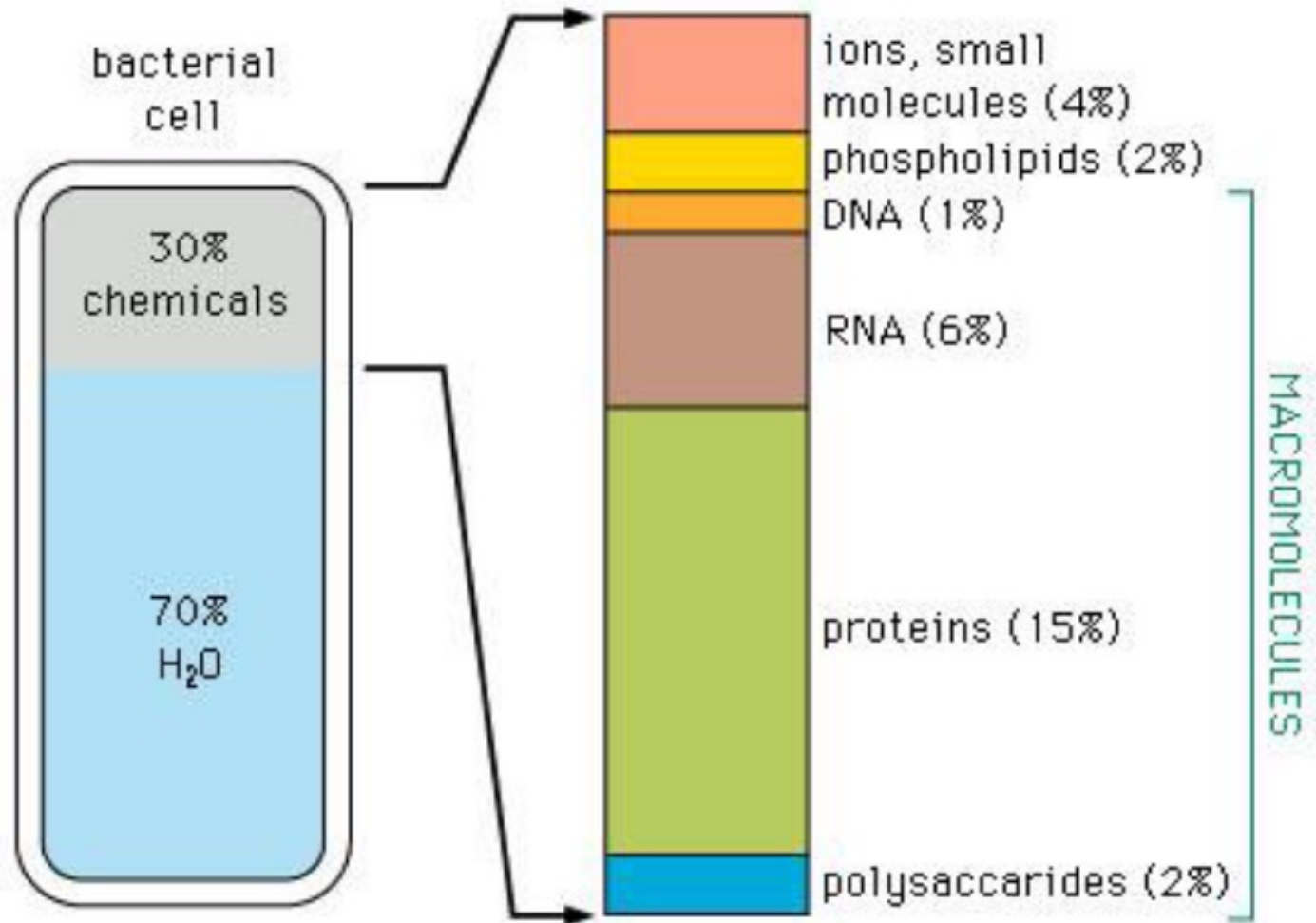


STRUTTURA E FUNZIONE DELLE PROTEINE

PROTEINE

Sono le **macromolecole più abbondanti** della cellula, **50% del peso secco di una cellula**

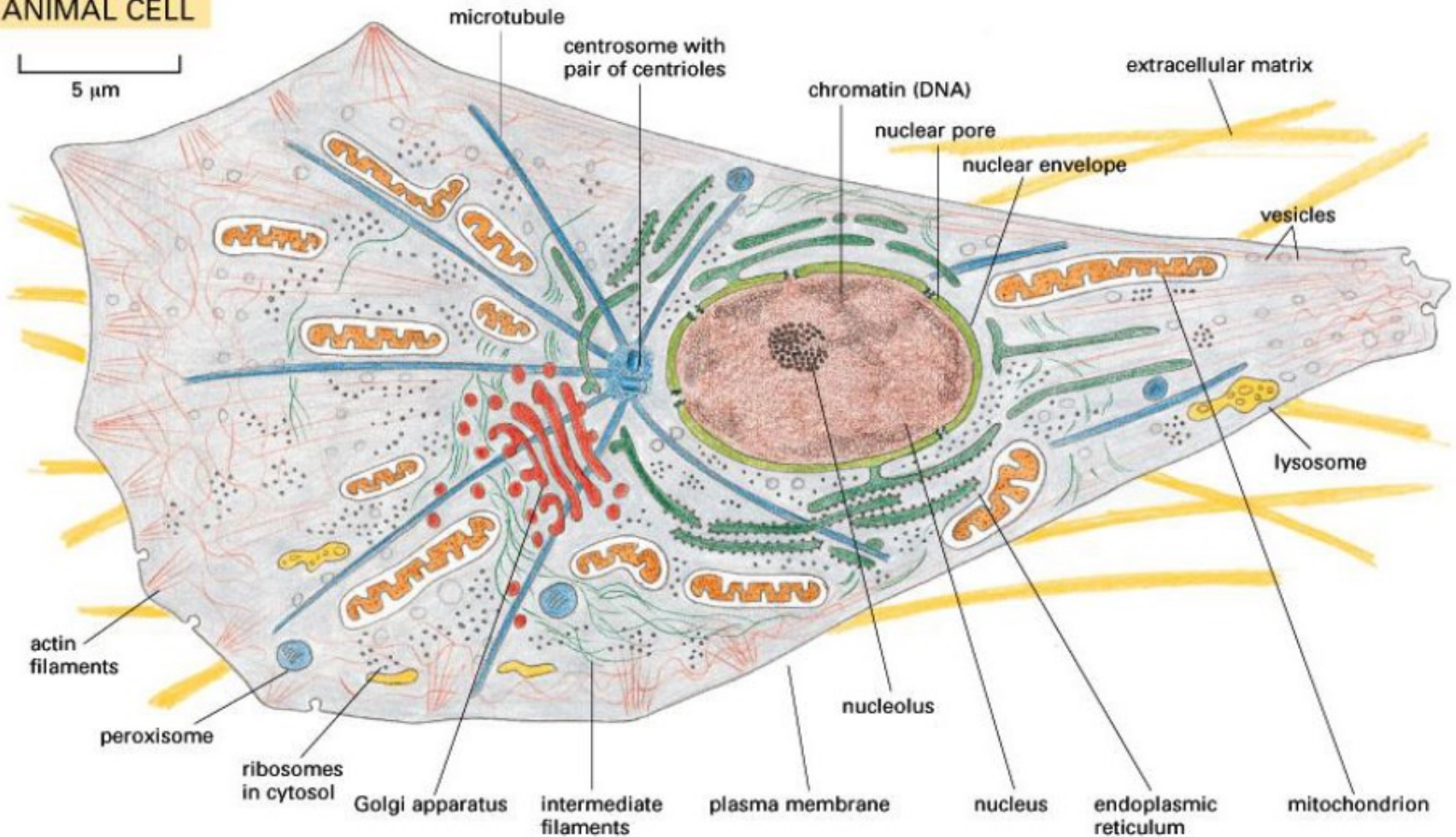


Le **proteine** sono le macromolecole più abbondanti e sono presenti in tutti i compartimenti cellulari

©1998 GARLAND PU

ANIMAL CELL

5 μm



Quante proteine



Genoma umano: circa **25000 geni**

↓ splicing alternativo

↓ modificazioni post-traduzionali

1 milione di proteine diverse

circa **20000-50000 proteine** diverse
espresse simultaneamente in una
cellula umana

Funzioni delle proteine

STRUTTURALE

- intelaiatura citoscheletrica
- strutture cellulari
- impalcatura di sostegno extracellulare
- deposito

NON STRUTTURALE

- catalisi (enzimi)
- trasporto
- movimento
- riconoscimento
- difesa
- segnalazione

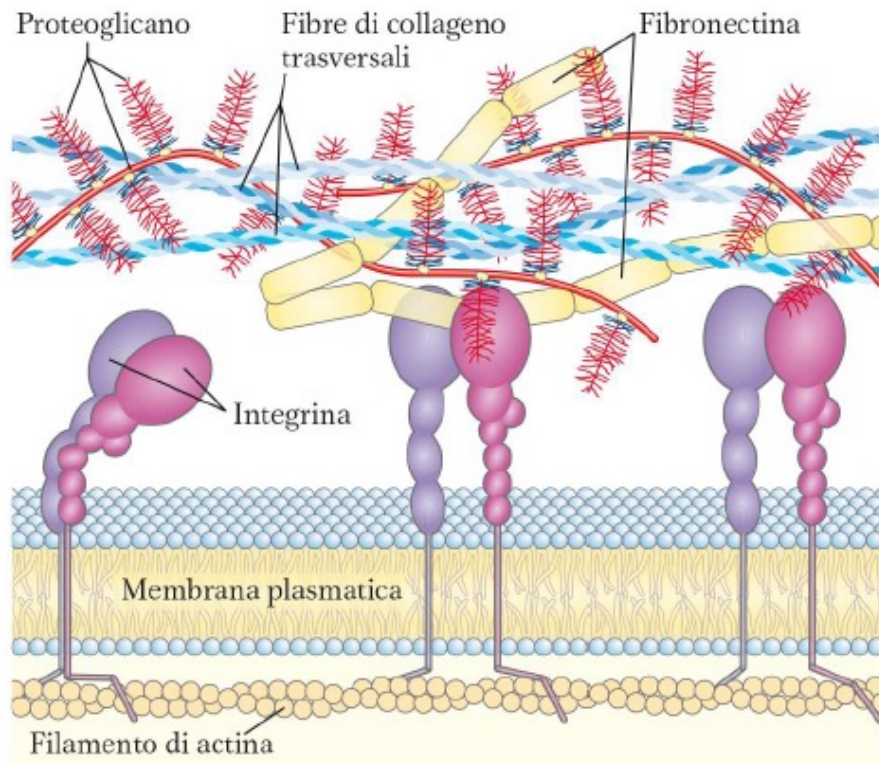
LE MOLECOLE PROTEICHE CHE SVOLGONO TUTTE QUESTE FUNZIONI HANNO STRUTTURA MOLTO SIMILE E CONSERVATA EVOLUTIVAMENTE

Enzimi

Catalizzano le reazioni chimiche

Proteine strutturali

Costituiscono parte delle strutture **extracellulari**:
collagene, elastina, cheratina, fibronectina
e della «impalcatura» interna (citoscheletro):
spettrina, desmina, distrofina



- **Proteine contrattili**

Responsabili della contrazione muscolare e di diverse forme di locomozione cellulare (flagelli, cilia, fuso mitotico)

- Es. actina, miosina, tubulina

- **Proteine di difesa**

- Riconoscono/ inattivano sostanze estranee, proteggono l'organismo dalle infezioni batteriche e virali

Es. immunoglobuline (anticorpi), interferone, cascata del complemento

- Proteggono l'organismo dalla perdita di sangue dovuta a lesioni vascolari

Es. proteine (fattori) della coagulazione

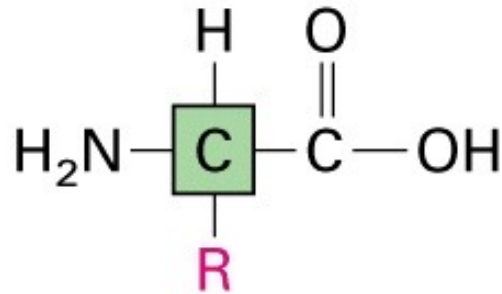
- Proteine regolatrici Regolano diverse processi cellulari
Es. ormoni, fattori di crescita, fattori di trascrizione.
- Recettori Legano ormoni, fattori di crescita, neurotrasmettitori
- Pompe e canali ionici Assicurano il trasporto di ioni e composti organici attraverso le membrane sulle quali sono organizzate.

- **Proteine di trasporto** Assicurano il trasporto nei liquidi biologici di molecole altrimenti insolubili.
Es. emoglobina, albumina, lipoproteine, transferrina
- **Proteine di deposito** Rappresentano un deposito di energia o di particolari molecole/composti.
Es. caseina, mioglobina, ferritina

La struttura delle proteine ne determina la funzione

- Le proteine sono singole catene, non ramificate di monomeri amino acidici
- Ci sono 20 differenti amino acidi
- La sequenza degli amino acidi di una proteina ne determina la sua struttura tridimensionale (conformazione)
- A sua volta, la struttura di una proteina ne determina la funzione

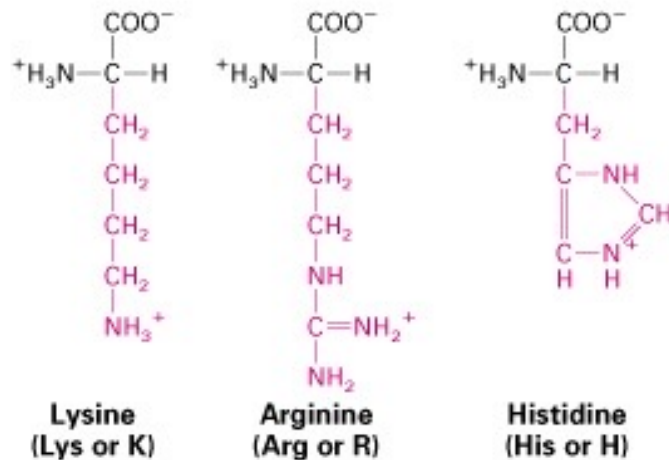
Tutti gli amino acidi hanno la stessa struttura generale ma ciascuno differisce per il gruppo
R



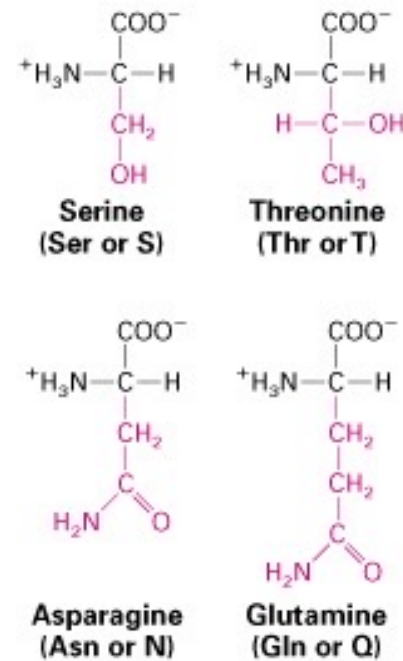
Amino acid

Amino Acidi Idrofilici

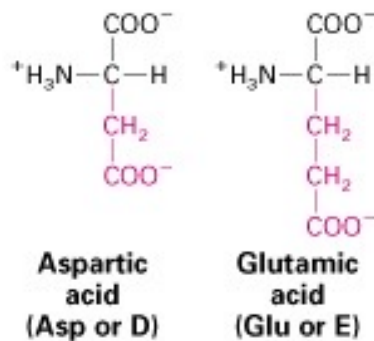
Basic amino acids



Polar amino acids with uncharged R groups

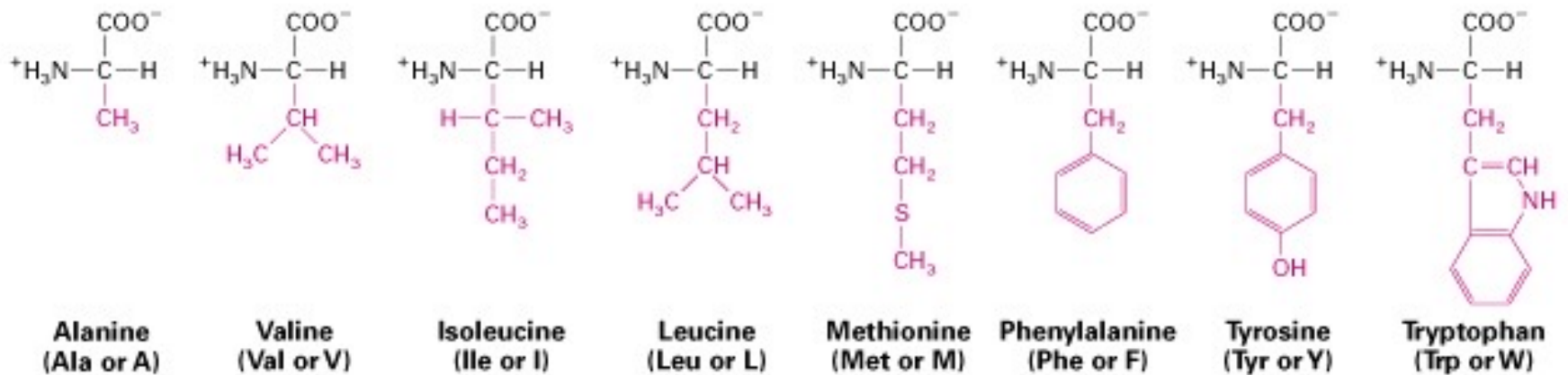


Acidic amino acids

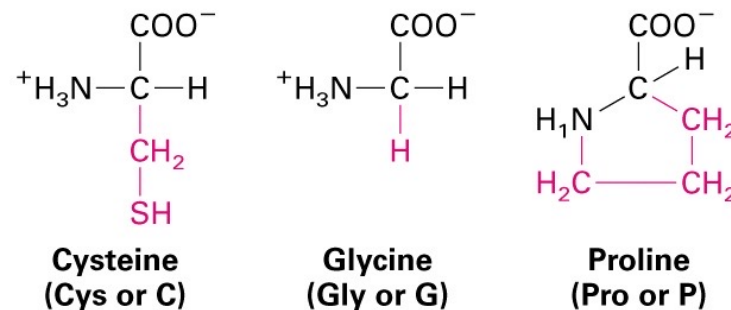


Amino acidi idrofobici e amino acidi “speciali”

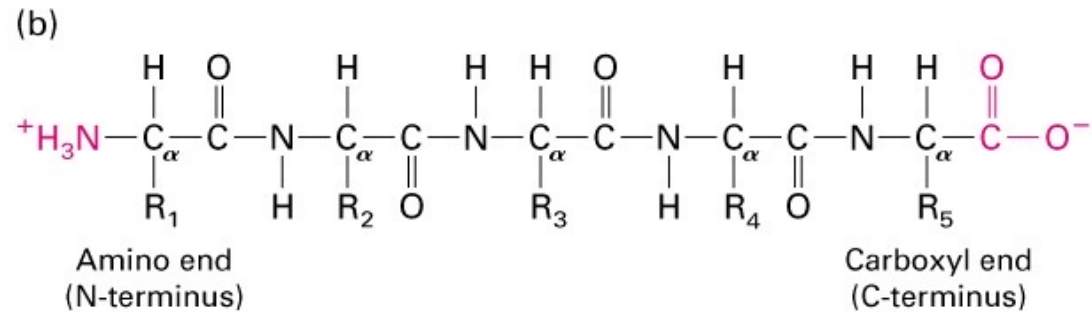
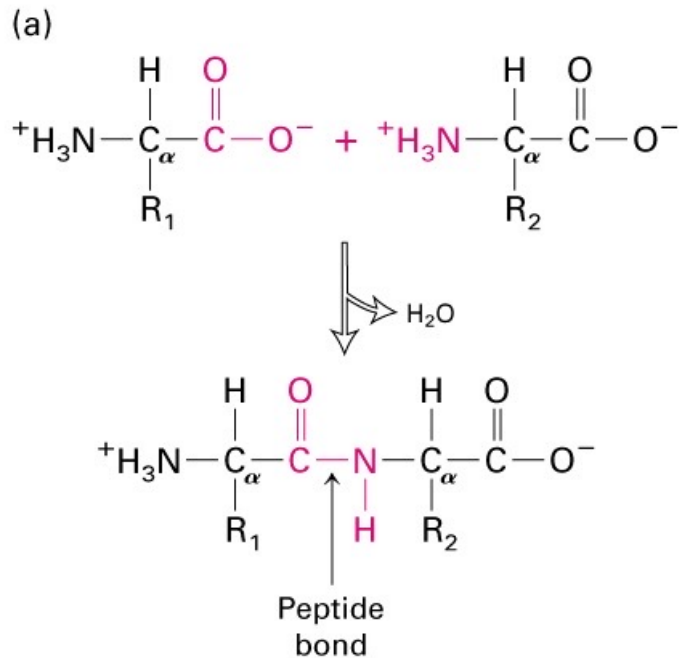
HYDROPHOBIC AMINO ACIDS



SPECIAL AMINO ACIDS



I legami peptidici uniscono gli aminoacidi in catene lineari



Quattro livelli di struttura determinano la forma di una proteina

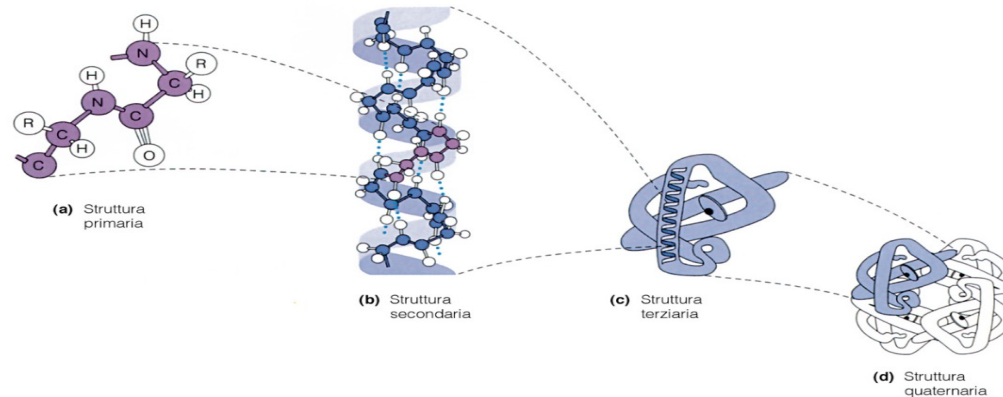


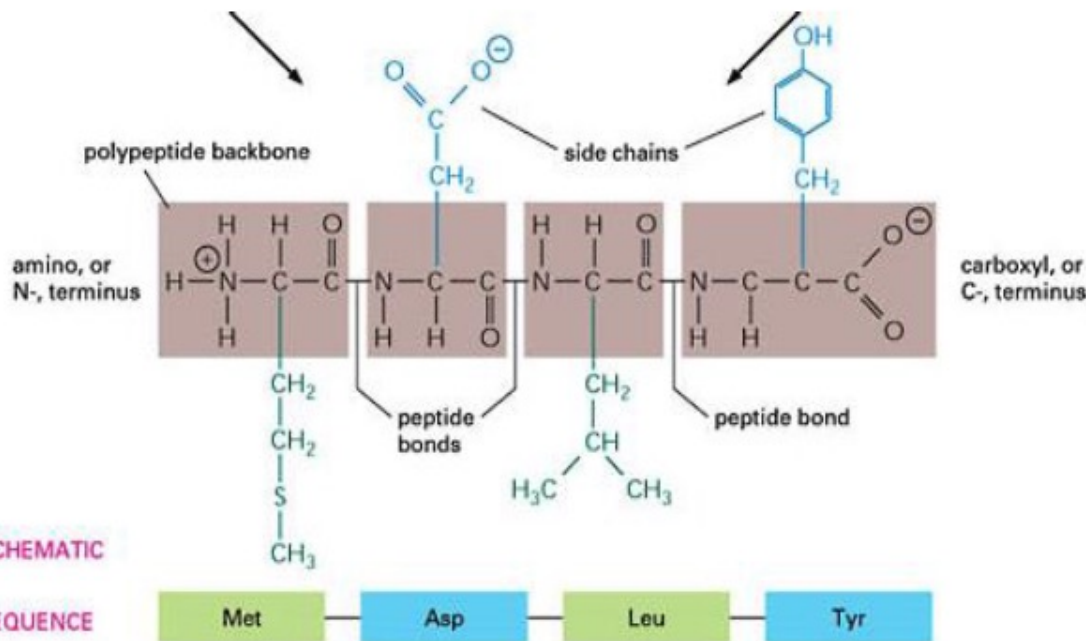
Figura 3-5

- **Primaria**: la sequenza lineare degli amino acidi
- **Secondaria**: l'organizzazione di parti di una catena polipeptidica (esempio: l' α elica o il foglietto β)
- **Terziaria**: la struttura tridimensionale completa di una catena polipeptidica
- **Quaternaria**: l'associazione di due o più polipeptidi in una struttura complessa multi-subunità

Struttura Primaria

= peculiare sequenza amminoacidica di una catena polipeptidica

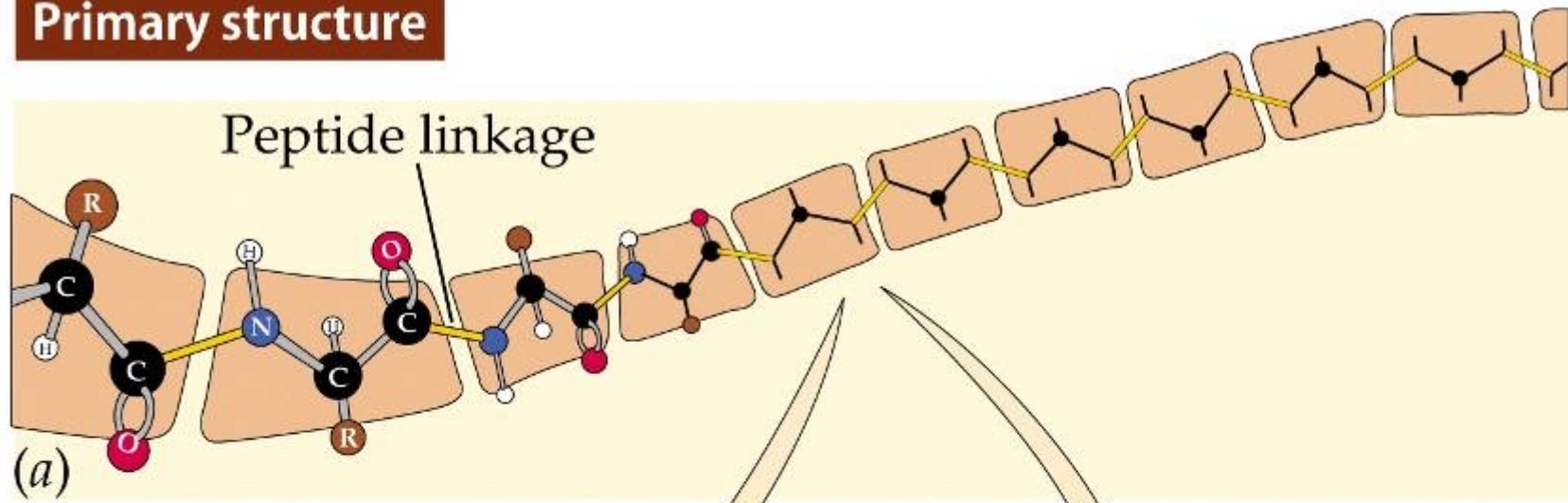
- linear (1 dimensional)
- sequence of amino acid polymer
- by convention, written from **amino end to carboxyl end**
- a perfectly linear amino acid polymer is neither functional nor energetically favorable → folding!



