggio del complesso d'inizio	297
	– Ruolo del "mediatore" nella trascrizione di Pol II	299
	Finestra 11.1 - Il "mediatore" e la sua scoperta	301
	– Struttura di Pol II e reazione di allungamento nella sintesi dell'RNA	302
11.5	Regolazione	304
	– Struttura modulare dei promotori eucariotici	304
11.6	Struttura modulare e domini dei fattori di trascrizione (transattivatori)	309
11.7	Domini funzionali dei transattivatori: domini di legame al DNA	311
	– Elica-giro-elica (<i>helix-turn-helix</i>) e omeodominio	312
	– Dominio a dita di zinco (<i>zinc finger</i>)	313
	– Domini a cerniere di leucina (<i>leucine zipper</i>)	314

- Dominio elica-ansa-elica (*helix-loop-helix*) 315
- Controllo combinatoriale della trascrizione 316
- Reclutamento del complesso di trascrizione 319
- Attivatori e cromatina 319

Finestra 11.2 - I fattori di trascrizione agiscono attraverso una vasta rete di interazioni 320

- Attivazione e segnali 323
- Recettori degli ormoni steroidei 323
- Risposta all'AMP ciclico e fattore CREB 323
- Fattore trascrizionale NF- κ B 324

Lecture di approfondimento 325

PROCESSAMENTO E MATURAZIONE DELL'RNA

E

CAPITOLO 12

Maturazione dell'RNA: tagli nucleolitici e modificazioni chimiche 329

12.1 Processamento degli rRNA nei procarioti e negli eucarioti 329

Finestra 12.1 - Le nucleasi 330

12.2 Processamento dei tRNA nei procarioti e negli eucarioti 332

12.3 Ribozimi autocatalitici a "testa di martello" 333

12.4 Modificazioni chimiche delle basi e del ribosio 335

- Modificazioni chimiche delle basi nei tRNA procarioti ed eucarioti 336

- Modificazioni chimiche degli rRNA eucariotici 336

Finestra 12.2 - Il nucleolo 337

12.5 Aggiunta del "cap" agli mRNA eucariotici 339

12.6 Poliadenilazione e terminazione della trascrizione degli mRNA eucariotici 342

- Funzioni della coda di poli(A) 345

- Turnover della coda di poli(A) 345

- Poliadenilazione nei procarioti e negli organelli 345

Lecture di approfondimento 346

CAPITOLO 13

Splicing ed editing 347

13.1 Splicing 347

- Geni "discontinui" e splicing 347

- Meccanismo dello splicing nucleare 350

Finestra 13.1 - Splicing e patologie 356

- Autosplicing: introni di gruppo I e II 357

- Splicing del tRNA 359

- Trans-splicing 360

	- Accoppiamento tra splicing e trascrizione	362
	- Splicing alternativo	363
	- Regolazione dello splicing	365
13.2	Editing	368
	- Editing per conversione di basi	369
	- Editing inserzionale	372
13.3	Traslocazione nucleo-citoplasmatica degli RNA	375
	■ <i>Letture di approfondimento</i>	376

F

TRADUZIONE E SUE REGOLAZIONI

CAPITOLO 14

Apparato di traduzione e suoi componenti

14.1	Ribosoma	379
	- rRNA	381
	- r-proteine	381
	- Struttura tridimensionale	384
	- Ribosoma come ribozima	388
14.2	RNA transfer (tRNA, RNA di trasferimento) e amminoacil-tRNA sintetasi	389
	■ Finestra 14.1 - Quanti amminoacidi sono codificati dal codice genetico?	391
14.3	RNA messaggero (mRNA)	395
	■ Finestra 14.2 - La coda di poli(A) come maniglia per purificare l'mRNA	396
	■ <i>Letture di approfondimento</i>	397