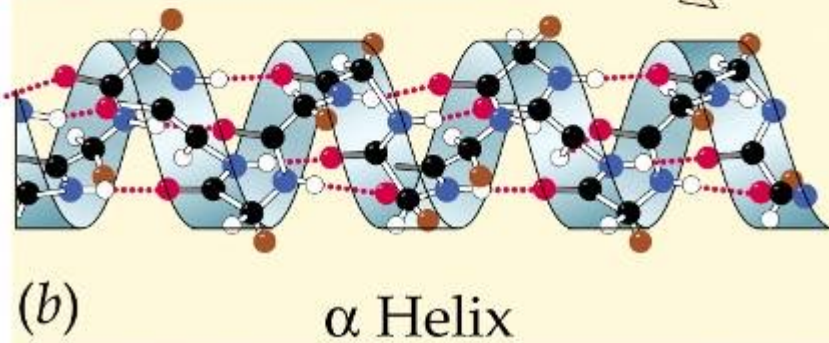
SCHEMATIC

SEQUENCE

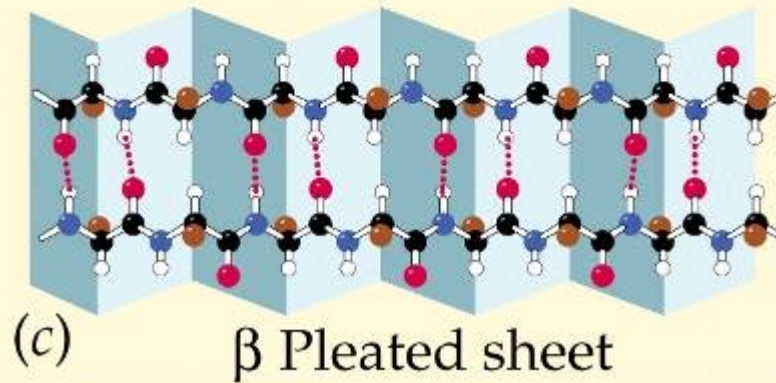
Primary structure



Secondary structure



α Helix



(c)

β Pleated sheet

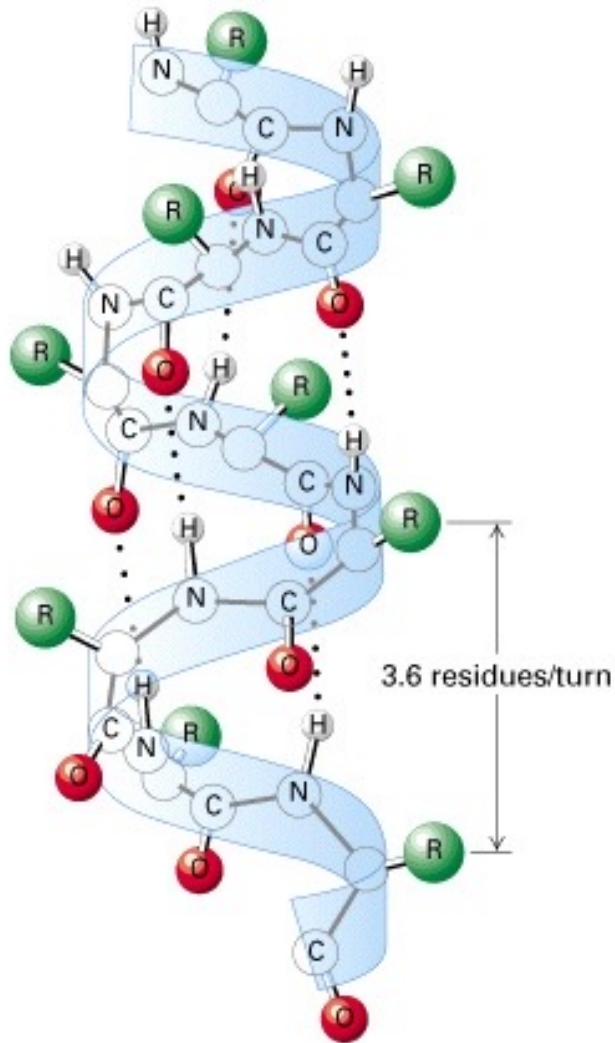
© 2001 Sinauer Associates, Inc.

Le strutture secondarie: Due strutture secondarie principali: alfa elica e foglietto beta.

coinvolgono schemi ripetitivi di strutture locali. Sono mantenute da legami idrogeno tra gli atomi coinvolti nei legami peptidici. Non coinvolgendo i residui laterali sono entrambe strutture molto comuni.

Strutture secondarie: l' α elica

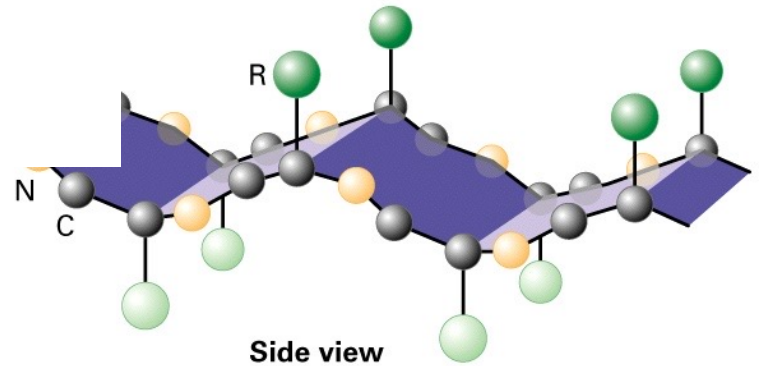
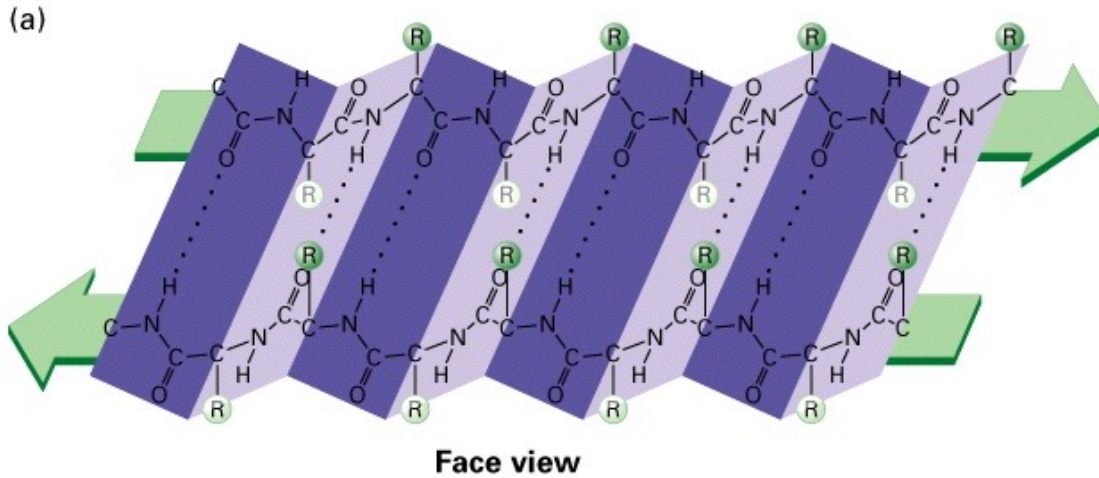
Forma a spirale, costituita da uno scheletro di legami peptidici, da cui sporgono i gruppi R dei singoli amminoacidi



Questo modulo avvicina i legami peptidici di ciascun amminoacido con il 4° successivo, tra i quali si viene a formare un legame idrogeno.

Brevi regioni ad α elica sono particolarmente abbondanti in proteine poste nella membrana cellulare. In qs caso le regioni formate per lo più da amminoacidi con residui non polari schermano l'ossatura idrofilica chiusa su se stessa dai legami idrogeno.

Strutture secondarie: il foglietto beta



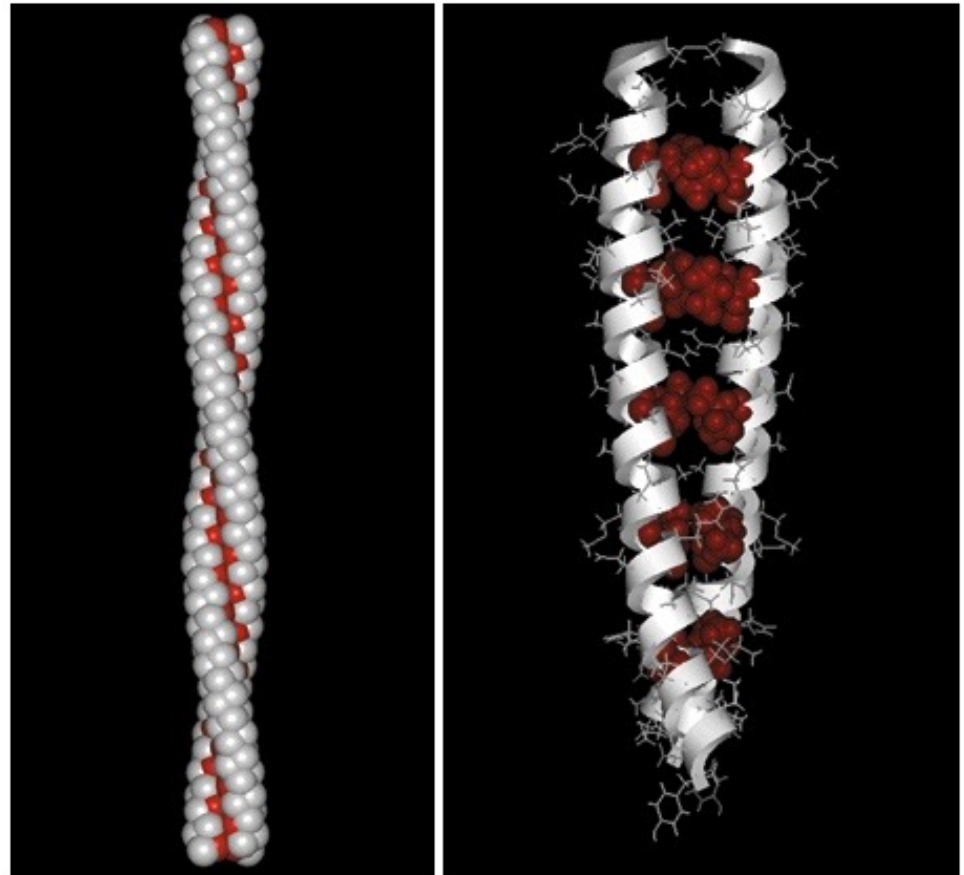
Conformazione distesa, simile ad un foglietto ripiegato, stabilizzata da legami idrogeno tra i gruppi carbonilici e imminici dei legami peptidici di polipeptidi adiacenti (paralleli o antiparalleli) o di segmenti adiacenti dello stesso polipeptide ripiegato su se stesso (antiparalleli).

I motivi sono combinazioni regolari di strutture secondarie

In alcune proteine sono presenti combinazioni di strutture alfa e beta a formare dei motivi

Un “coiled coil motif” è formato da due o più alfa eliche avvolte l’una intorno all’altra, formando una struttura molto stabile. (es: α -cheratina). Questo può accadere quando le 2 o 3 eliche hanno la maggior parte delle loro catene laterali non polari.

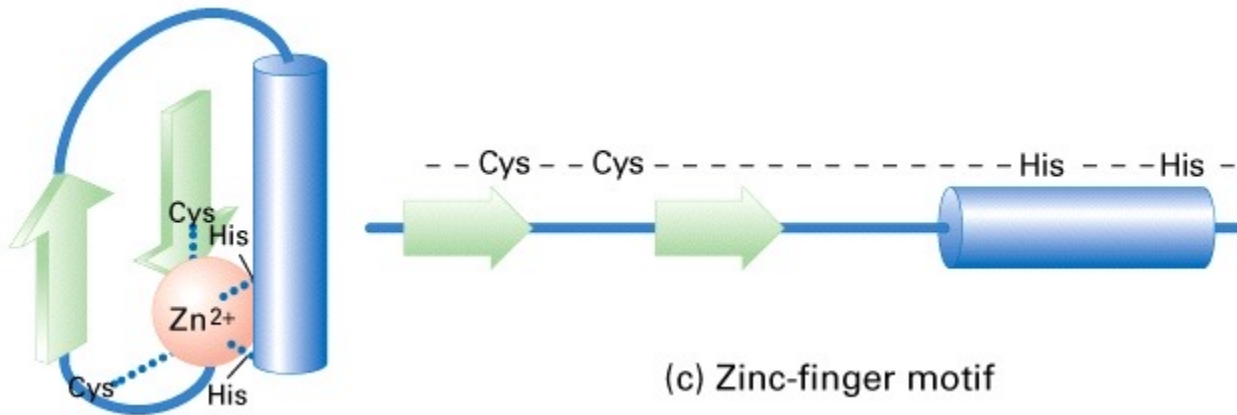
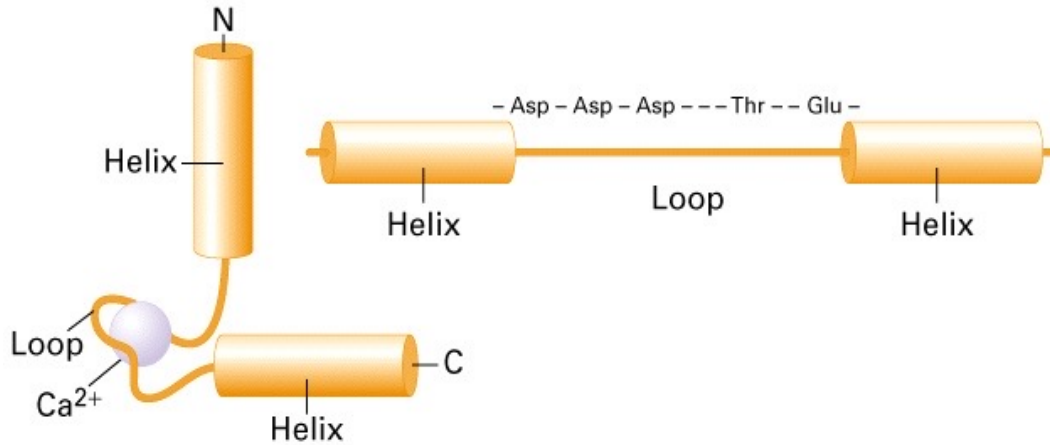
Quando uno stesso motivo è presente in diverse proteine, esso serve in genere per lo stesso scopo.



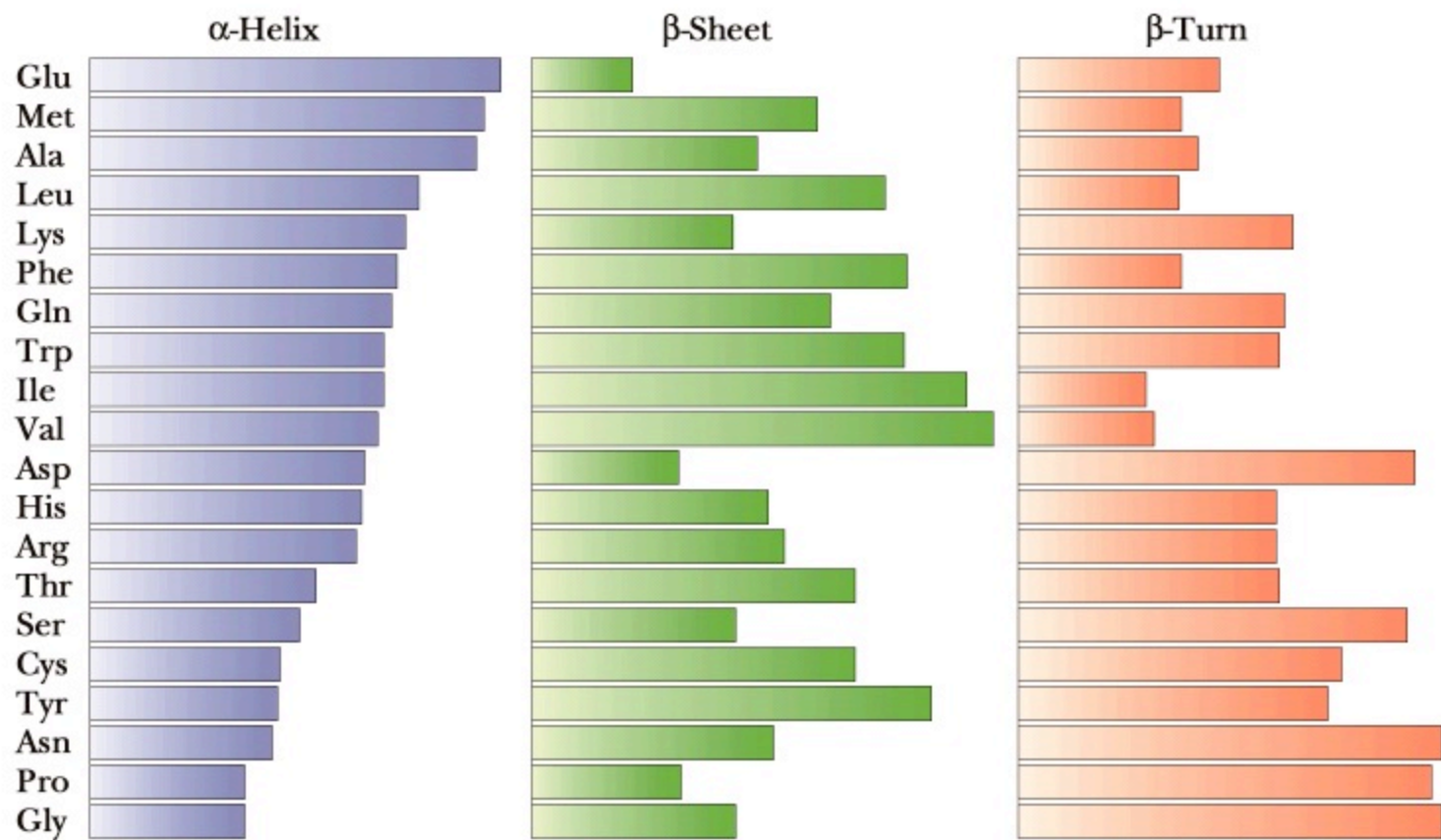
Altri esempi di motivi

(b) Helix-loop-helix motif

Motivo caratteristico delle proteine che legano il DNA



(c) Zinc-finger motif



Tertiary structure is stabilized by a **variety of interactions** among R groups and between R groups and the polypeptide backbone.

- **hydrogen bonds**

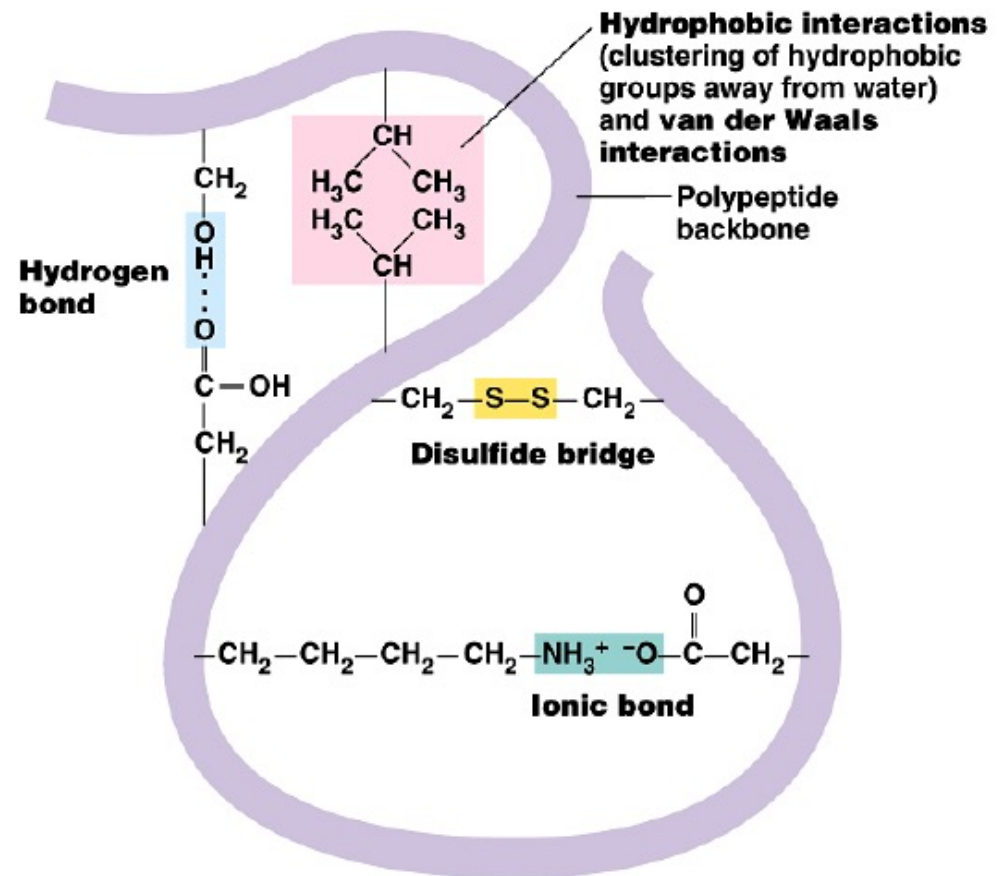
among polar and/or charged areas;

- **ionic bonds**

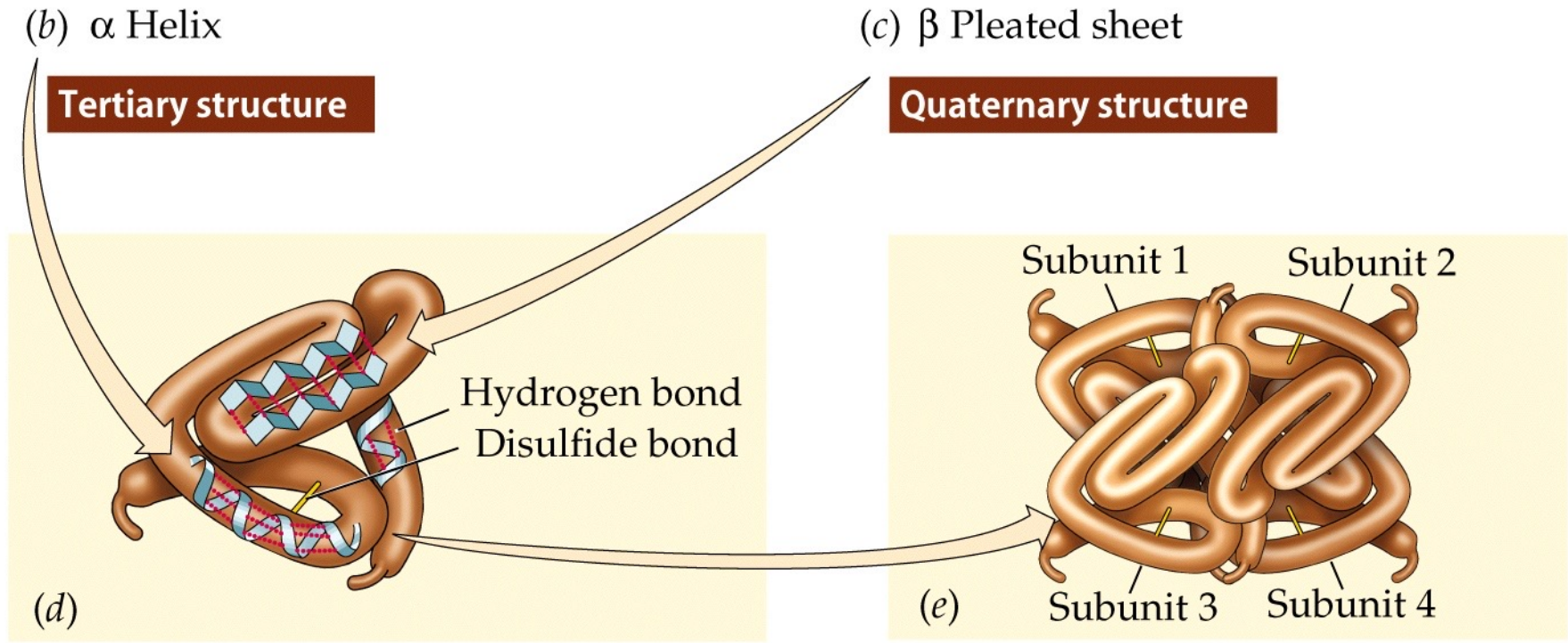
between charged R groups;

- **hydrophobic interactions** and **van der Waals interactions** among hydrophobic R groups.

- **disulfide bridges**, strong **covalent bonds** that form between the sulfhydryl groups (SH) of cysteine monomers, **stabilize the structure**.

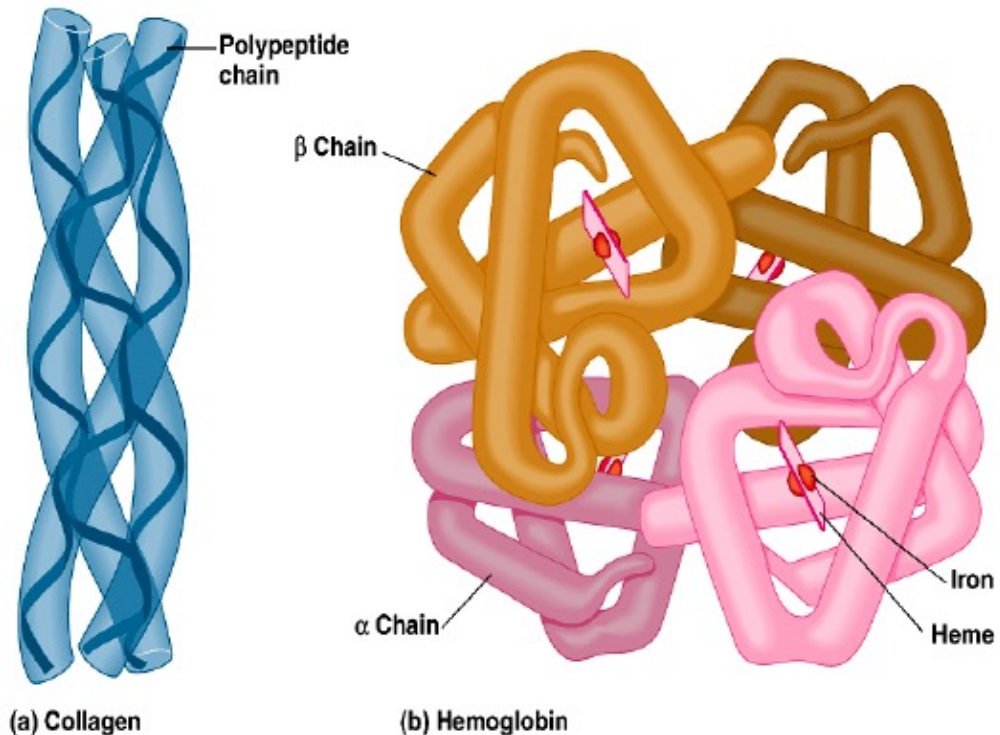


La struttura quaternaria: è l'organizzazione di più polipeptidi (uguali o diversi) in un'unica unità funzionale che consiste di più di una subunità polipeptidica.



Quaternary structure results from the aggregation of two or more polypeptide subunits

- Collagen is a fibrous protein of **three** polypeptides that are supercoiled like a rope.
 - This provides the structural strength for their role in connective tissue.
- Hemoglobin is a globular protein with **two copies of two kinds** of polypeptides.

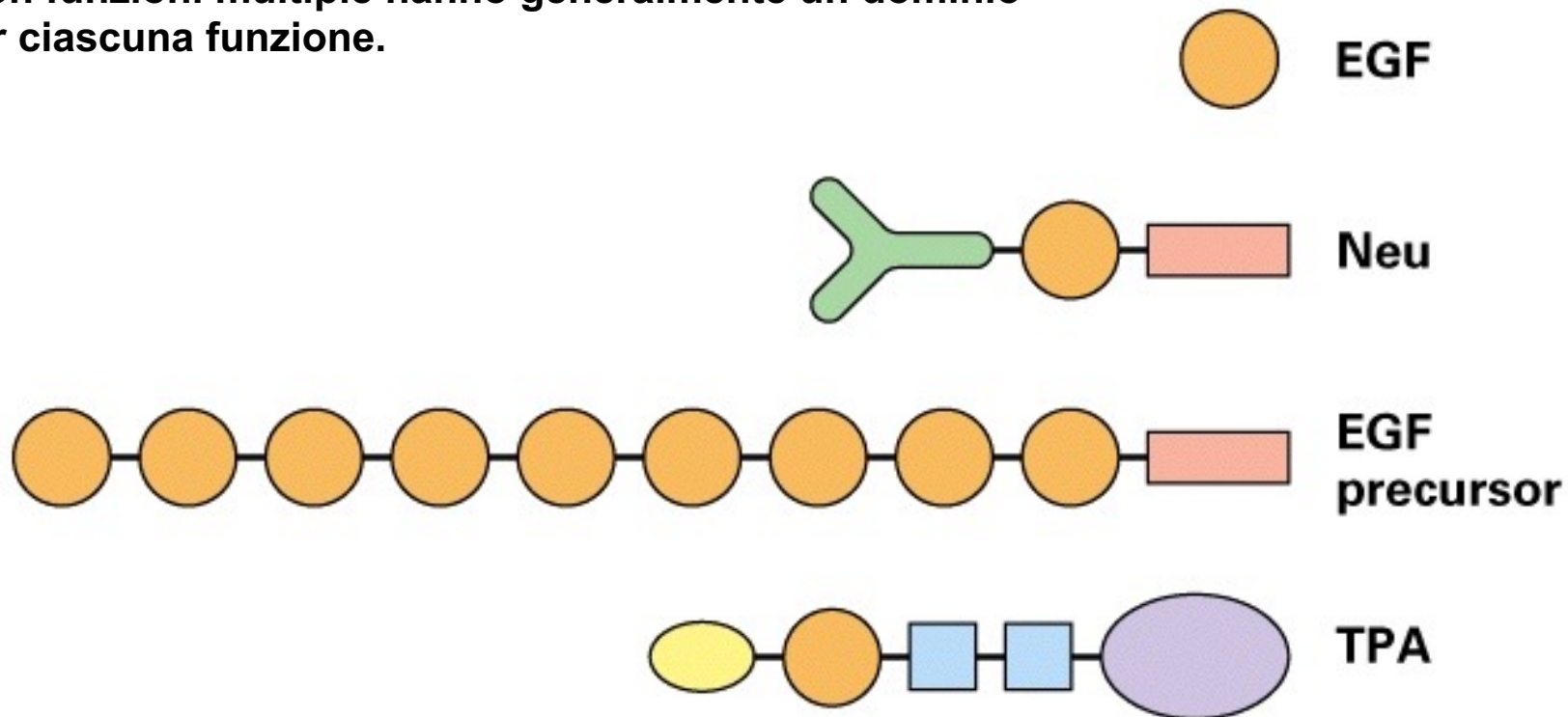


Un dominio strutturale è un'entità discreta di struttura terziaria che spesso contiene regioni ad alfa elica e a foglietto beta.

Un dominio è generalmente costituito da 50-350 amminoacidi e ha in genere una funzione specifica.

Proteine con funzioni comuni hanno generalmente domini comuni.

Proteine con funzioni multiple hanno generalmente un dominio diverso per ciascuna funzione.



<https://www.jove.com/embed/player?id=11500&t=1&s=1&fpv=1>

Predictive Algorithms

If the sequence holds the secrets of folding, can we figure it out?

Metodi di Chou-Fasman si basa sull'analisi statistica della composizione in residui delle strutture secondarie presenti nella PDB.

(http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=misc1)

GOR si basa sull'analisi statistica della composizione in residui delle strutture secondarie presenti nella PDB.

(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)

AGADIR per predire la percentuale di residui in elica

(<http://www.embl-heidelberg.de/Services/serrano/agadir/agadir-start.html>)

PHD prende in input o una sequenza o un allineamento multiplo ed usa le reti neurali.

(<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html>) **Vuole una registrazione**

PSIPRED utilizza un sistema di due reti neurali. (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)

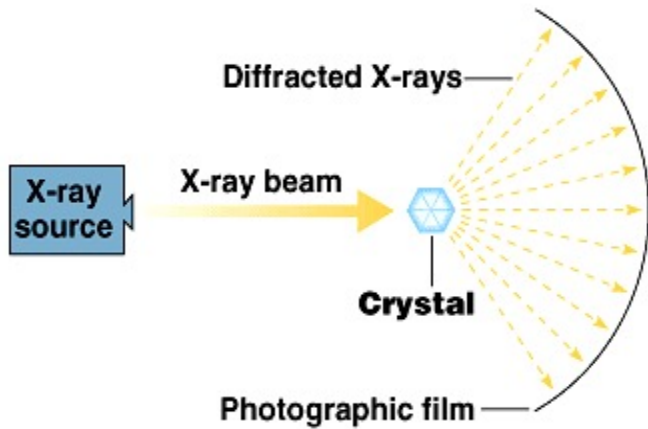
PREDATOR si basa sull'applicazione del metodo del k-esimo vicino che usa le reti neurali

(<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/predator-simple.html>)

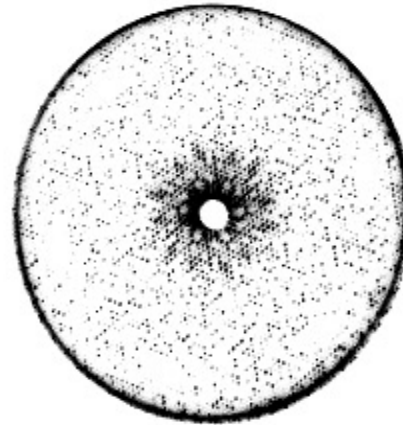
JPRED3 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/Software/JPred/jpred.html>) fa un consensus di vari metodi

PDB: Protein Data Bank

- Holds 3D models of biological macromolecules (protein, RNA, DNA).
- All data are available to the public.
- Obtained by X-Ray crystallography (84%) or NMR spectroscopy (16%).
- Submitted by biologists and biochemists from around the world.



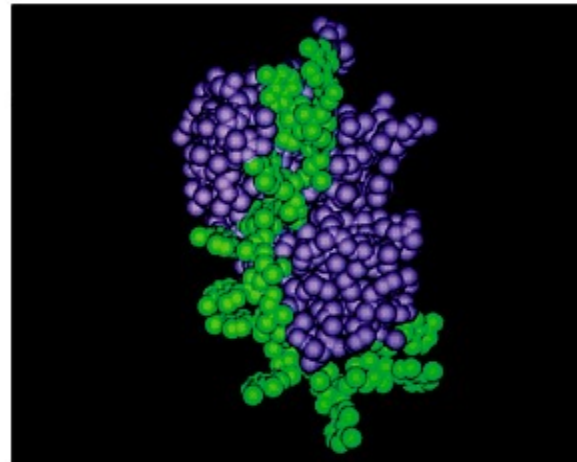
① X-ray crystallography



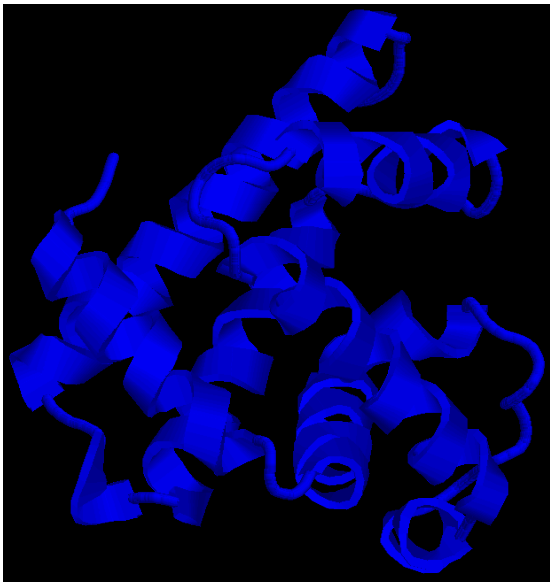
② X-ray diffraction pattern from the crystal of a protein



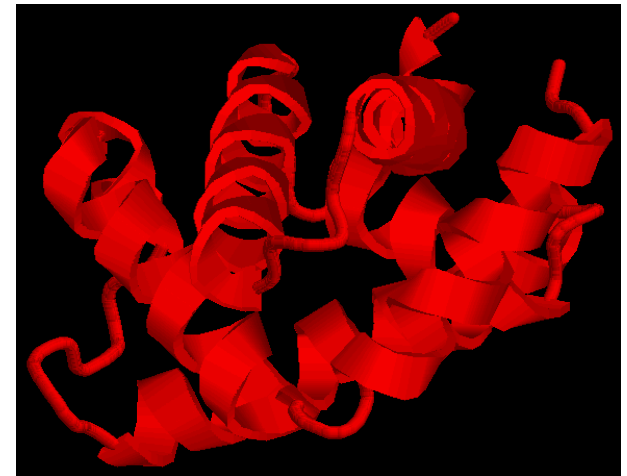
③ Electron density map



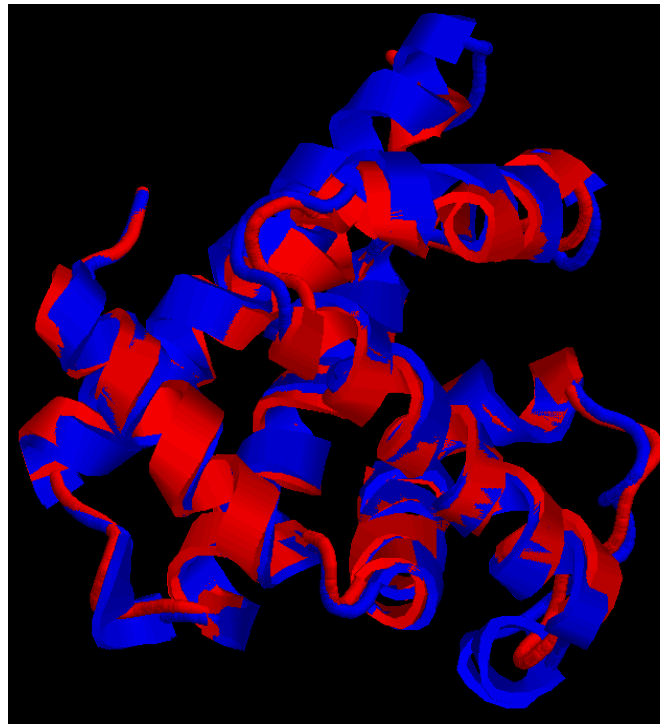
④ A computer graphic model of the protein ribonuclease (purple) bound to a short strand of nucleic acid (green)



Human Hemoglobin
alpha-chain
pdb:1jebA



Human Myoglobin
pdb:2mm1

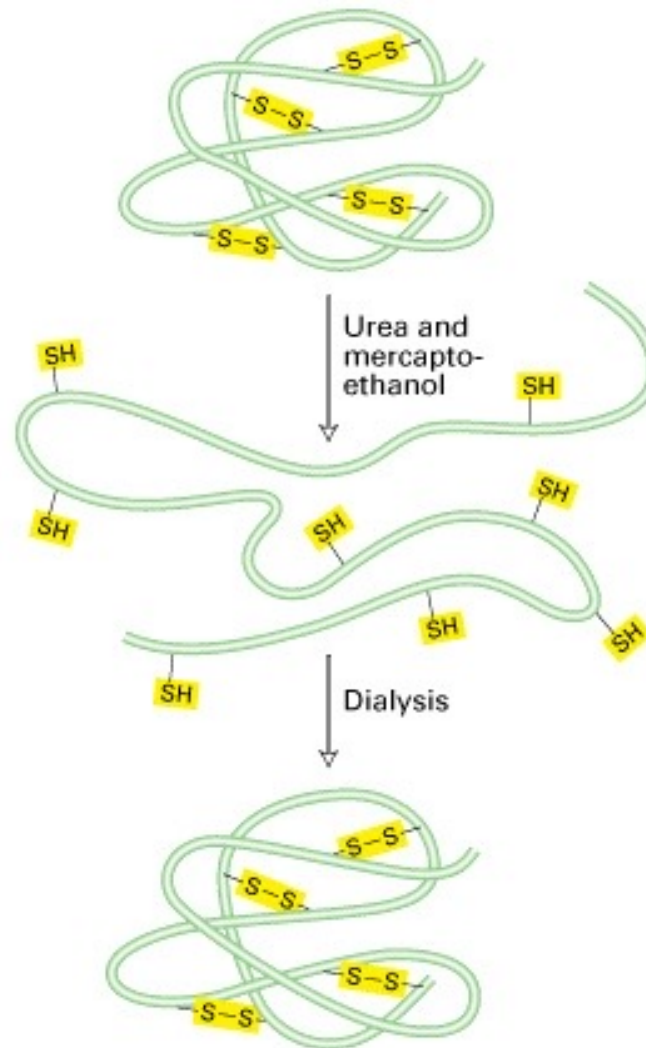


Sequence id: **27%**
Structural id: **90%**

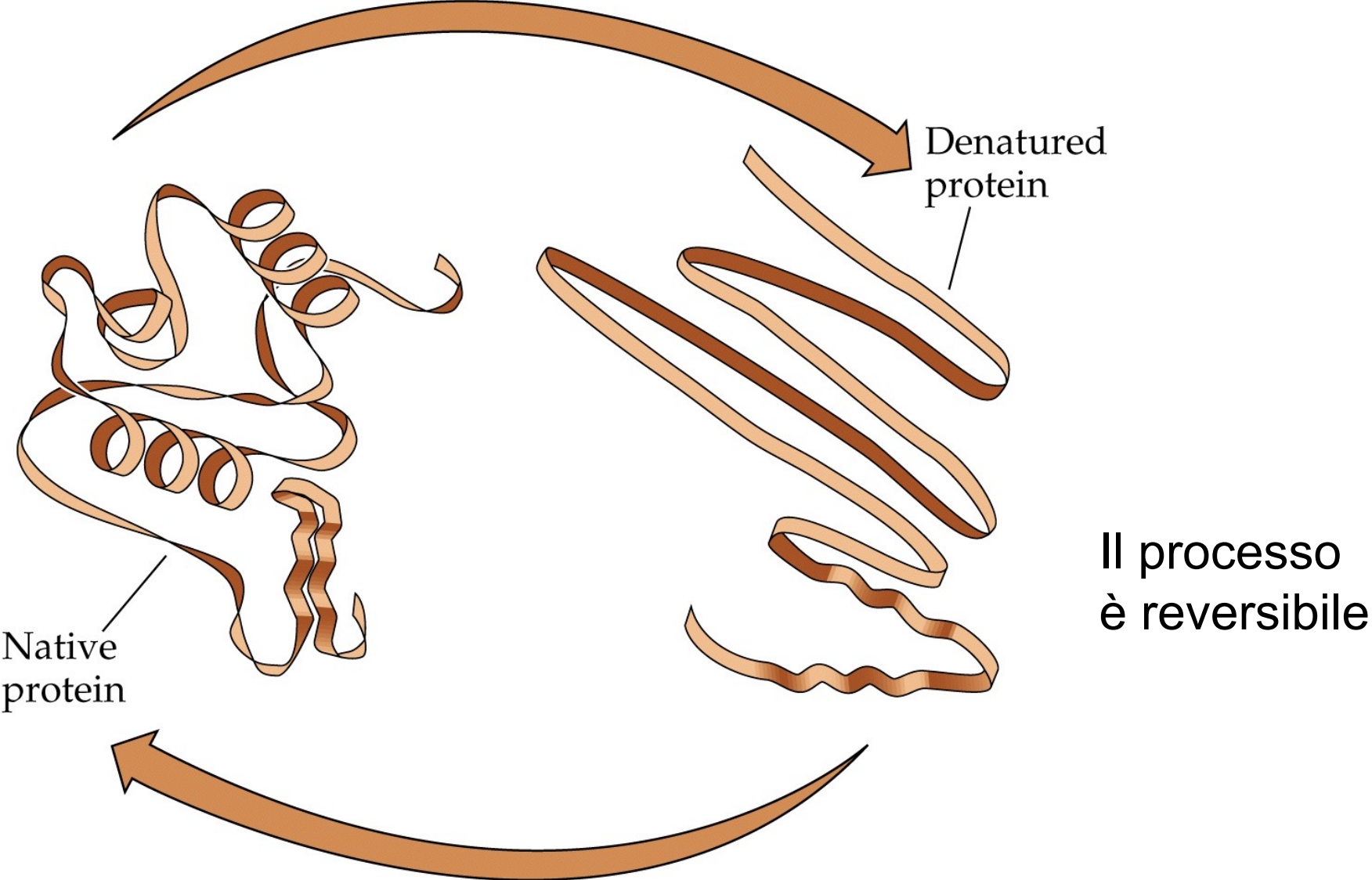
Conformazione, modificazione e degradazione delle proteine

- Una catena polipeptidica appena sintetizzata deve conformarsi e spesso subire modificazioni chimiche per generare la proteina finale
- Tutte le molecole di una data specie proteica assumono la stessa conformazione (lo stato nativo), che è la più stabile conformazione che la molecola può assumere

L'informazione per il folding della proteina è contenuta nella sequenza



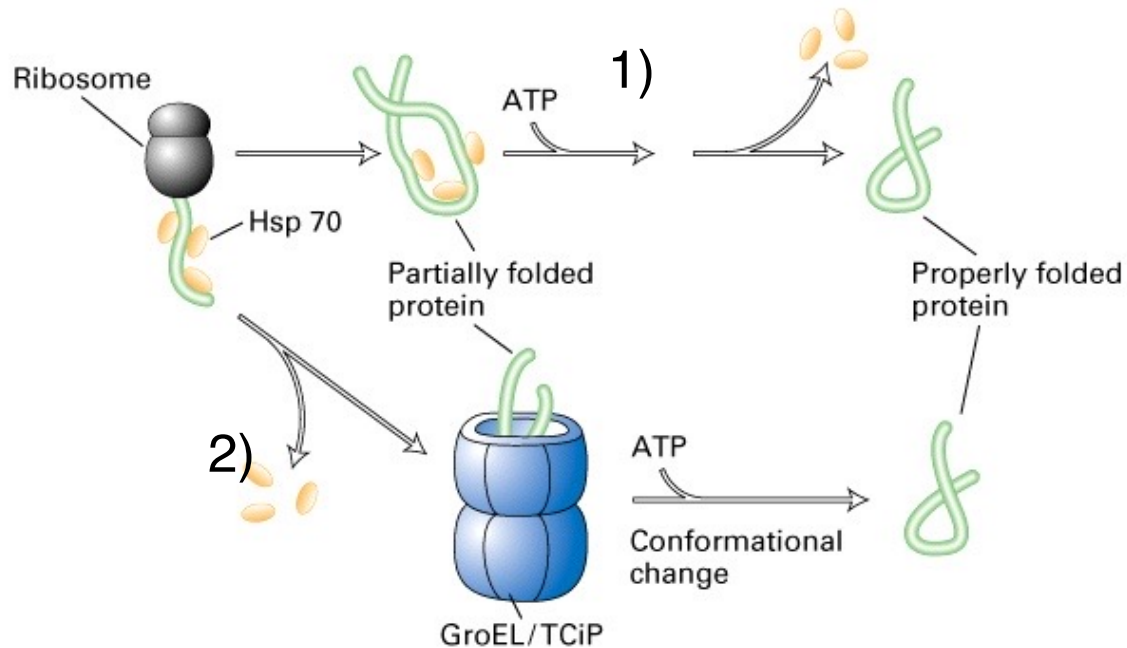
Proteine denaturate al calore, con acidi o chimici perdono la struttura terziaria e secondaria e la funzione biologica.