CAPITOLO 15

Meccanismo della sintesi proteica

15.1	Inizio nei procarioti	400
	- tRNA di inizio	400
	- Riconoscimento del sito di inizio sull'mRNA	401
	- Fattori di inizio nei procarioti	402
	- Processo di inizio della traduzione nei procarioti	403
15.2	Inizio negli eucarioti	404
	- Fattori di inizio negli eucarioti	405
	- Processo di inizio della traduzione negli eucarioti	406
	- Meccanismo di inizio alternativo cap-indipendente negli eucarioti	410
15.3	Allungamento	410
	■ Finestra 15.1 - Mimetismo molecolare dei fattori che interagiscono con il sito a del ribosoma	415
15.4	Terminazione	416
15.5	Bilancio energetico	416
	■ Finestra 15.2 - Sistemi di sintesi proteica <i>in vitro</i>	418
15.6	Velocità e accuratezza della sintesi proteica	418
15.7	Traduzione a livello strutturale	419

Finestra 15.3 - Inibitori della sintesi proteica e antibiotici	420
<i>Letture di approfondimento</i>	422
CAPITOLO 16	
Regolazione della traduzione	423
16.1 Regolazione generale della traduzione	423
– “Risposta stringente” nei procarioti	423
– Controllo generale della traduzione negli eucarioti	424
16.2 Regolazioni traduzionali di geni specifici	425
– Controlli traduzionali autogeni	426
– Controlli traduzionali non autogeni	428
16.3 Regolazione della stabilità e degradazione degli mRNA	432
– Degradazione dell’ mRNA nei procarioti	432
– Degradazione dell’ mRNA nelle cellule eucariotiche	432
– Meccanismi di “controllo qualità” dell’ mRNA	435
Finestra 16.1 - Patologie dell’apparato di traduzione	439
16.4 Trasporto e localizzazione degli mRNA	440
– Localizzazione dell’ mRNA di ASH1 in lievito	440
– Localizzazione di mRNA nell’ uovo di <i>Drosophila</i>	442
– Localizzazione di mRNA nei dendriti neuronali	443
16.5 Granuli citoplasmatici di RNA	444
<i>Letture di approfondimento</i>	445

ALTRI LIVELLI DI REGOLAZIONE: REGOLAZIONI EPIGENETICHE E POST-TRADUZIONALI, RUOLI DI RNA NON CODIFICANTI (ncRNA)

G

CAPITOLO 17	
Regolazioni epigenetiche: metilazione del DNA e rimodellamento della cromatina	449
17.1 Metilazione del DNA ed espressione genica	449
Finestra 17.1 - Epigenesi, epigenetica e regolazioni epigenetiche	450
– Metilazione del DNA genomico nei mammiferi	450
Finestra 17.2 - Identificazione delle CpG metilate nel DNA genomico	451
– Isole CpG	452
– Metilazione delle CpG e trascrizione	454
– Imprinting genetico	454
Finestra 17.3 - Regolazioni epigenetiche e patologia	456
17.2 Rimodellamento della cromatina	456
– Modificazioni post-traduzionali degli istoni	457
– Complessi di rimodellamento (rimodellatori) ATP-dipendenti	458
– Sostituzione di varianti istoniche	460
<i>Letture di approfondimento</i>	460

CAPITOLO 18**Ruoli regolativi dei ncRNA e l'ipotesi del mondo a RNA**

	461
18.1 RNA regolatori nei procarioti	462
- sRNA	462
- Riboswitch	463
18.2 RNA regolatori negli eucarioti	464
- MicroRNA	464
- Lunghi RNA non codificanti (lncRNA)	468
18.3 Il mondo a RNA e l'origine della vita sulla Terra	471
■ <i>Letture di approfondimento</i>	474

CAPITOLO 19**Modificazioni e regolazioni post-traduzionali di proteine**

	475
19.1 Stabilità e processamento di proteine	476
19.2 Ubiquitinazione di proteine	478
19.3 Sumoilazione di proteine	481
19.4 Fosforilazione e defosforilazione di proteine	483
19.5 Acetilazione di proteine	488
19.6 Metilazione di proteine	489
19.7 Glicosilazione e modificazioni lipidiche di proteine	490
■ <i>Letture di approfondimento</i>	493

H**APPROCCI, TECNICHE E MODELLI
IN BIOLOGIA MOLECOLARE****CAPITOLO 20****Tecniche della Biologia Molecolare**