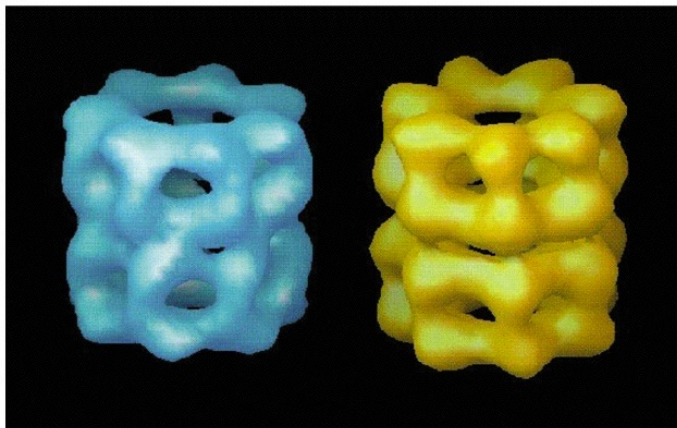
Il processo è reversibile

<https://www.jove.com/embed/player?id=10679&language=Italian&t=1&s=1&fpv=1>

Per alcuni polipeptidi il folding *in vivo* è svolto da chaperoni e chaperonine

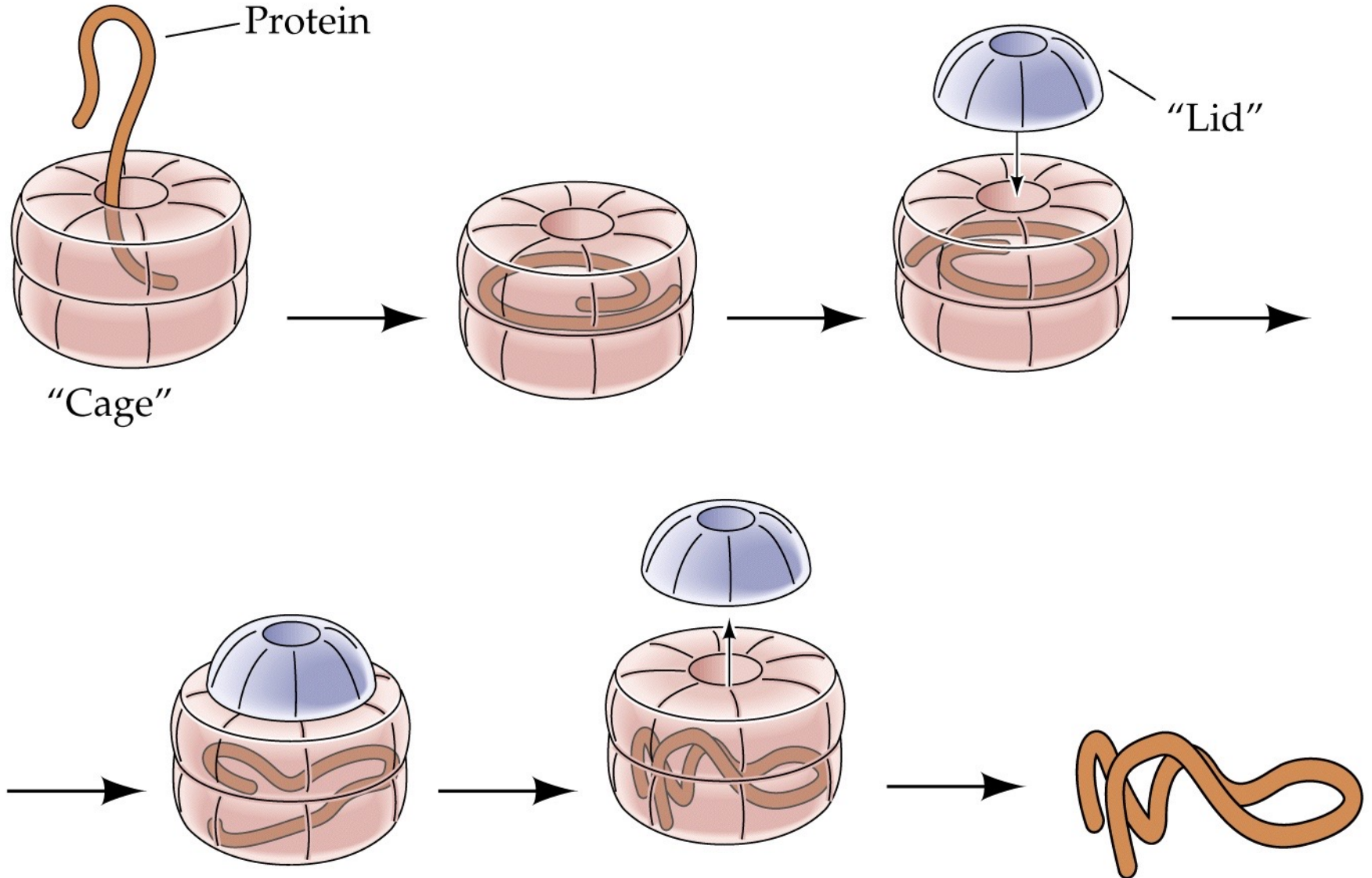


1) I chaperoni Hsp70 si legano alle catene polipeptidiche in fase di allungamento, impedendo che questi, ancora parzialmente formati, si leghino ad altre proteine presenti nel citosol. Una volta completata la sintesi le proteine vengono rilasciate e quindi spontaneamente assumono la loro corretta conformazione.



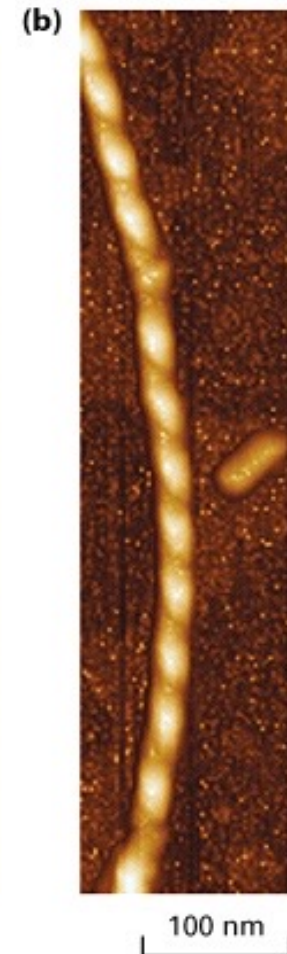
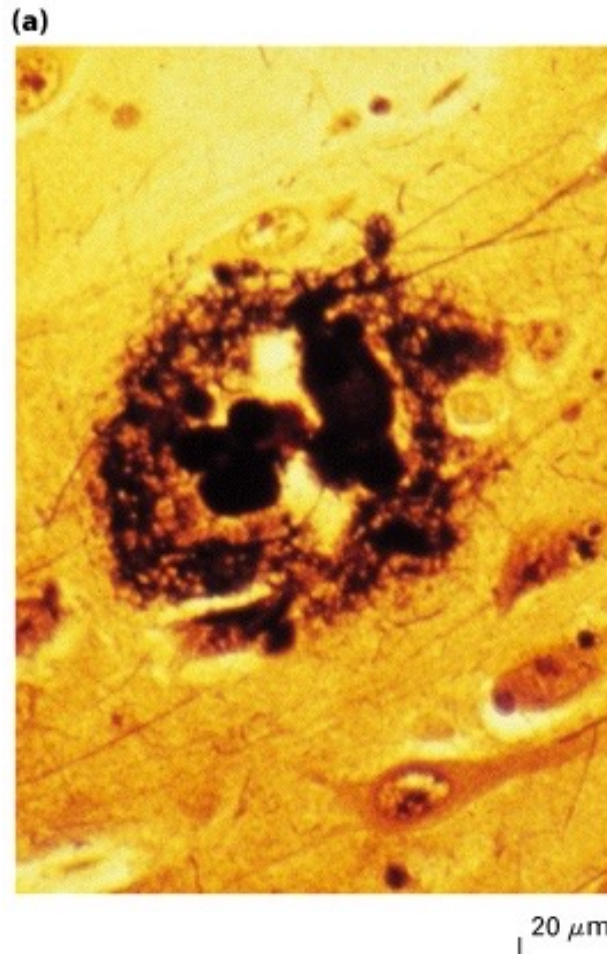
2) Molti dei polipeptidi più grandi vengono invece trasferiti dalle proteine Hsp70 in un'altra molecola detta chaperonina. Questi sono dei complessi proteici cilindrici nel cui interno i polipeptidi neosintetizzati possono ripiegarsi senza subire interferenze.

Le chaperonine assistono le proteine nella fase di folding, prevenendo il legame con ligandi inappropriati.



Proteine conformate in modo aberrante sono implicate nello sviluppo di patologie

Una placca amiloide nella malattia di Alzheimer è un agglomerato di filamenti proteici (β -peptide amiloide) derivati da una proteina più grande, chiamata *proteina precursore dell'amiloide*, una proteina transmembrana delle cellule nervose.



Protein-misfolding diseases

include conditions where a protein:

- fails to fold correctly

(cystic fibrosis, Marfan syndrome, amyotonic lateral sclerosis)

- is not stable enough to perform its normal function
(many forms of cancer)

- fails to be correctly trafficked

(familial hypercholesterolemia, α 1-antitrypsin deficiency)

- forms insoluble aggregates that deposit toxically

(neurodegenerative diseases: Alzheimer's, type II diabetes, Parkinson's and many more)

Poche delle molte catene polipeptidiche possibili sono utili per le cellule

Per una lunghezza tipica di una proteina di circa 300 amminoacidi si potrebbero teoricamente costruire più di 20^{300} diverse catene polipeptidiche. Probabilmente meno di $1/10^9$ adotterebbe una conformazione tridimensionale singola e stabile.

Com'è possibile quindi che nelle cellule le proteine abbiano qs caratteristiche?

SELEZIONE NATURALE

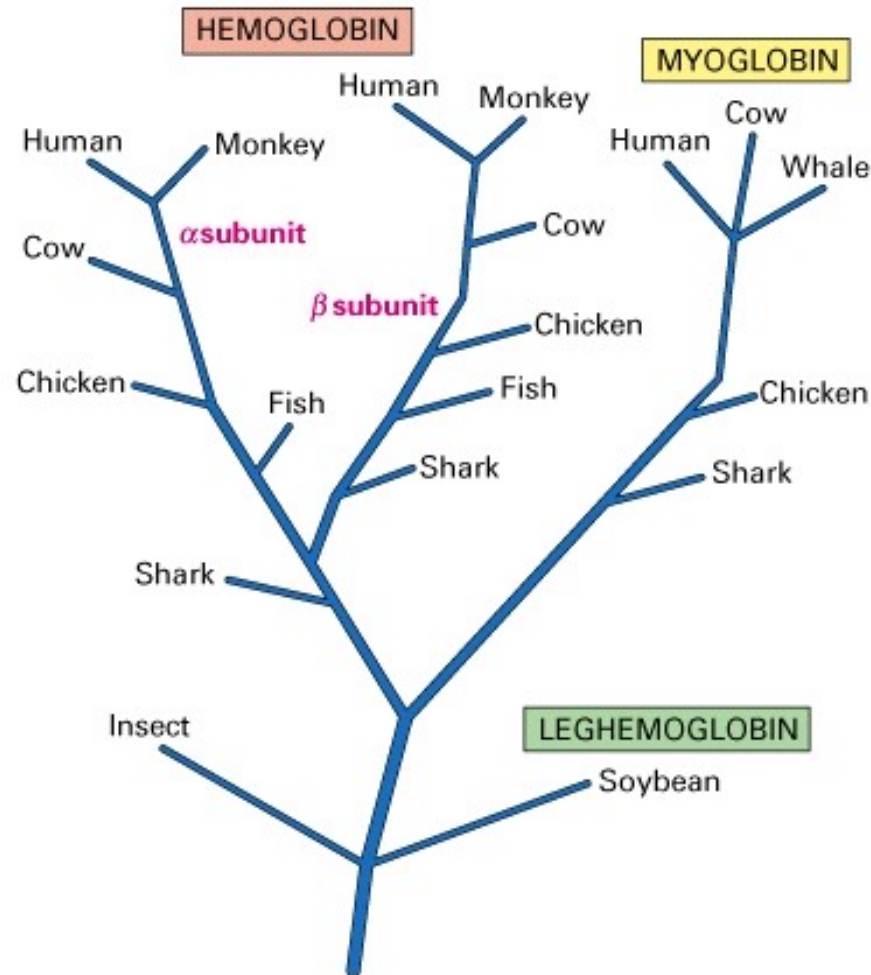
Due categorie di proteine:

-[Proteine fibrose](#), hanno estese strutture secondarie lungo tutta la molecola, che per questo motivo risulta avere una struttura molto ordinata e ripetitiva. La particolare struttura secondaria conferisce, a sua volta, una serie di proprietà meccaniche utili alla proteina. Esempi sono: cheratine (capelli), collagene (tendini, pelle), elastina (legamenti, vasi sanguigni). Sono tuttavia una parte minoritaria delle proteine cellulari.

-[Proteine globulari](#), hanno strutture compatte poiché le strutture alfa e beta sono ulteriormente ripiegate le une sulle altre, a causa della presenza di “random coils” (avvolgimenti casuali). Proteine globulari piccole sono generalmente costituite da un unico dominio. Quelle grandi hanno più domini.

OLTRE A CIO' LE PROTEINE POSSONO ESSERE RAGGRUPPATE IN FAMIGLIE

L'omologia delle sequenze suggerisce relazioni funzionali ed evolutive tra le proteine



Comparazione sequenze

Hum aglobina: mvlspadktn v kaawgkvga hageygaeal

Bovis: mvlsaadkgn vkaawgkvvg haaeygaeal

Pig: vlsaadkan vkaawgkvvg qagahgaeal

ermflsfptt ktyfphfdls hgsaqvkghg kkvadaltna vahvddmpna

ermflsfptt ktyfphfdls hgsaqvkghg akvaaaltka vehlddlpga

ermflgfptt ktyfphfnls hgisdqvkahg kvadaltka vghlddlpga

lsalsdlhah klrvdpvnfk llshcllvtl aahlpaeftp avhasldkfl

lselsdlhah klrvdpvnfk llshsllvtl ashlpdftp avhasldkfl

lsalsdlhah klrvdpvnfk llshcllvtl aahhpddfnp svhasldkfl

asvstvltsk yr

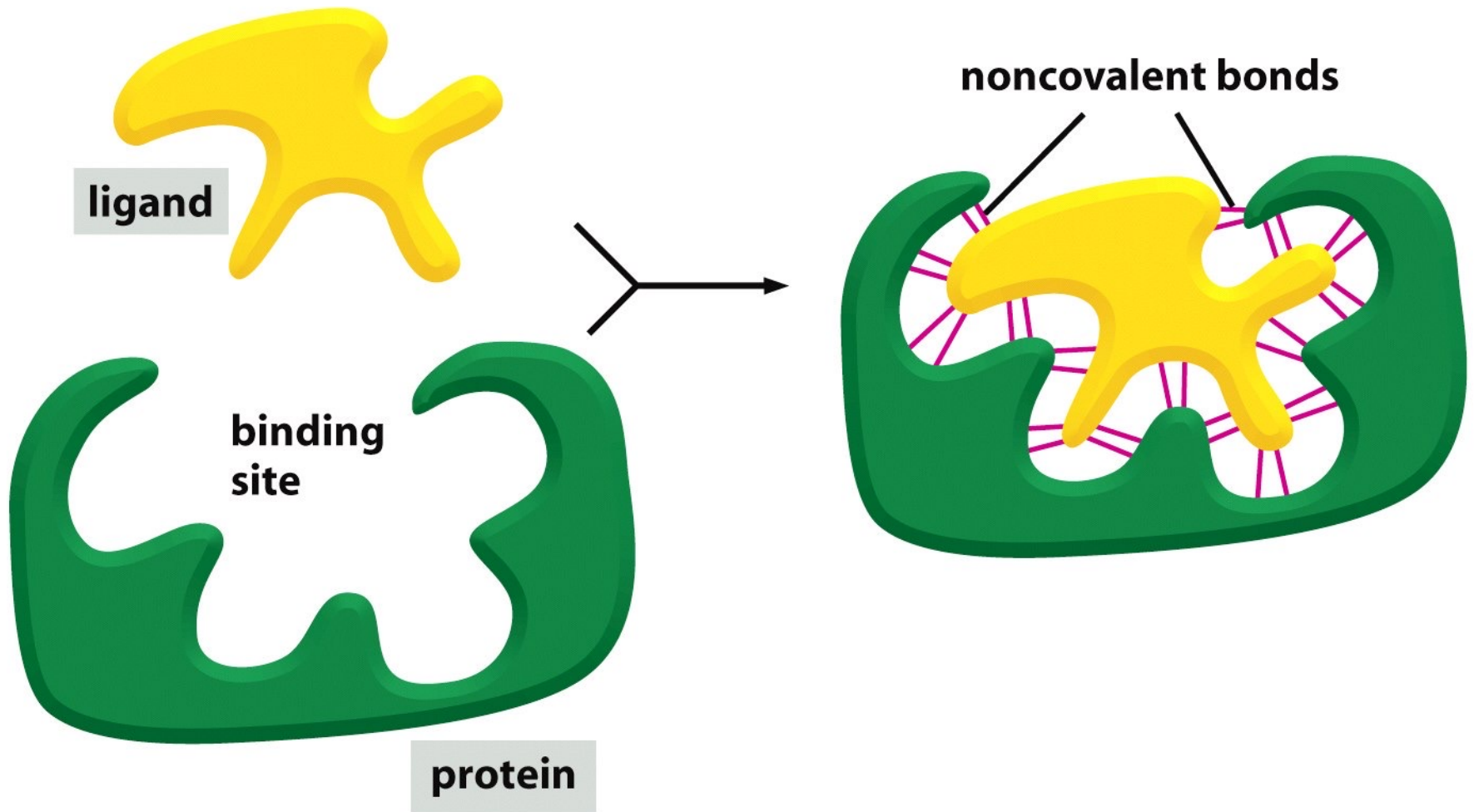
anvstvltsk yr

anvstvltsk yr

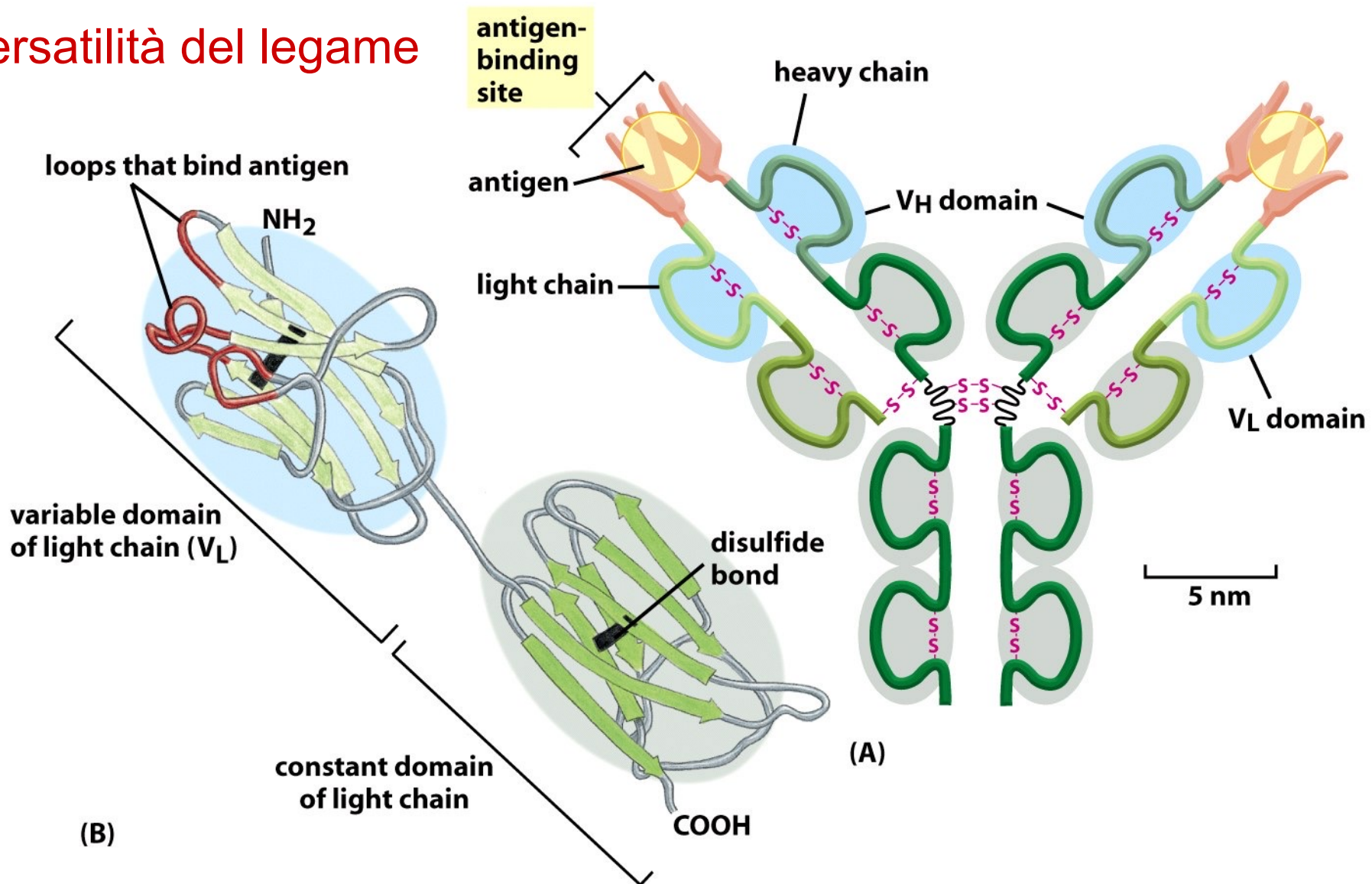
Funzioni proteiche

- La funzione proteica generalmente richiede cambiamenti conformazionali
- Le proteine sono destinate a legare un range di molecole (ligandi)
 - Il legame è caratterizzato da due proprietà: affinità e specificità
- Gli anticorpi posseggono precise specificità di legame
- Gli enzimi sono catalizzatori molto efficienti e specifici
 - il sito attivo di un enzima si lega ad un substrato e catalizza una reazione

Affinità e specificità di legame

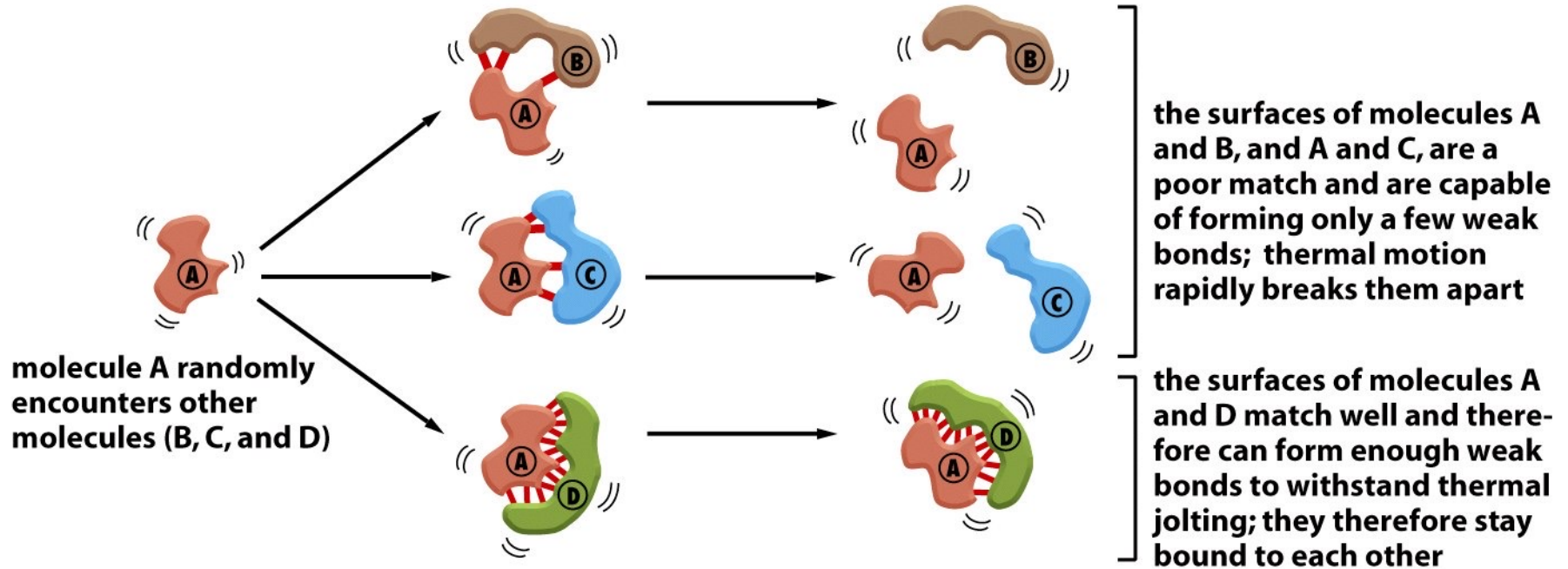


Versatilità del legame



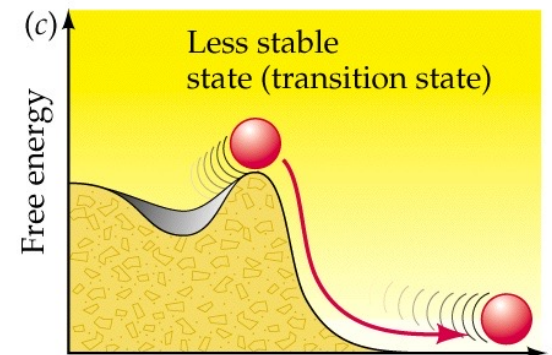
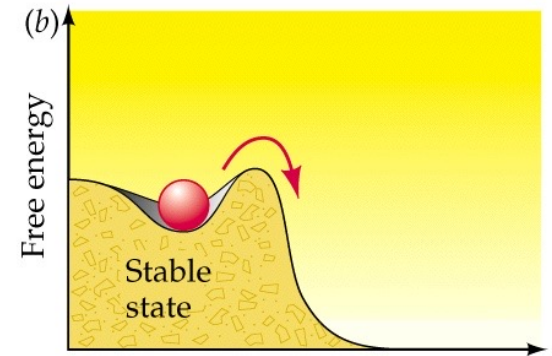
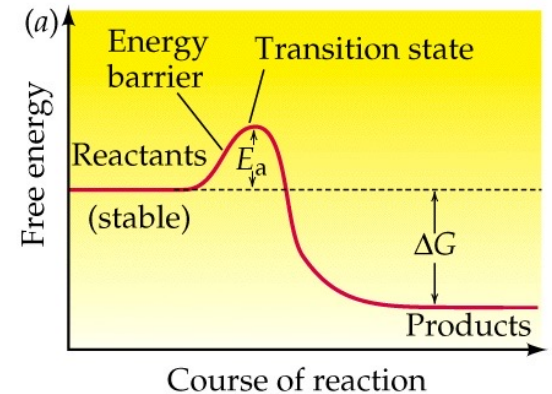
L'enorme varietà dei siti di legame per l'antigene posseduta da anticorpi diversi è generata cambiando soltanto la lunghezza e la sequenza degli a.a. delle anse, senza alterare la struttura di base della proteina.