	497
20.1 Tecniche spettrofotometriche per l'analisi della denaturazione e riassociazione del DNA	497
- Spettro di assorbimento	497
- Denaturazione del DNA, T_m	498
- Riassociazione del DNA, cinetica di riassociazione, Cot	499
20.2 Uso di sonde di DNA per l'identificazione e analisi di sequenze nucleotidiche	502
■ Finestra 20.1 - Marcatura del DNA con atomi radioattivi	503
- Ibridazione a saturazione	503
- Ibridazione <i>in situ</i> o citologica	503
- Southern e Northern blot	504
- Ibridazione su colonia o su placca	505
- Microarray (o microchip)	505

20.3	Ultracentrifugazione	506
	– Sedimentazione in gradienti di saccarosio	507
	– Gradienti di densità di cloruro di cesio (CsCl)	510
	Finestra 20.2 - Ultracentrifuga analitica	512
20.4	Tecnologie di base per l'isolamento e la manipolazione di geni	512
	Finestra 20.3 - Utilizzo dell'elettroforesi per separare molecole di acidi nucleici e proteine	514
	– Enzimi di restrizione e DNA ligasi	516
	– Vettori di clonaggio	519
	– Plasmidi	519
	– Trasformazione di cellule di <i>Escherichia coli</i> e selezione dei trasformanti	521
	– Plasmidi della serie pUC: selezione bianco o blu	522
	– Vettori di espressione e produzione di proteine ricombinanti	522
	– Batteriofago lambda come vettore di clonaggio	528
	– Cosmidi	529
	– Vettori per il clonaggio e l'espressione in cellule eucariotiche	529
	– Vettori di lievito	531
	– Vettori per il trasferimento genetico in cellule animali	534
	– Trasferimento di DNA nei vegetali	535
20.5	Banche di DNA	536
	– Banche genomiche	536
	– Rappresentatività di una libreria di DNA genomico	538
	– Librerie di cDNA	539
	– Identificazione del clone contenente il DNA d'interesse da una libreria	541
20.6	PCR: reazione a catena della polimerasi	547
20.7	Determinazione della sequenza nucleotidica del DNA	550
20.8	Piattaforme di sequenziamento di nuova generazione	554
20.9	Metodologie recenti per la modificazione mirata dei genomi ("genome editing")	565
	Finestra 20.4 - Il northern blot e il western blot	566
	– Zinc-Finger e TALE nucleasi (ZFN e TALEN)	567
	– Il sistema CRISPR/Cas9	568
20.10	Valutazione dell'espressione di un gene	569
20.11	Inibizione dell'espressione di geni specifici: RNA antisense e interferenza da RNA	571
	Finestra 20.5 - Mutagenesi sito-specifica o mutagenesi mirata	572
20.12	Interazioni tra macromolecole biologiche	574
	– Interazioni proteina-DNA	574
	– Interazioni proteina-proteina	581
	Letture di approfondimento	588
CAPITOLO 21		
Bioinformatica e Genomica		589
21.1	Sequenziamento e assemblaggio di genomi completi	589
21.2	Sequenziamento del trascrittoma	593
21.3	Identificazione e annotazione di geni	597
21.4	Confronto e allineamento di sequenze	598

21.5	Identificazione e annotazione di regioni regolatorie e caratterizzazione delle proprietà epigenetiche della cromatina	600
	■ Finestra 21.1 - Rappresentazione di motivi regolativi mediante il sequence logo	602
21.6	Annotazione delle sequenze proteiche	603
21.7	Banche dati e browser genomici	604
21.8	Evoluzione molecolare	605
	■ <i>Indirizzi web delle principali risorse bioinformatiche</i>	607

CAPITOLO 22

	Organismi modello	608
22.1	Il lievito <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	610
22.2	Il moscerino della frutta <i>Drosophila melanogaster</i>	616
22.3	Il nematode <i>Caenorhabditis elegans</i>	620
22.4	L'anfibio <i>Xenopus laevis</i> e il suo successore <i>Xenopus tropicalis</i>	622
22.5	Il pesce <i>Danio rerio</i> o "zebrafish"	625
22.6	Il topo comune <i>Mus musculus</i>	628
22.7	La pianta <i>Arabidopsis thaliana</i>	634
	■ <i>Lecture di approfondimento</i>	635
	Indice analitico	637

Risorse online: Appendice A

I sistemi modello vegetali