Forza di legame

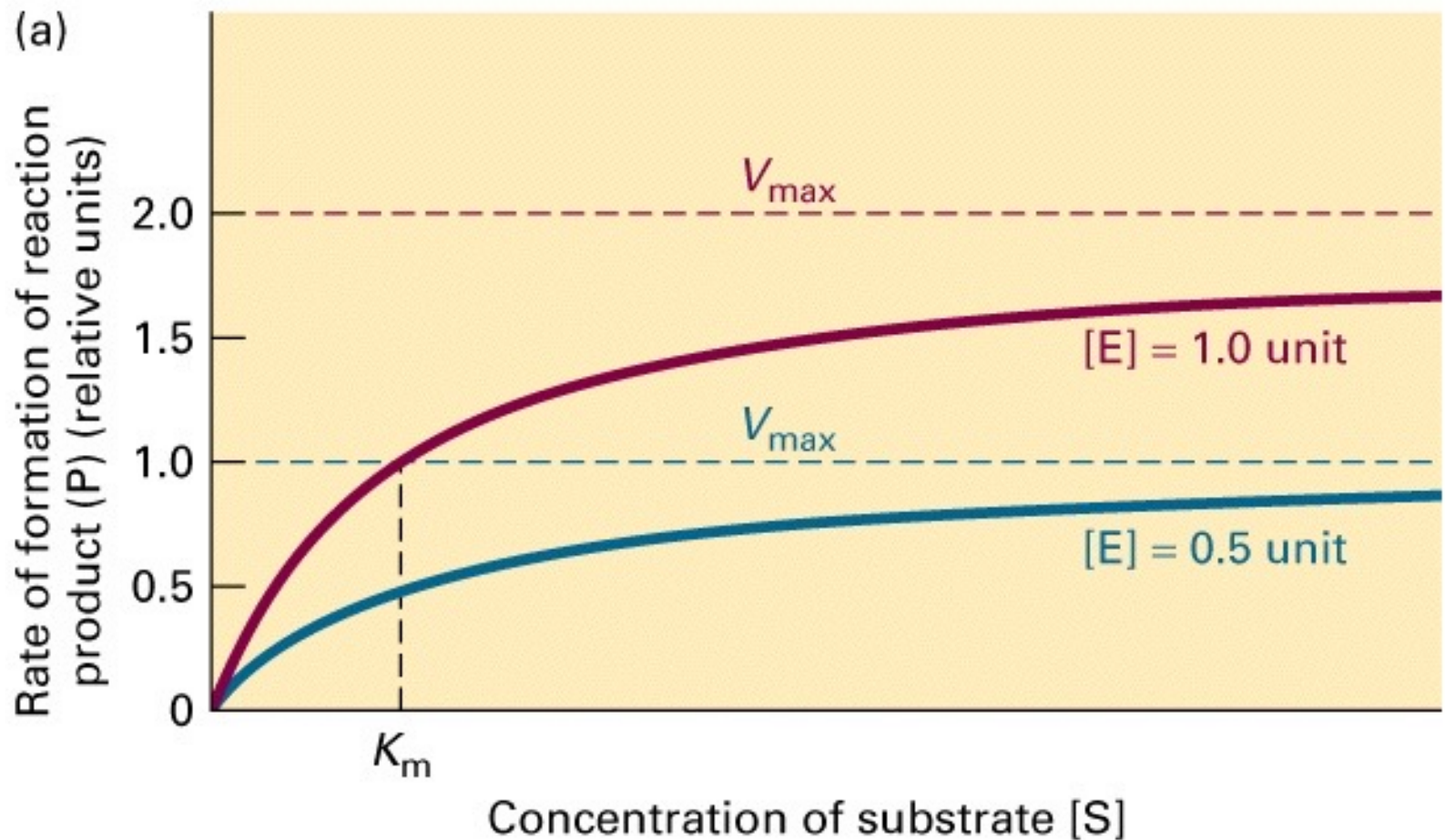


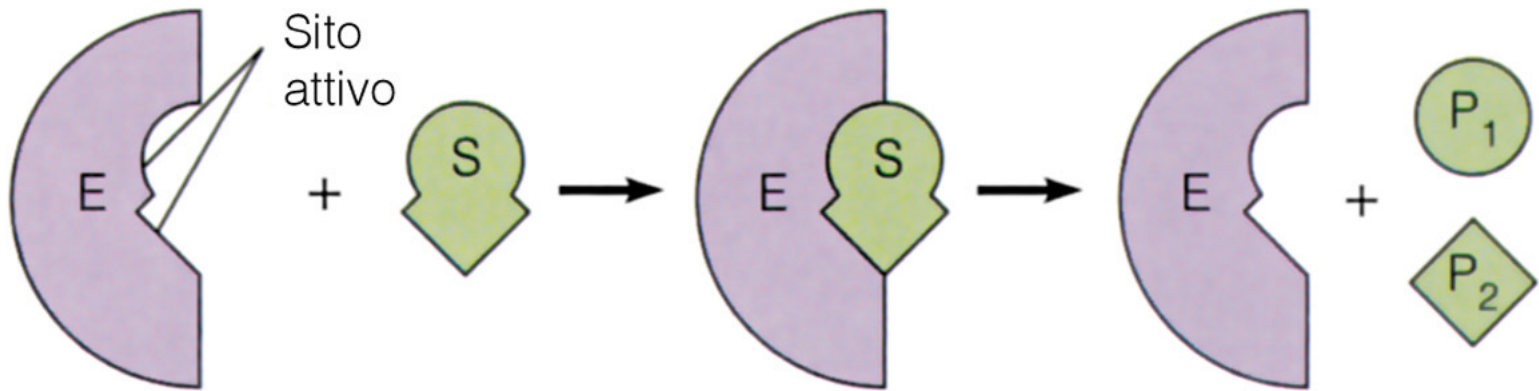
Velocità delle reazioni chimiche

La velocità di una reazione chimica è indipendente dal ΔG ma è determinata dall'ampiezza della barriera dell'energia di attivazione. I catalizzatori aumentano la velocità di reazione, abbassando questa barriera.



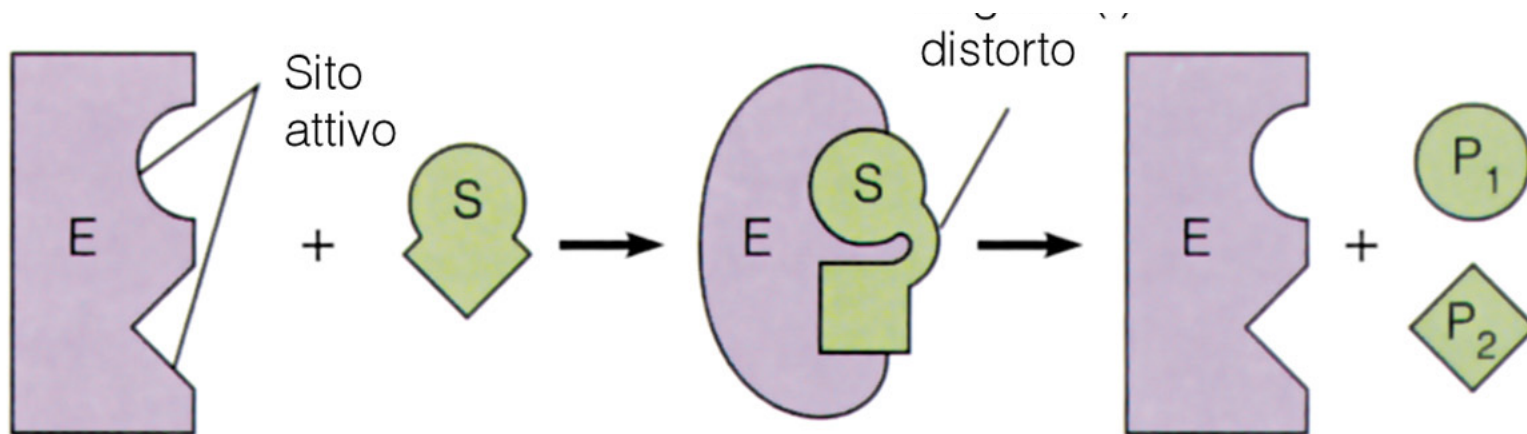
La cinetica di una reazione enzimatica è descritta dalla V_{\max} e dalla K_m





(a) Modello della chiave e serratura

Il primo modello ad essere stato messo a punto per spiegare la specificità degli enzimi è quello suggerito da Hermann Emil Fischer nel 1894, secondo il quale l'enzima ed il substrato possiedono una forma esattamente complementare che ne permette un incastro perfetto. Tale modello è spesso definito come chiave-serratura. Tale modello esplica bene la specificità degli enzimi, ma è decisamente meno affidabile nello spiegare la stabilizzazione dello stato di transizione che l'enzima raggiunge durante il legame con il substrato.



(b) Modello dell'adattamento indotto

Figura 6-6

Nel 1958 Daniel Koshland propose una modifica del modello chiave-serratura: dal momento che gli enzimi sono strutture relativamente flessibili, egli suggerì che il sito attivo potesse continuamente modellarsi in base alla presenza o meno del substrato. Come risultato, il substrato non si lega semplicemente ad un sito attivo rigido, ma genera un rimodellamento del sito stesso, che lo porta ad un legame più stabile in modo da portare correttamente a termine la sua attività catalitica. In alcuni casi anche il substrato può cambiare leggermente la propria forma all'ingresso nel sito attivo.

Regolazione Allosterica

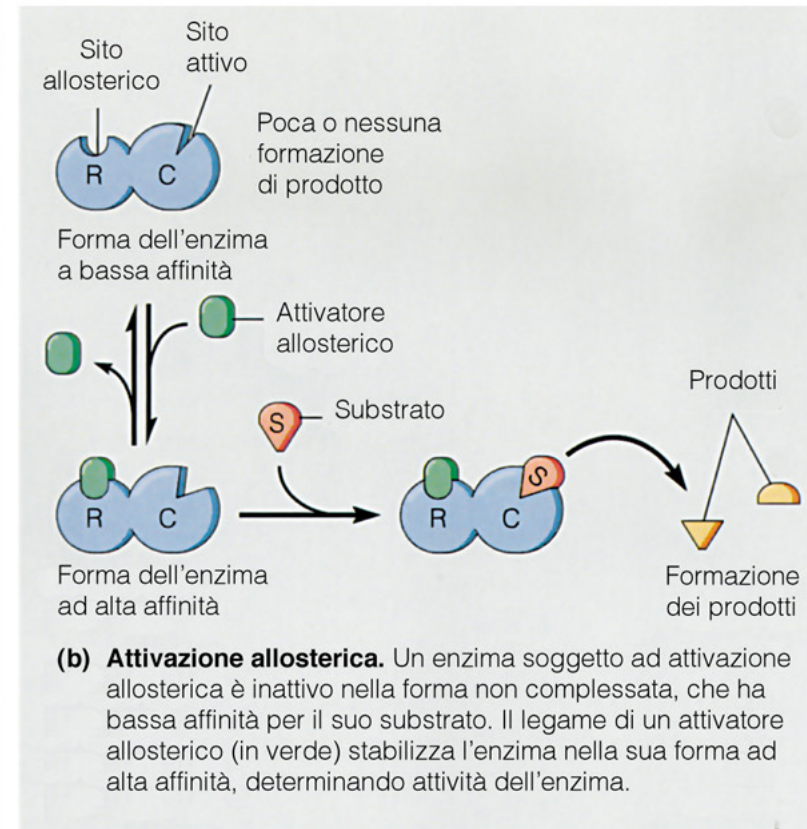
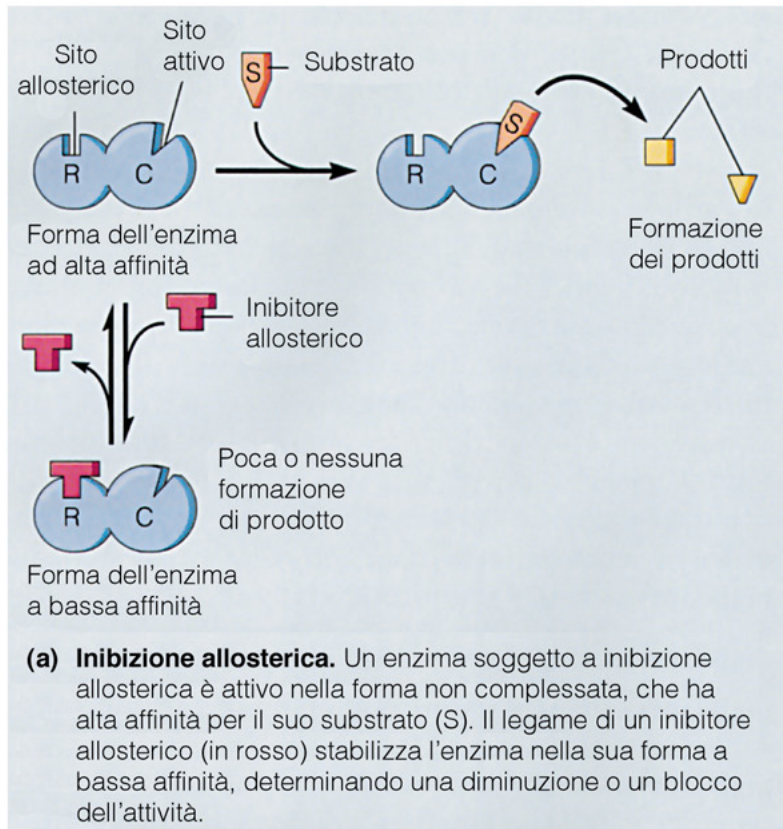
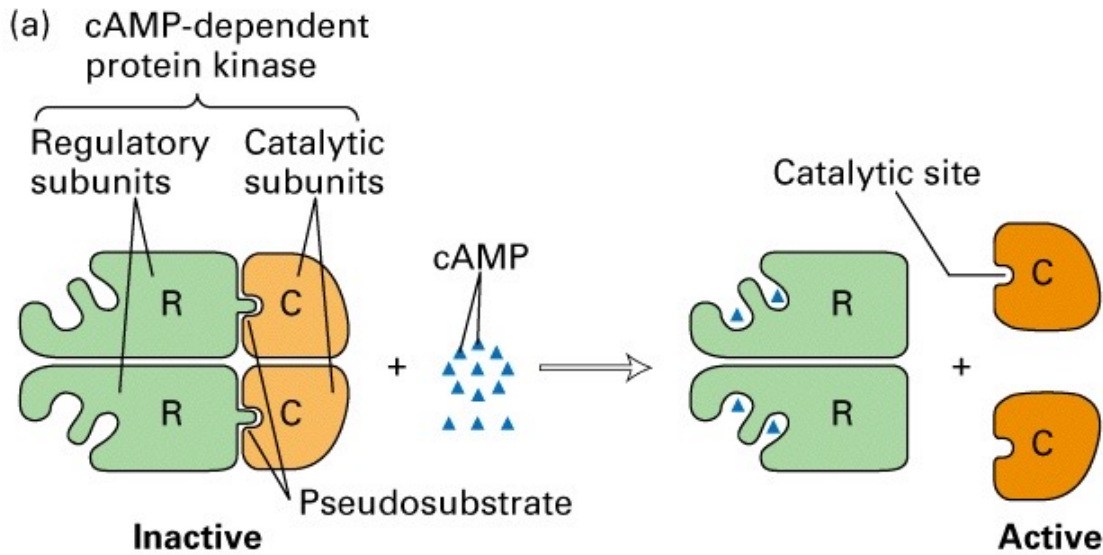


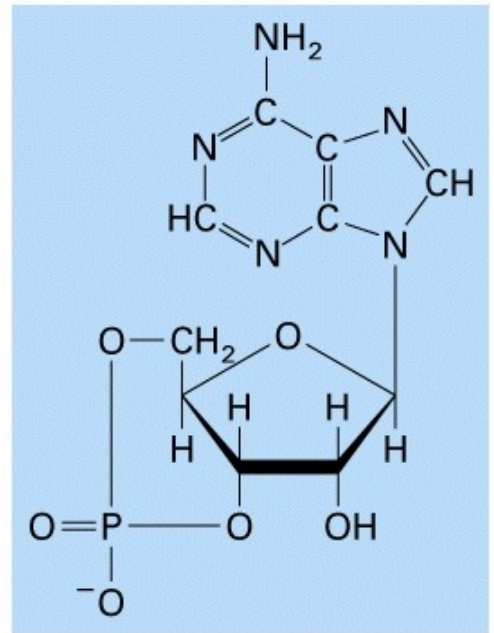
Figura 6-17

cambiamenti nella struttura terziaria e/o quaternaria di una proteina, indotti dal legame di una piccola molecola, che può essere un **attivatore**, un **inibitore**, un **substrato** o un **prodotto finale**.

Rilascio allosterico di subunità catalitiche



(b)



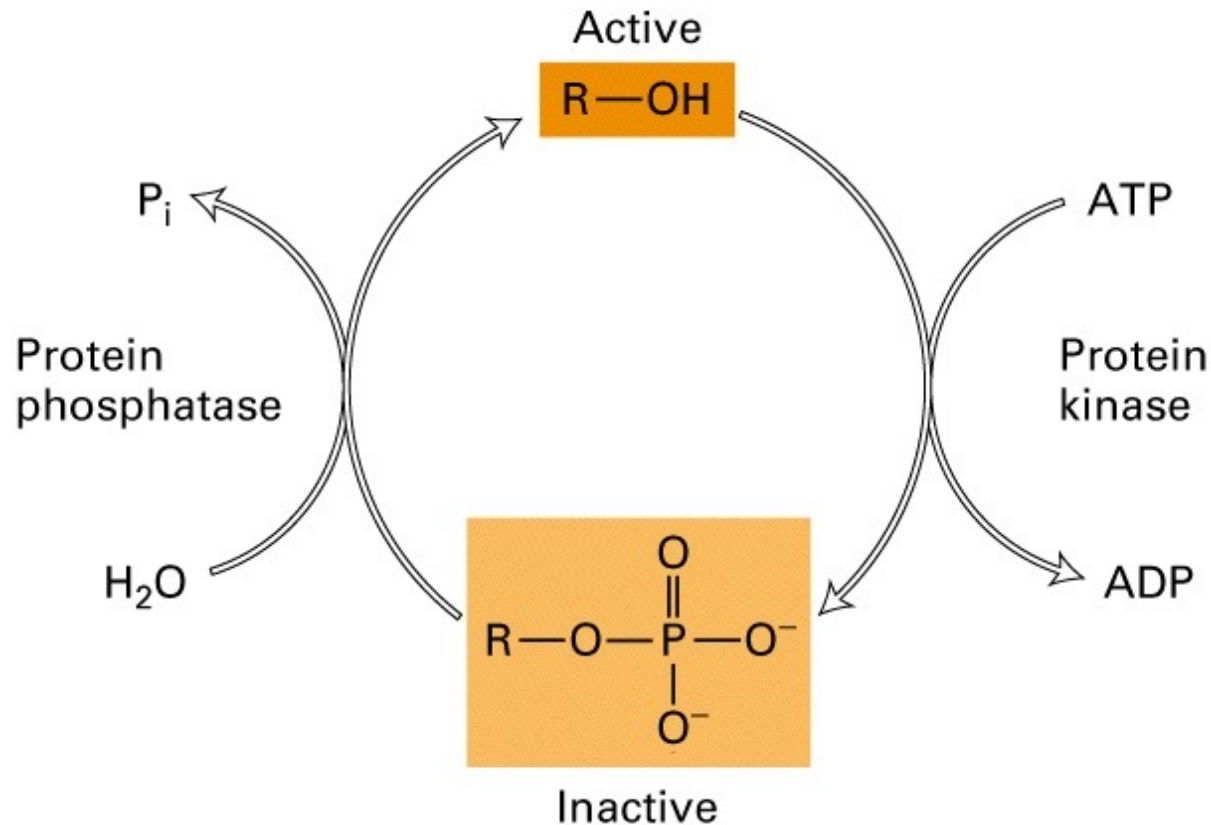
Cyclic AMP

Il legame di molti ormoni a recettori di superficie induce un innalzamento della concentrazione intracellulare di cAMP, portando all'attivazione di cAPK. Quando il segnale cessa, il cAMP diminuisce e l'attività di cAPK viene inibita.

<https://www.jove.com/embed/player?id=11515&t=1&s=1&fpv=1>

REGOLAZIONE DELL' ATTIVITA' ENZIMATICA

Fosforilazione \leftrightarrow defosforilazione



Sono fosforilati i residui amminoacidici della serina, treonina o tirosina

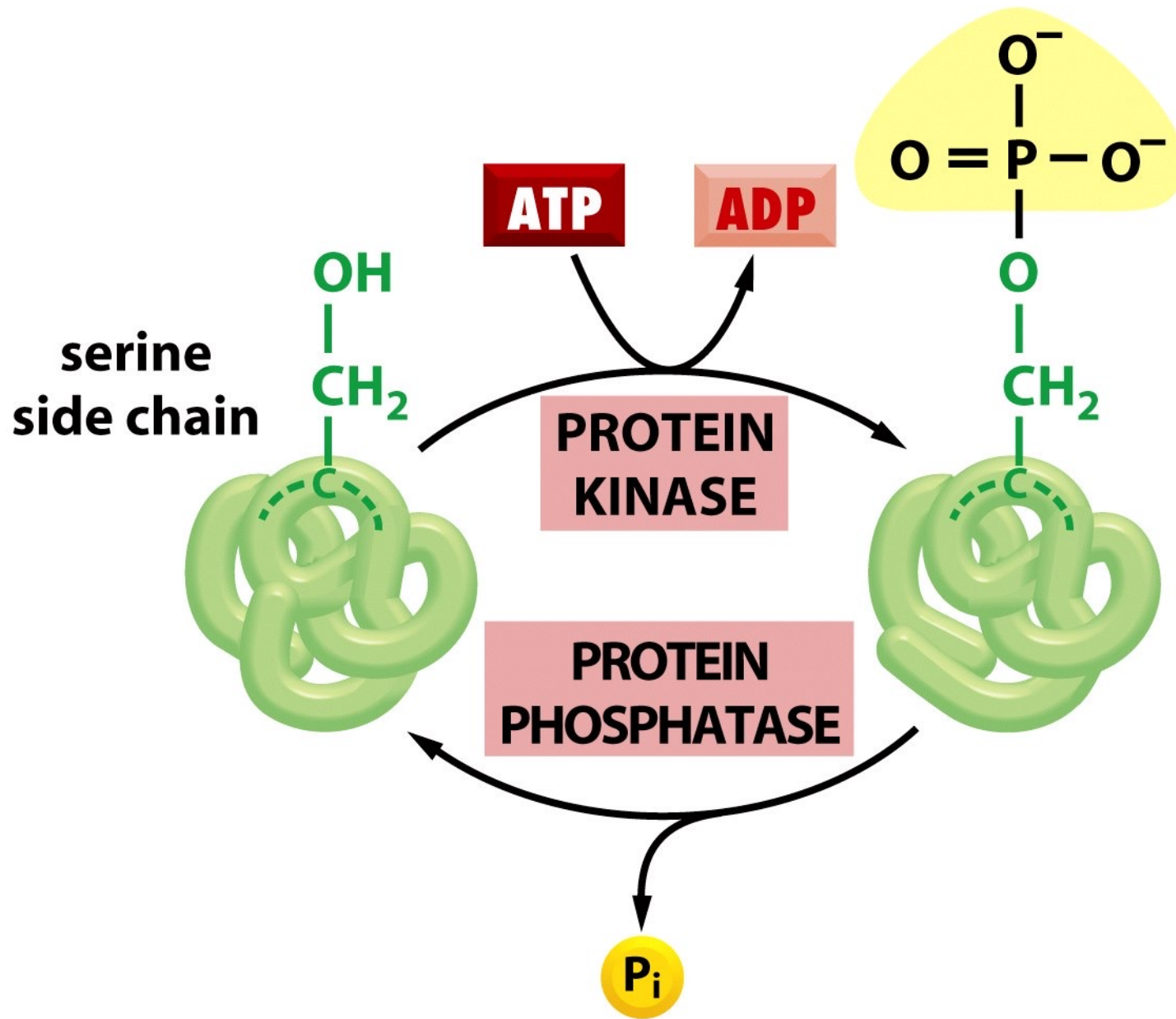


Figure 3-64a *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

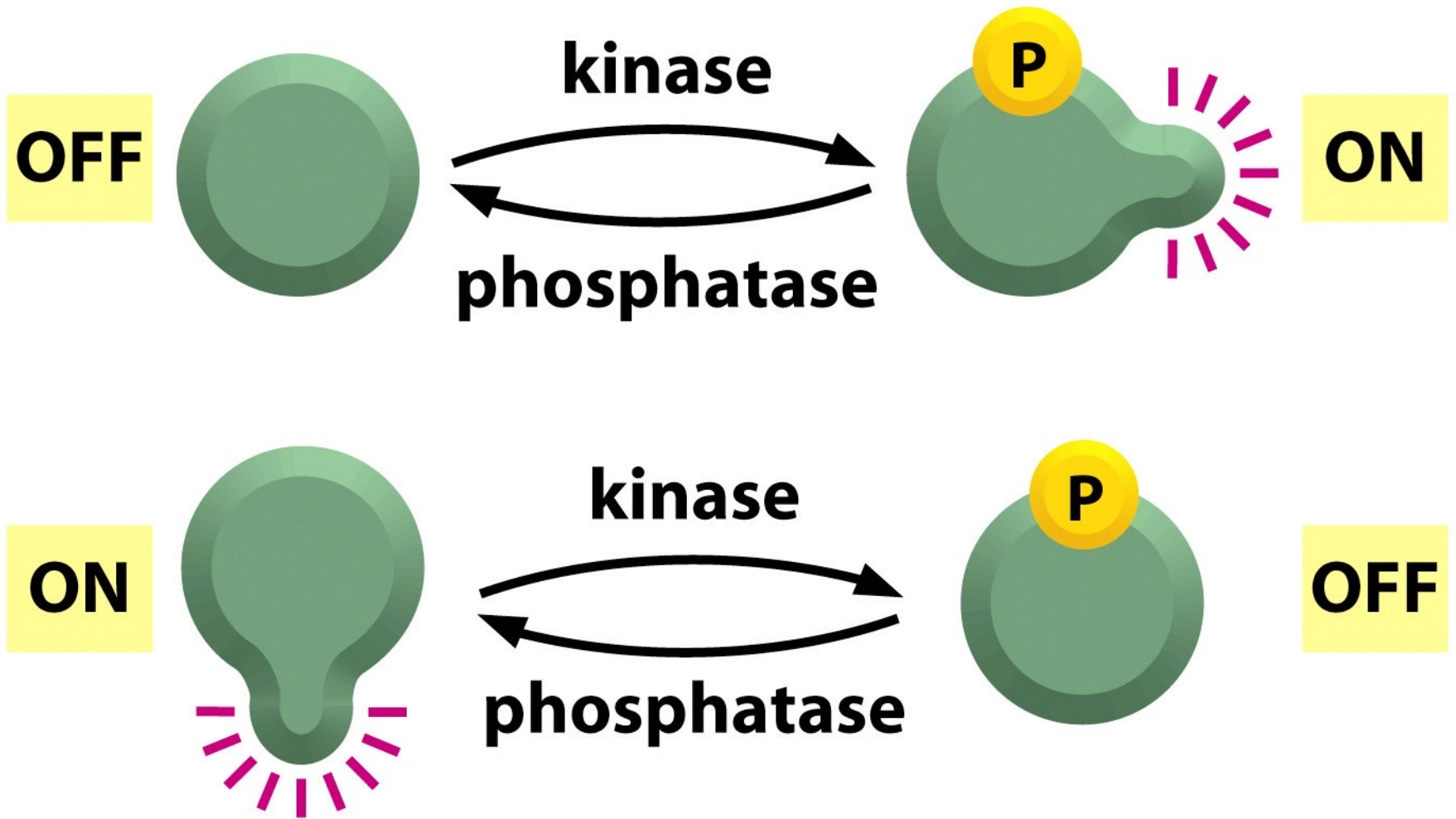


Figure 3-64b *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

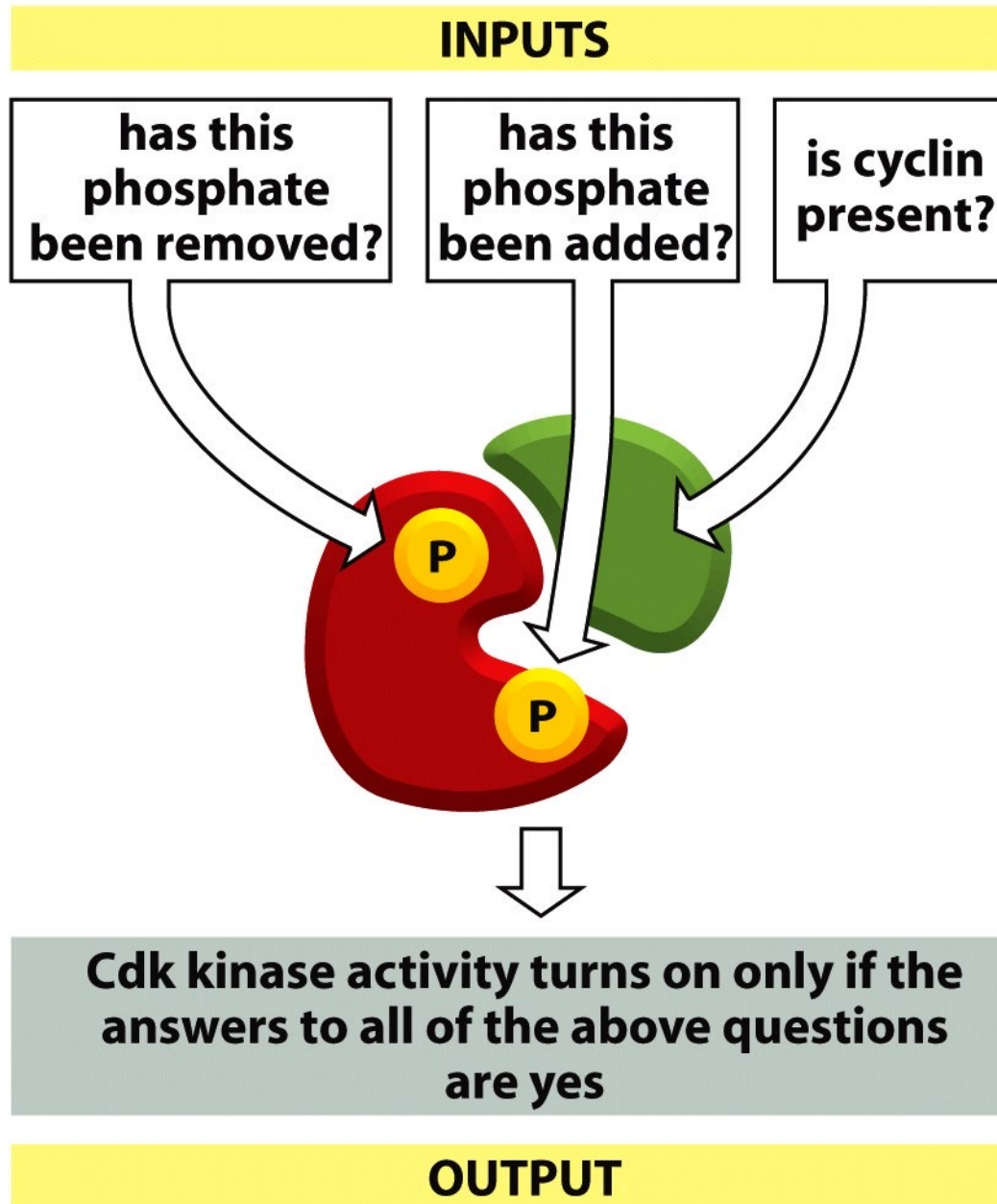
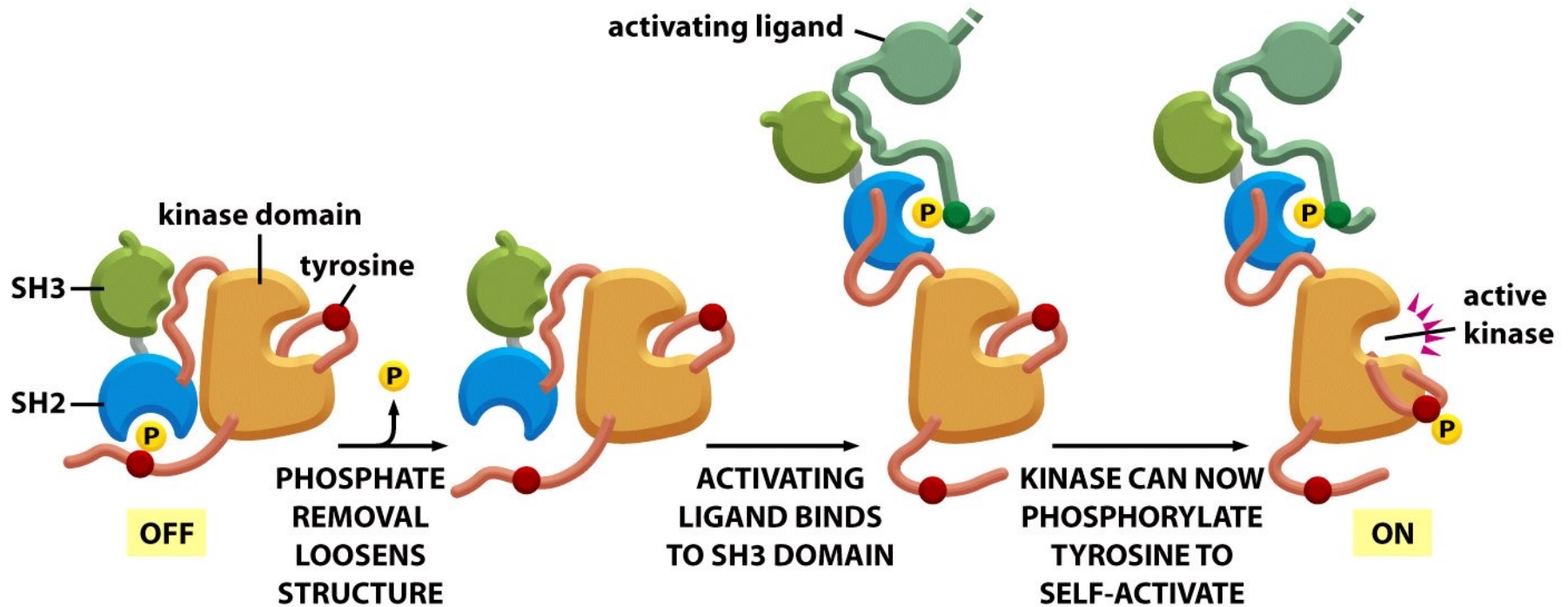


Figure 3-67 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Più eventi sequenziali possono essere necessari per l'attivazione di una proteina



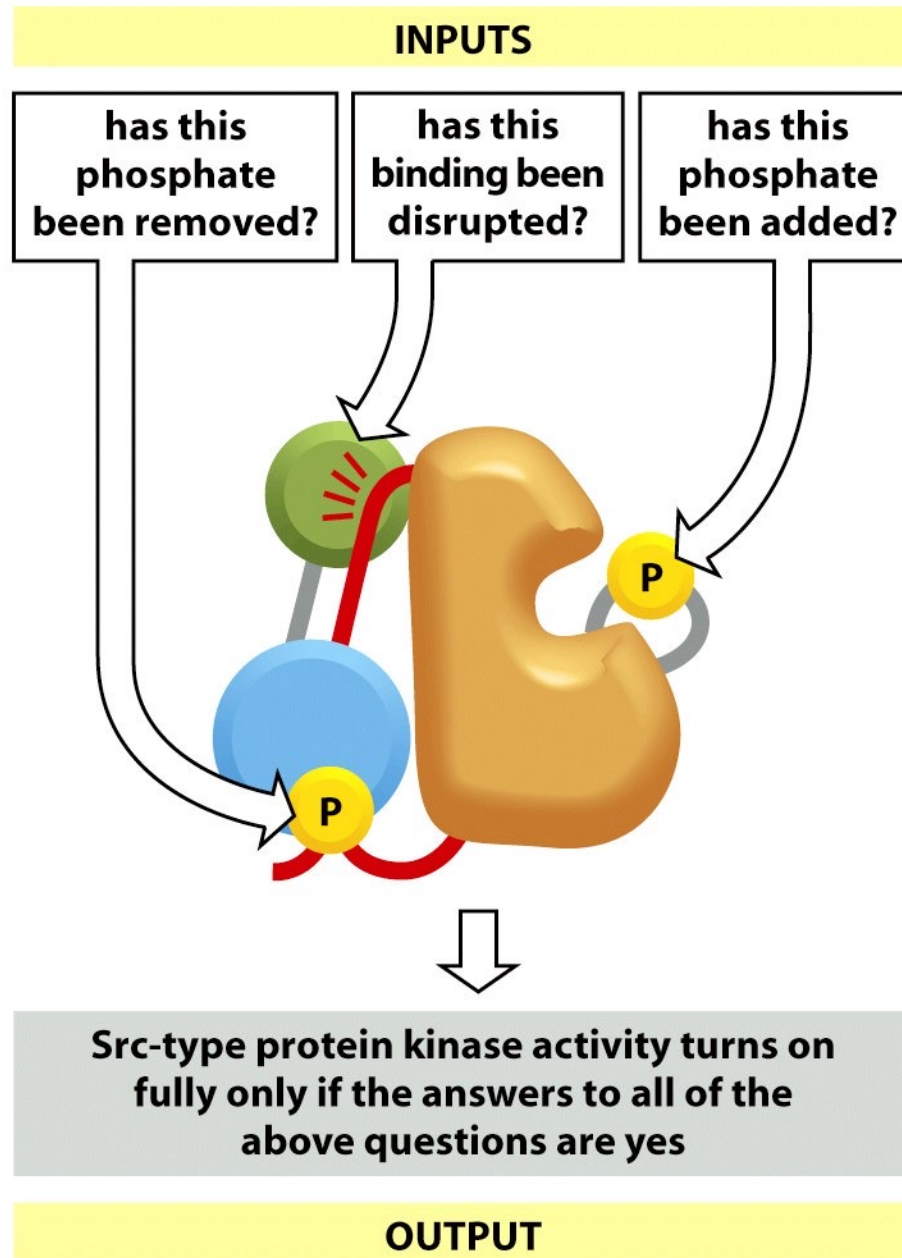
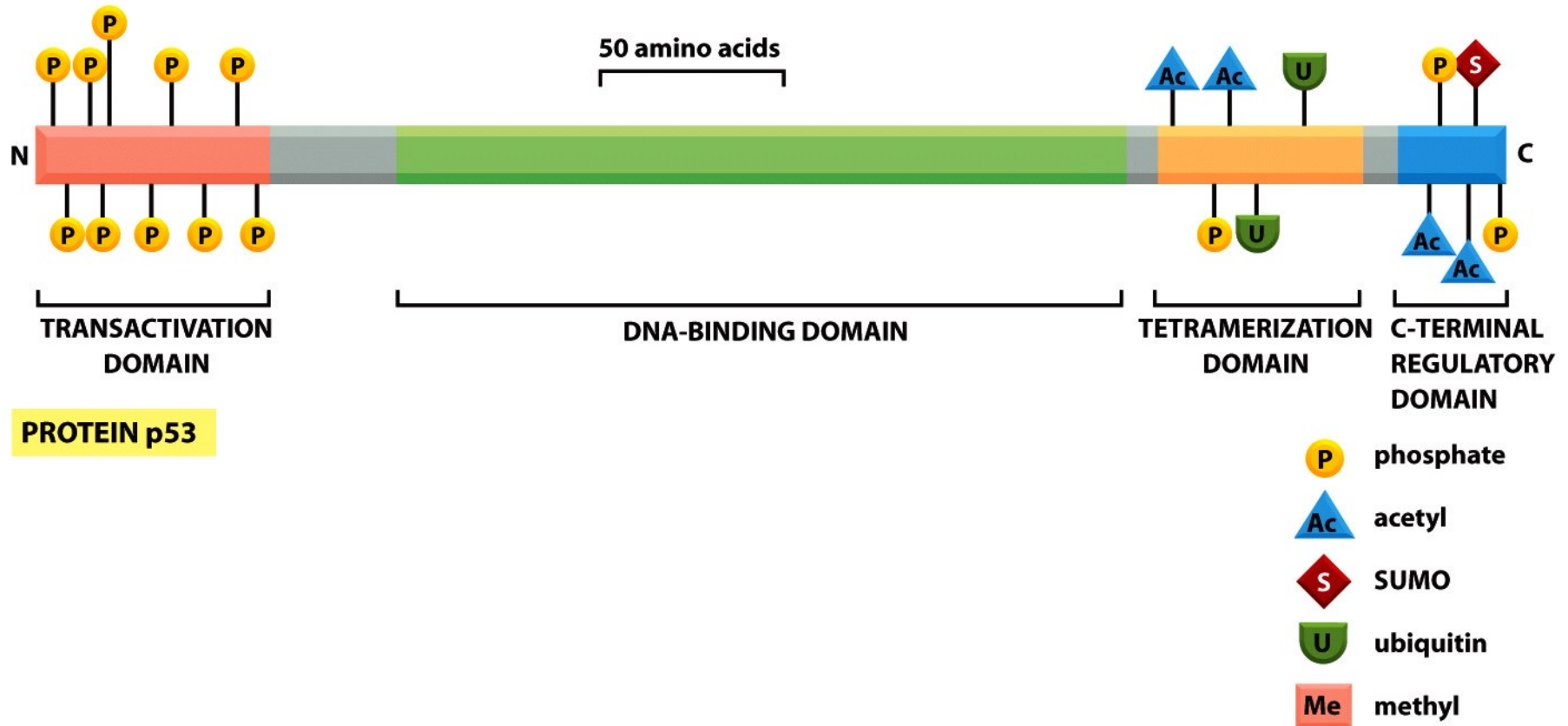


Figure 3-70 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

MOLTE PROTEINE SONO CONTROLLATE DA MODIFICAZIONI COVALENTI



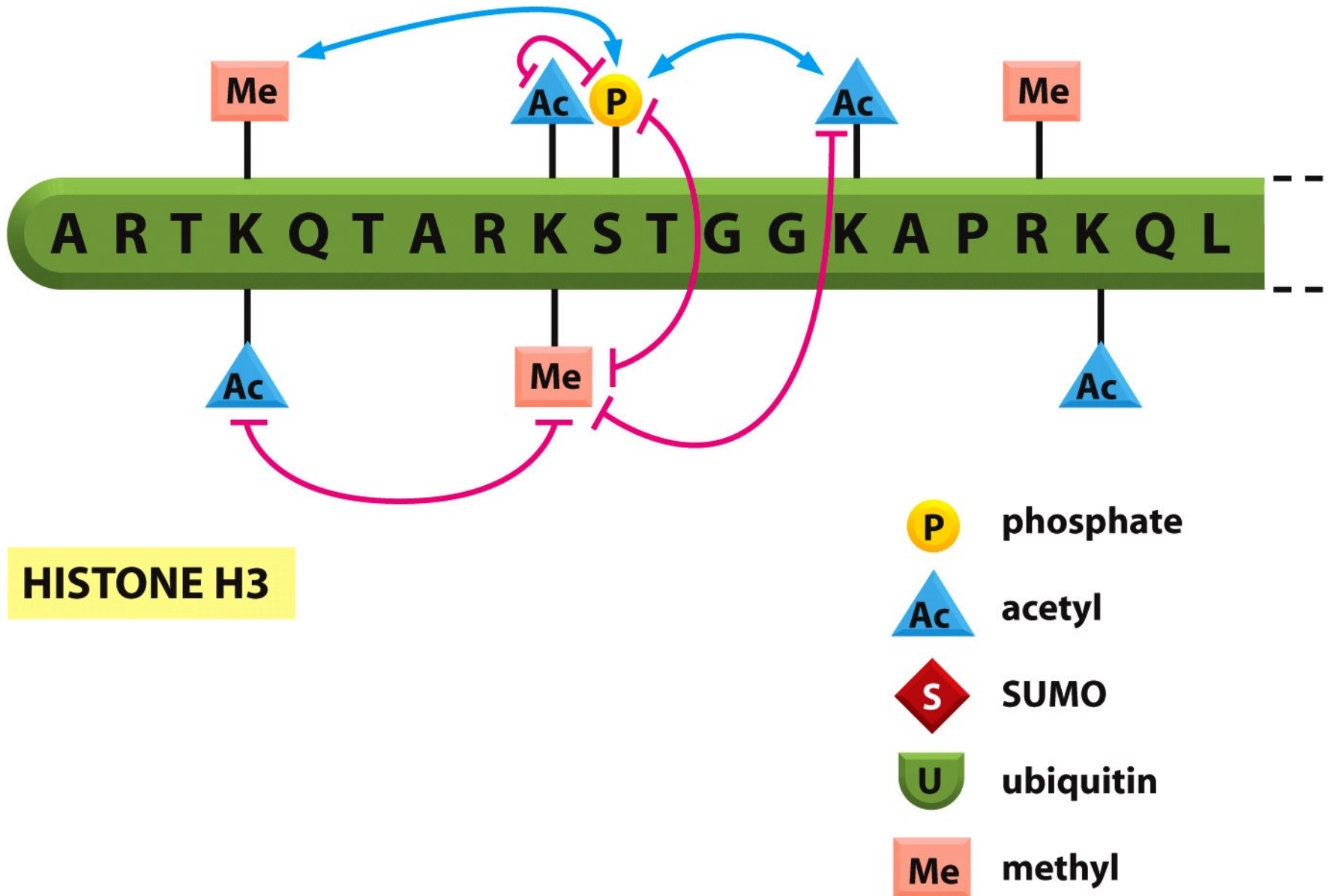
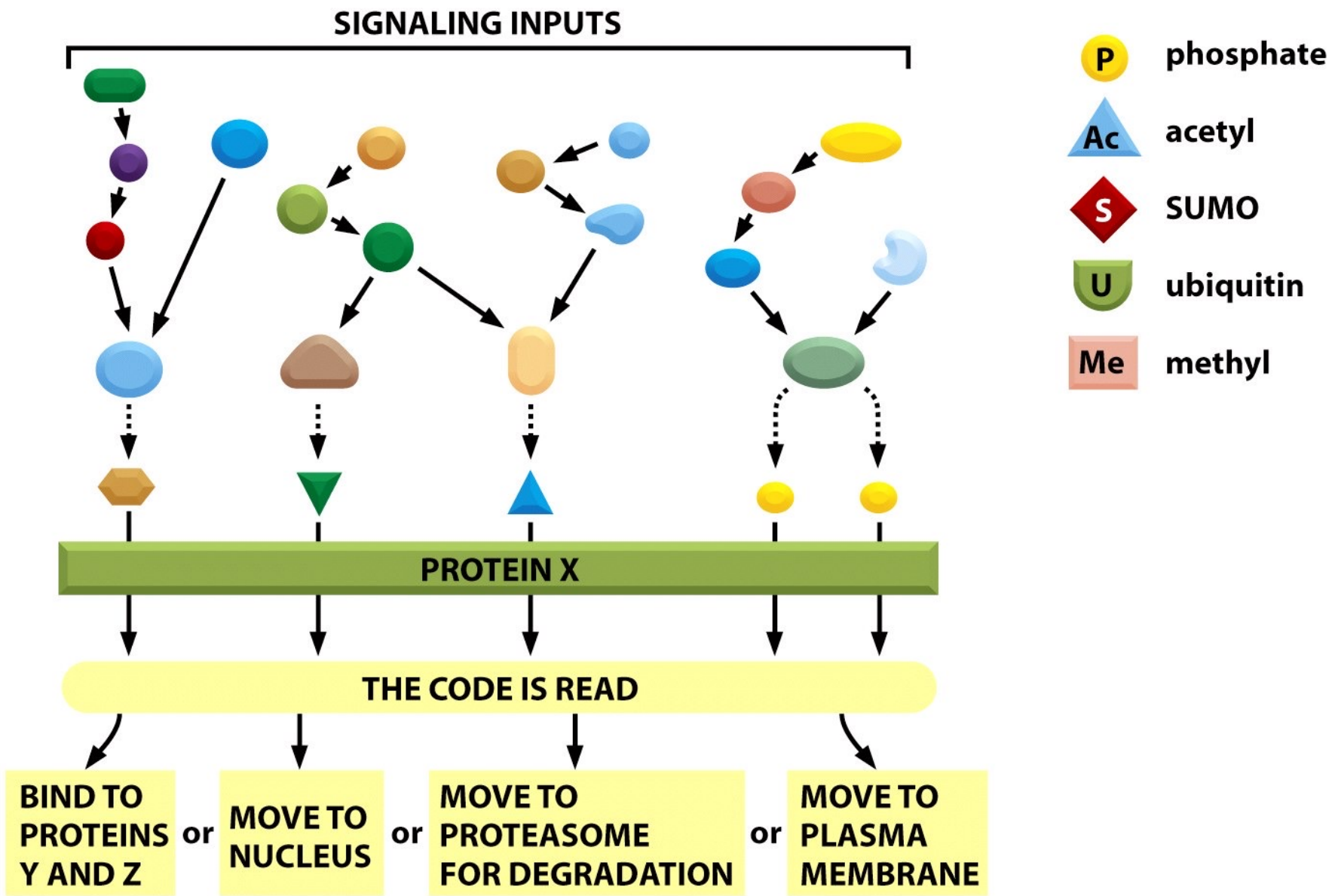


Figure 3-81b *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

MODIFICAZIONI MULTISITO, RETI DI SEGNALAZIONE ALTERAZIONE DEL COMPORTAMENTO CELLULARE



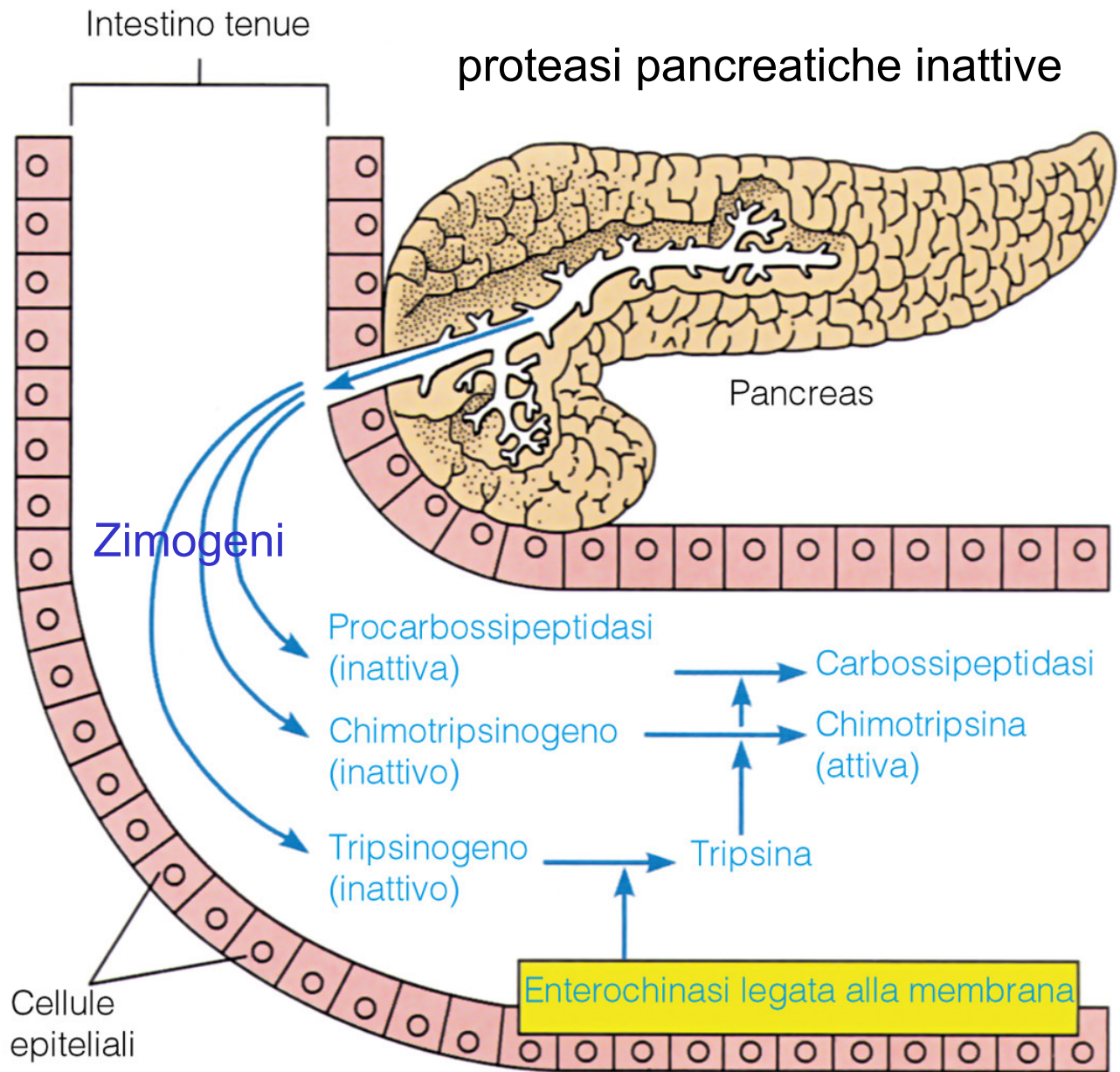


Figura 6-19

Attivazione per taglio proteolitico

Proteine di membrana

- Ciascuna membrana cellulare ha un set specifico di proteine che permette alla membrana di svolgere le proprie specifiche attività
- Le proteine di membrana sono sia integrali sia periferiche
- Le proteine integrali transmembrana o contengono una o più α eliche transmembrana o sono ancorate alla membrana attraverso catene idrocarburiche attaccate covalentemente
- Le proteine periferiche sono associate alle membrane grazie ad interazioni con proteine integrali

esempi di proteine di membrana

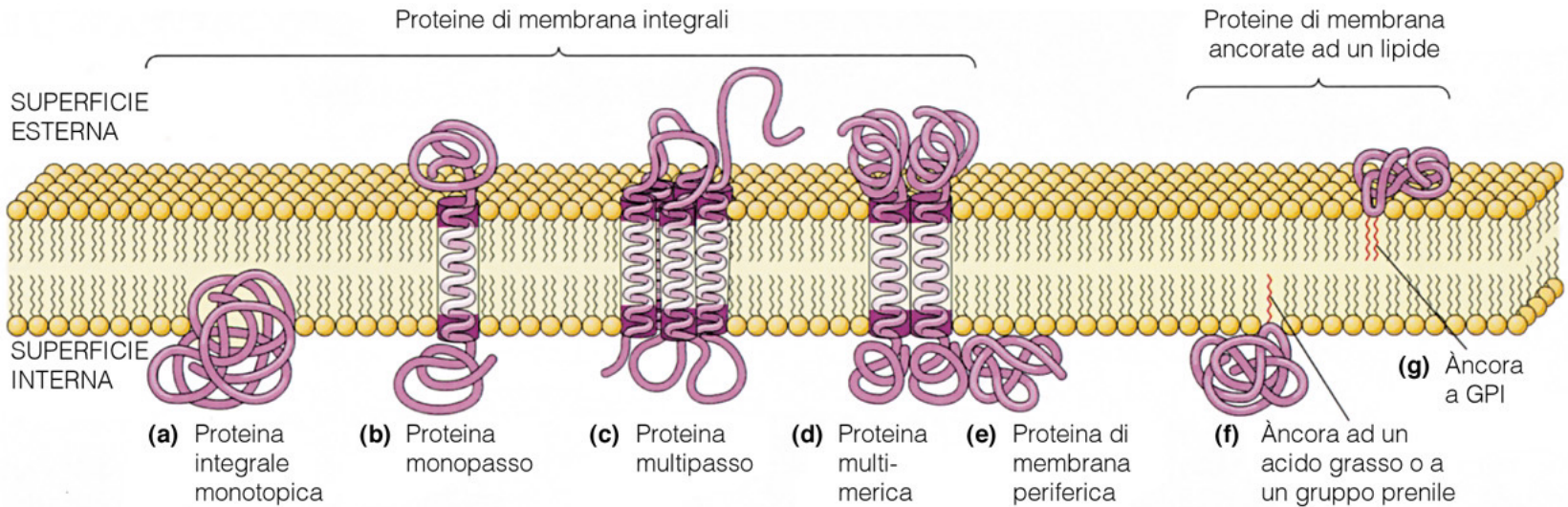
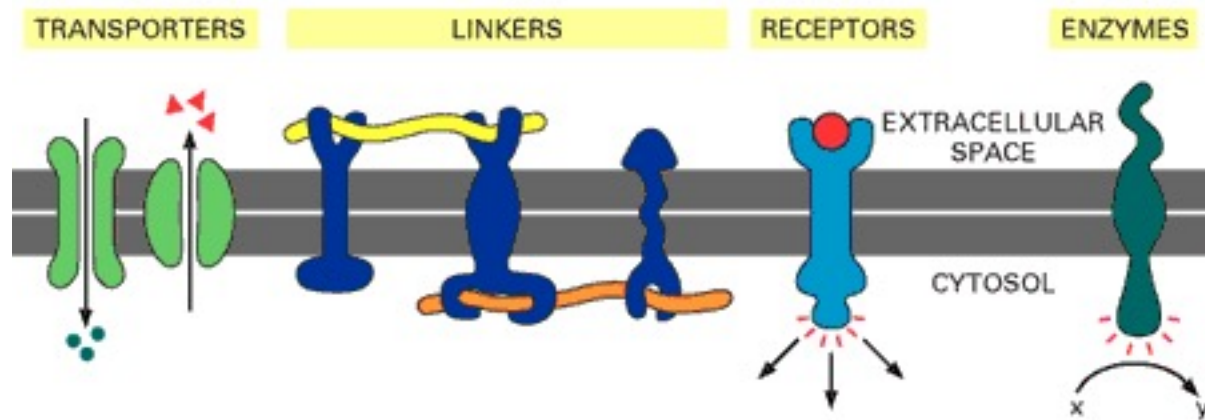


Fig-7-19

Proteine di membrana: funzione



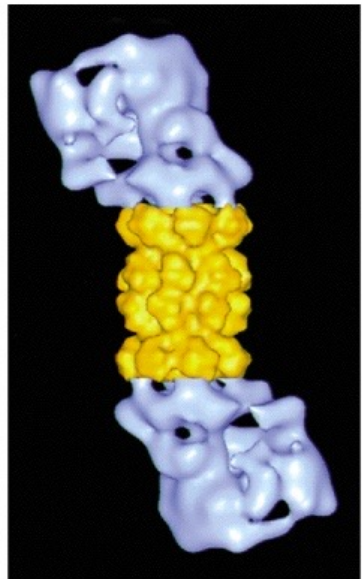
DEGRADAZIONE DELLE PROTEINE

Il sistema principale che opera la degradazione delle proteine, nel citoplasma e nel nucleo delle cellule eucariotiche è chiamato ubiquitina-proteasoma (UPS o UPP).

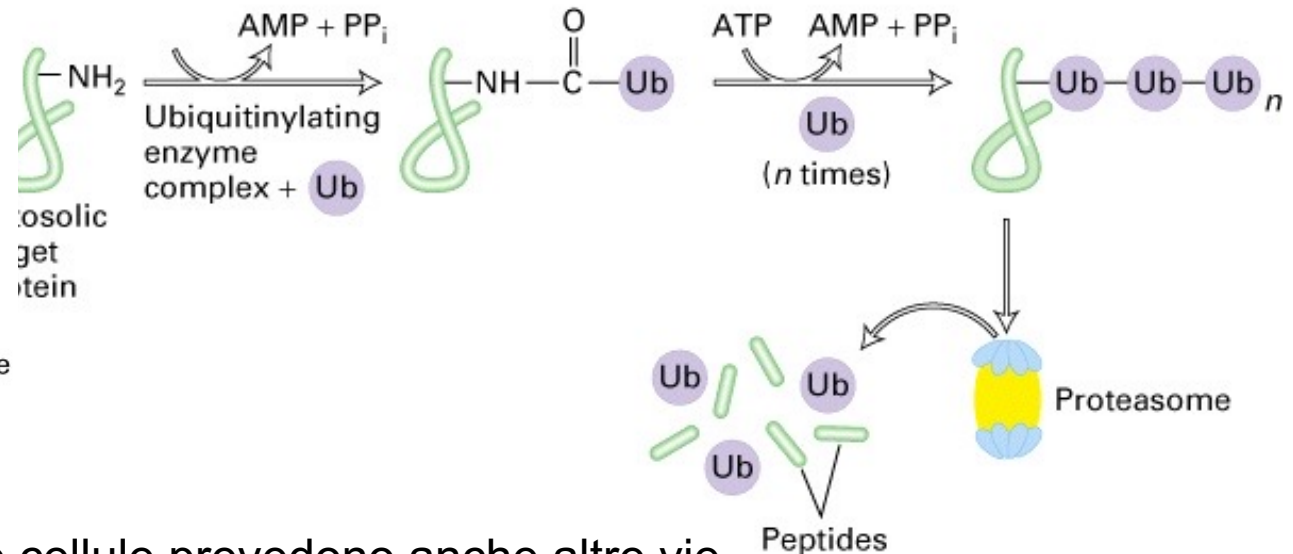
L'**ubiquitina**, una piccola proteina di 8.5 kDa presente in tutte le cellule eucariotiche è una sorta di contrassegno che serve ad identificare le proteine che devono essere distrutte.

La degradazione delle proteine attraverso la via mediata dall'ubiquitina

L'ubiquitina si lega ad uno o più residui di lisina della proteina bersaglio, mediante un complesso enzimatico di ubiquitinazione. Vengono quindi attaccate altre ubiquitine, per formare una corta catena. Questa serve da segnale di riconoscimento per un grosso complesso proteico chiamato proteasoma. Esistono diversi complessi di ubiquitinazione, ognuno dei quali agisce su un set differente di proteine.



Cap
Proteasome
Cap



Le cellule prevedono anche altre vie per la degradazione delle proteine

Degrone e poliubiquitina indirizzano le proteine al proteasoma

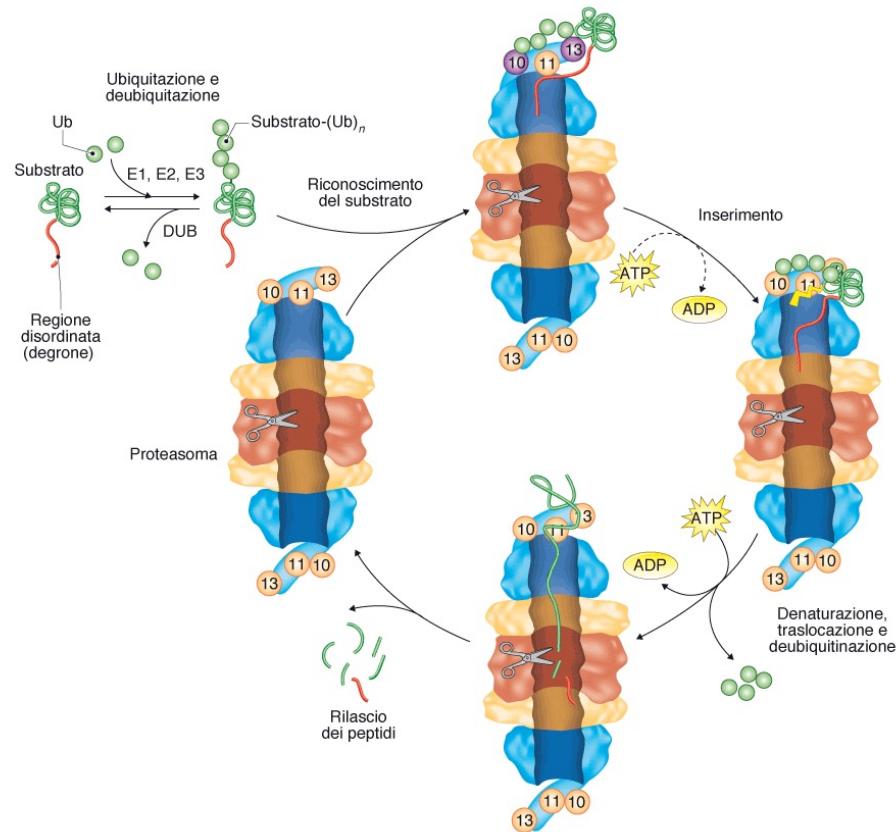


FIGURA 21.50 ▶ Schema del ciclo di degradazione del sistema ubiquitina-proteasoma. Le proteine vengono indirizzate al proteasoma tramite un segnale di degradazione costituito da due componenti: il degrone, che consiste di una regione a struttura disordinata, e una "etichetta" di poliubiquitina (Ub)_n, legata in maniera reversibile. La coda di poliubiquitina viene aggiunta attraverso una cascata di ubiquitinazione E1-E2-E3 e questo processo può essere revertito dalle DUB. Il proteasoma riconosce il substrato a livello della coda di ubiquitina grazie ai suoi recettori dell'ubiquitina (Rpn10 e Rpn13, in viola, in alto) e inizia a degradare partendo dalla regione non strutturata (in rosso). Una volta agganciato il substrato, il proteasoma denatura la proteina traslocandola nella cavità centrale della particella, dove avviene la proteolisi (in basso). La coda di poliubiquitina viene rimossa dall'enzima di deubiquitinazione intrinseco Rpn11 (in arancione) al cominciare della denaturazione e della degradazione della proteina.

Fosforilazione o defosforilazione possono indirizzare verso la degradazione

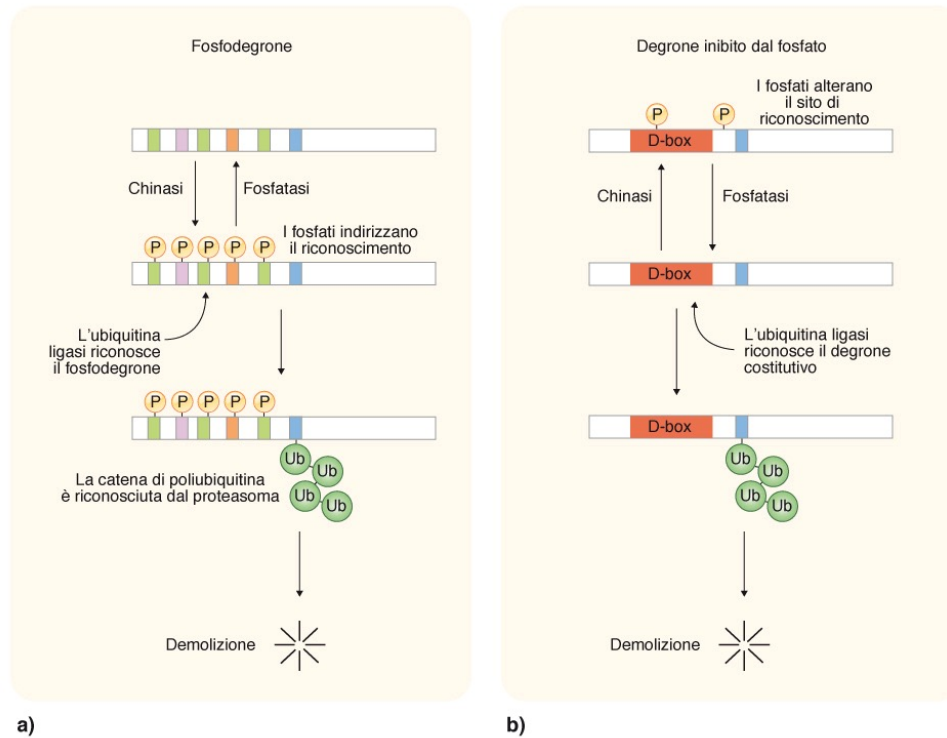


FIGURA 21.51 ► Modalità di regolazione che accoppiano la fosforilazione alla stabilità delle proteine. **a)** Il fosfodegrone: una chinasi fosforila residui amminoacidici in uno specifico contesto di sequenza per generare un fosfopeptide riconosciuto da una ubiquitina-ligasi. In assenza di fosforilazione la proteina è stabile, mentre quando viene fosforilata, viene degradata. **b)** Il degrone inibito dalla fosforilazione: un segnale di degradazione (D-box o degrone) viene riconosciuto da una ubiquitina-ligasi. Tuttavia, la fosforilazione di residui all'interno e adiacenti al degrone impedisce l'interazione tra il degrone e l'ubiquitina-ligasi, quindi la fosforilazione ha l'effetto di stabilizzare la proteina. I rettangoli colorati rappresentano gli amminoacidi.

Acidi Nucleici

- DNA e RNA sono polimeri di subunità nucleotidiche
- Polimeri INFORMATIVI
- L'acido desossiribonucleico (DNA) contiene l'informazione per la sequenza degli aminoacidi nelle proteine, in unità chiamate geni
- L'acido ribonucleico (RNA) entra nel macchinario cellulare che sceglie e unisce gli aminoacidi nella sequenza corretta

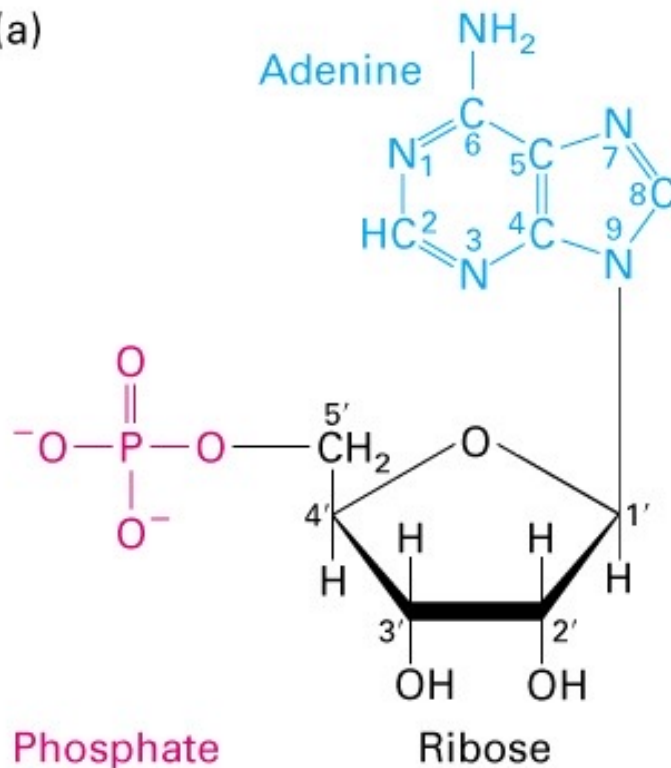
Il dogma centrale:

DNA --> RNA --> Proteine

Gli acidi nucleici sono costituiti da nucleotidi.

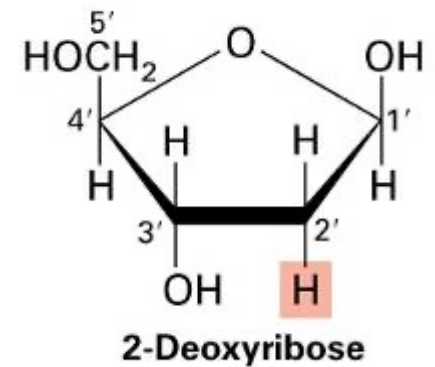
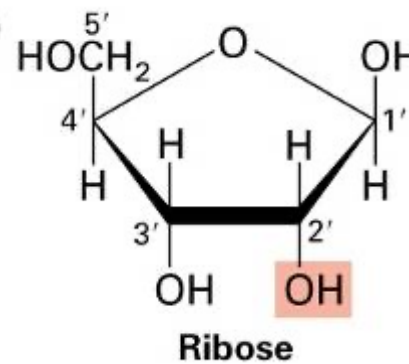
Tutti i nucleotidi hanno una struttura comune (1920-Levene)

(a)



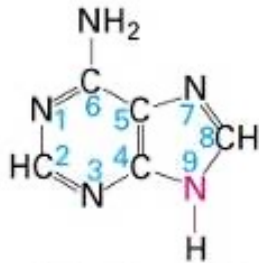
**Adenosine
5'-monophosphate
(AMP)**

(b)

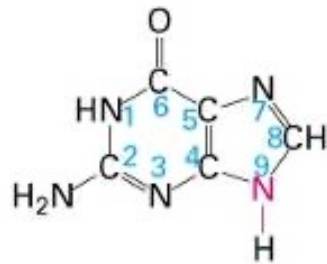


Negli acidi nucleici ci sono cinque basi azotate principali

PURINES

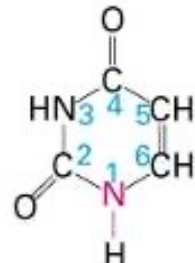


Adenine (A)

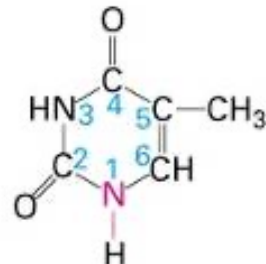


Guanine (G)

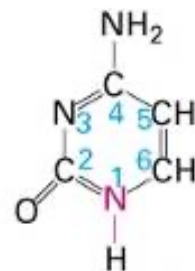
PYRIMIDINES



Uracil (U)



Thymine (T)



Cytosine (C)

A, G, T, C sono presenti nel DNA
A, G, U, C sono presenti nel RNA

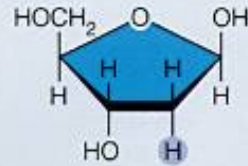
Gruppo fosfato

Zuccheri

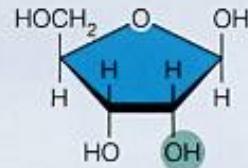
Basi

Purine

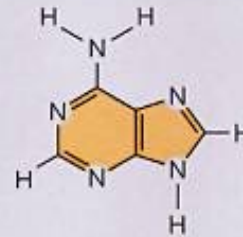
Pyrimidine



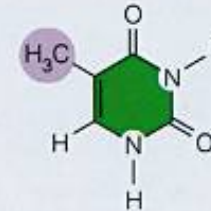
β -desossiribosio (nel DNA)



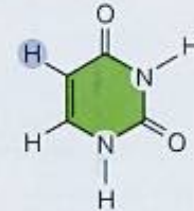
β -ribosio (nell'RNA)



Adenina (A)



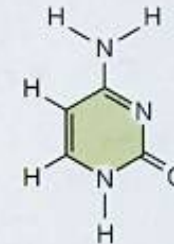
Timina (T)
(nel DNA)



Uracile (U)
(nell'RNA)

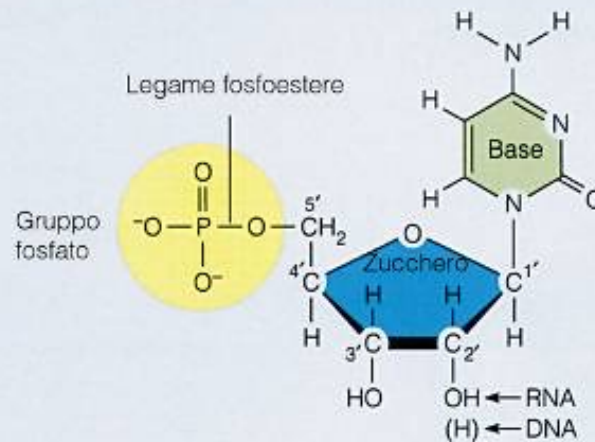


Guanina (G)

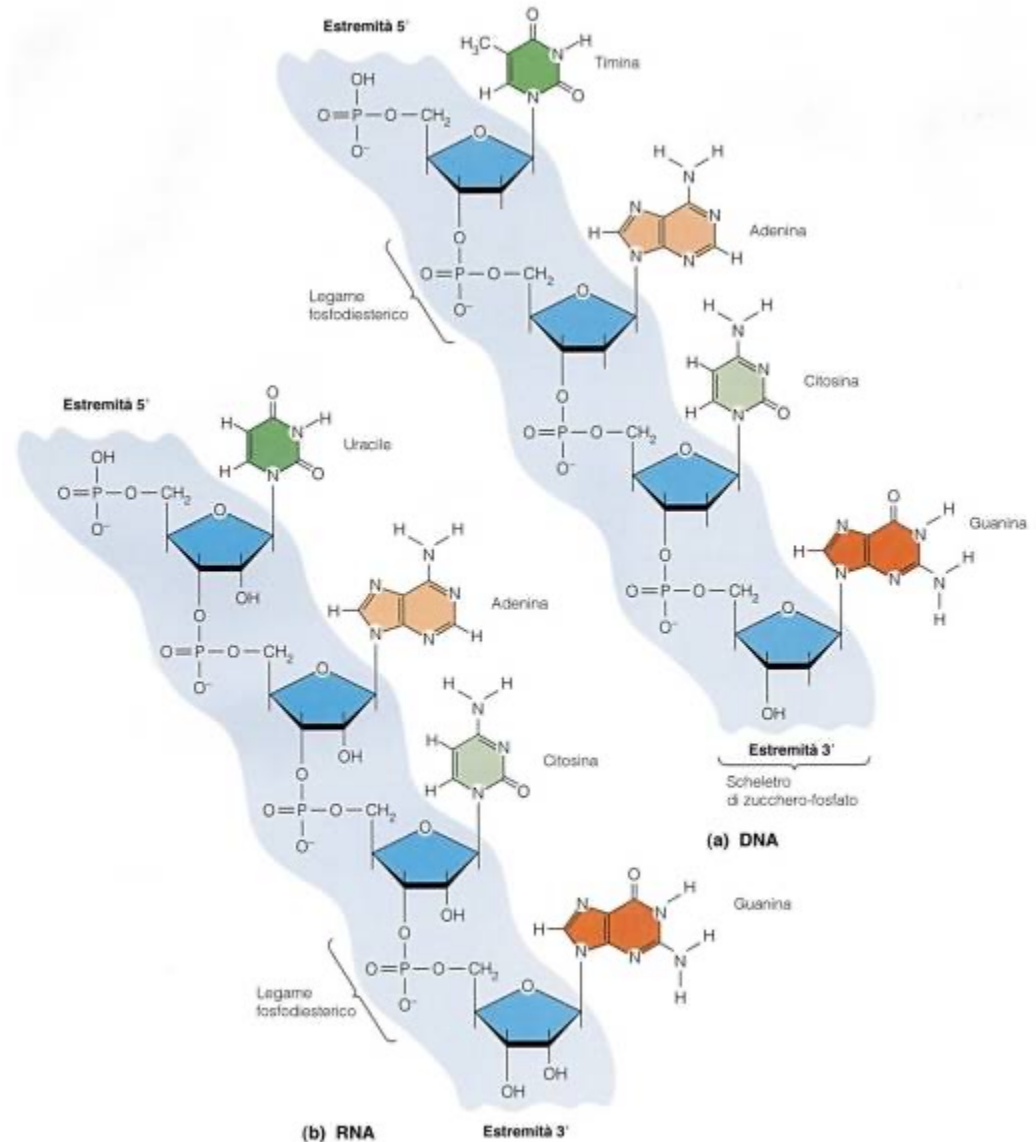
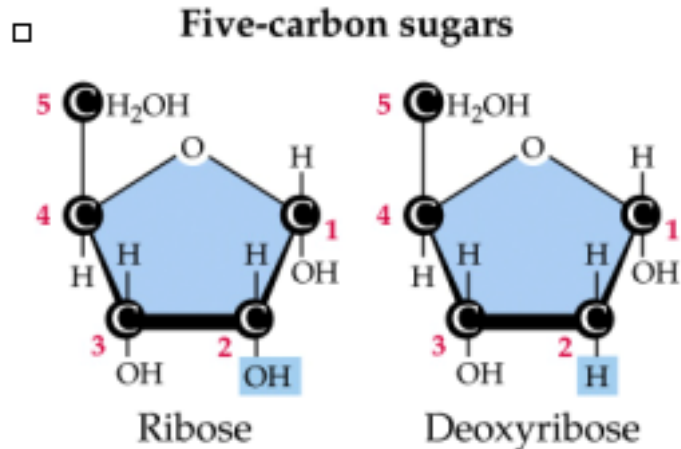


Citosina (C)

Nucleotide



I singoli nucleotidi si legano tra loro grazie a legami fosfodiesterici



(b) RNA

Estremità 3'

DNA: Il materiale genetico

- Oltre ad evidenze circostanziali, alcuni esperimenti hanno dimostrato che il DNA è il materiale genetico.

Esperimenti di Griffith (1928)

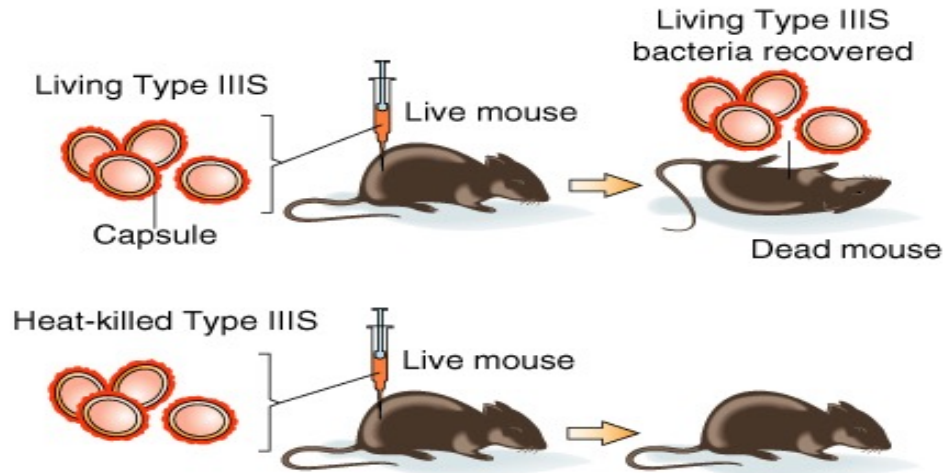
Pneumococco

Il **ceppo S**, detto anche "liscio" dal momento che produce colonie lisce e lucenti (grazie alla presenza di una capsula batterica polisaccaridica che avvolge ogni cellula). Questo ceppo è in grado di provocare la polmonite.

Il **ceppo R**, detto anche "rugoso" dal momento che produce colonie dall'aspetto "rugoso" (a causa dell'assenza della capsula batterica). Questo ceppo non è in grado di provocare polmonite.

Esperimenti di Griffith (1928)

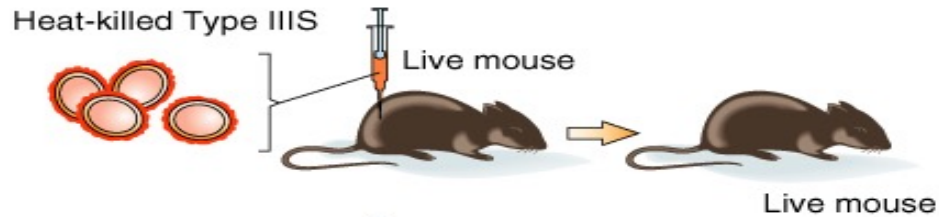
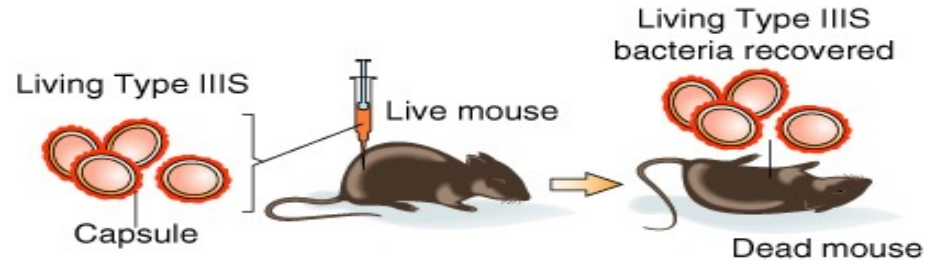
Ceppo virulento



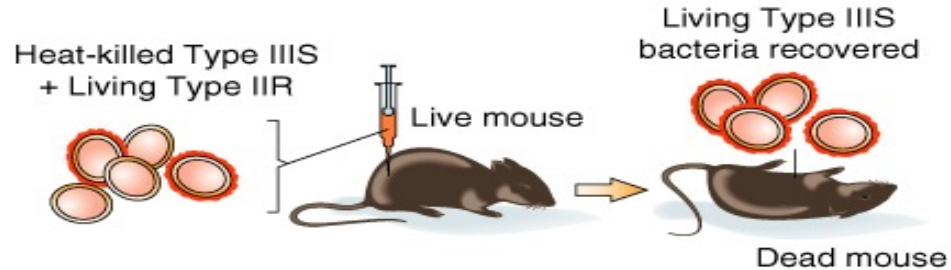
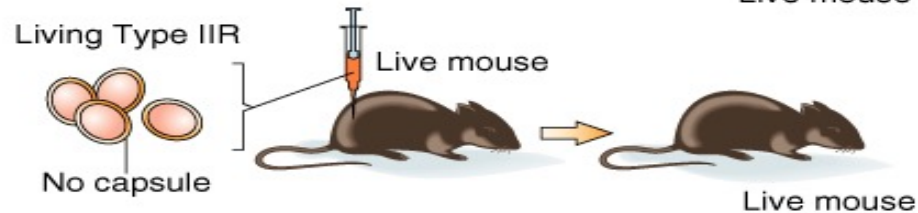
Esperimenti di Griffith (1928)

Un agente chimico è in grado di trasferire informazione genetica da un vivente all'altro.

Ceppo virulento



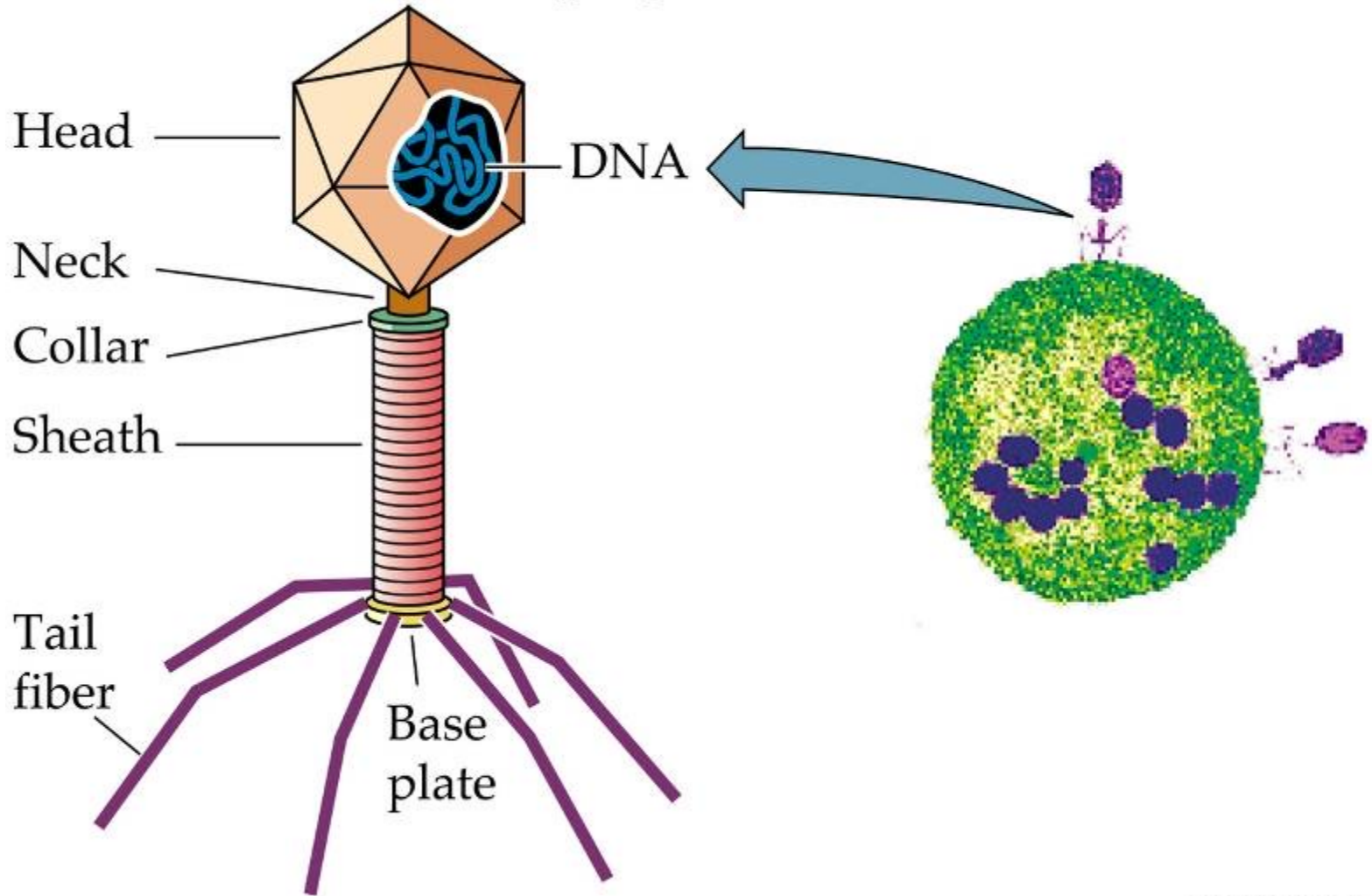
Ceppo non virulento



- Alcuni batteri **IIR**, in seguito all'interazione con batteri morti **IIS** **si erano trasformati in IIS**.
Evidentemente all'interno degli IIS morti doveva essere presente una qualche sostanza in grado di conferire ai batteri IIR che l'acquisivano la capacità di sintetizzare la capsula polisaccaridica.
- Griffith chiamò il materiale genetico "principio trasformante".

- L' esperimento dimostra che un agente chimico (non vivente) presente nel ceppo virulento del batterio pneumococco è responsabile della morte del topo.
- Questo agente chimico è in grado di trasferirsi e quindi di trasformare geneticamente i batteri non virulenti nella forma virulenta.
- Qual'è questo agente trasformante?

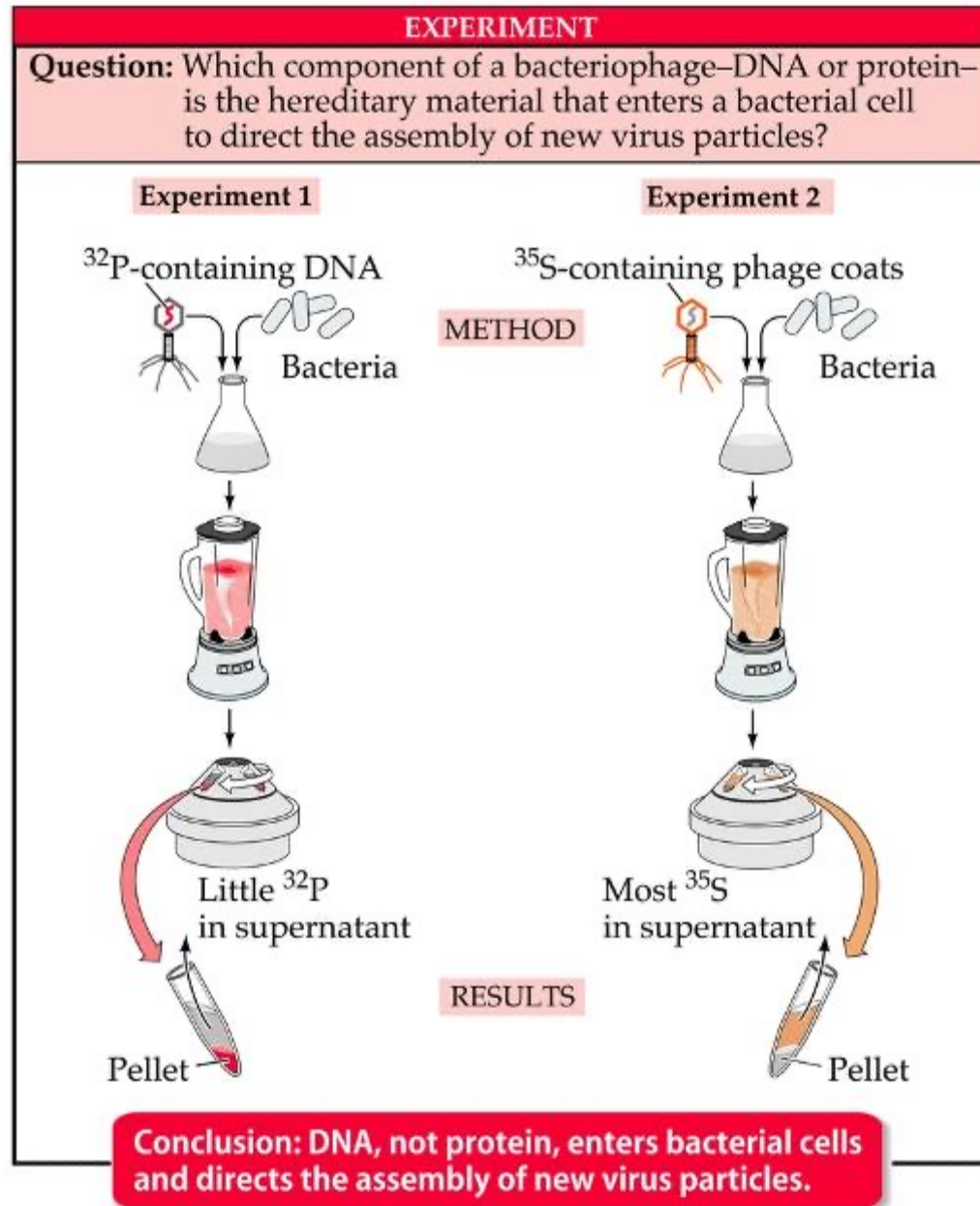
(a) The virus: T2 bacteriophage



Esperimento di Hershey e Chase (1952)

- In questo esperimento, virus marcati erano incubati con batteri ospiti. Il DNA virale marcato entrato nella cellula ospite, produce centinaia di nuove particelle virali marcate. Se sono marcate le proteine del virus, i batteri ospiti non producono nuove particelle virali marcate

Esperimento di Hershey e Chase (1952)



DNA: Il materiale genetico

- Oltre ad evidenze circostanziali, altri esperimenti hanno dimostrato che il DNA è il materiale genetico.

La struttura del DNA

(Chargaff 1944-1952)

L'analisi delle molecole di DNA di specie diverse permette di definire che:

“nelle molecole di DNA ci sono eguali quantità di adenina e timina ($A=T$) e eguali quantità di guanina e citosina ($G=C$).

Le regole di Chargaff-1952

Tabella 2.2 Composizione in basi del DNA da vari organismi

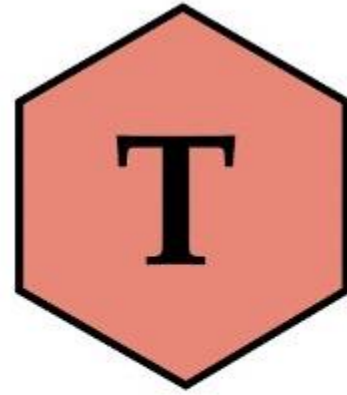
Origine del DNA	Percentuale della base nel DNA				Rapporti		
	A	T	G	C	A/T	G/C	(A + T) / (G + C)
Uomo (sperma)	31,0	31,5	19,1	18,4	0,98	1,03	1,67
Mais (<i>Zea mays</i>)	25,6	25,3	24,5	24,6	1,01	1,00	1,04
<i>Drosophila</i>	27,3	27,6	22,5	22,5	0,99	1,00	1,22
Nucleo di <i>Euglena</i>	22,6	24,4	27,7	25,8	0,93	1,07	0,88
<i>Escherichia coli</i>	26,1	23,9	24,9	25,1	1,09	0,99	1,00

sempre costanti

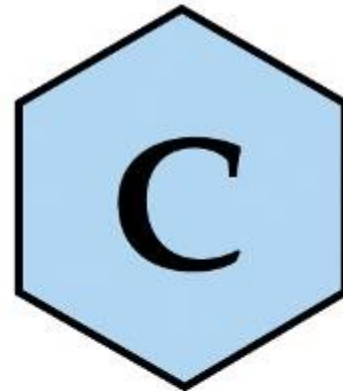
specie-specifici



=



=

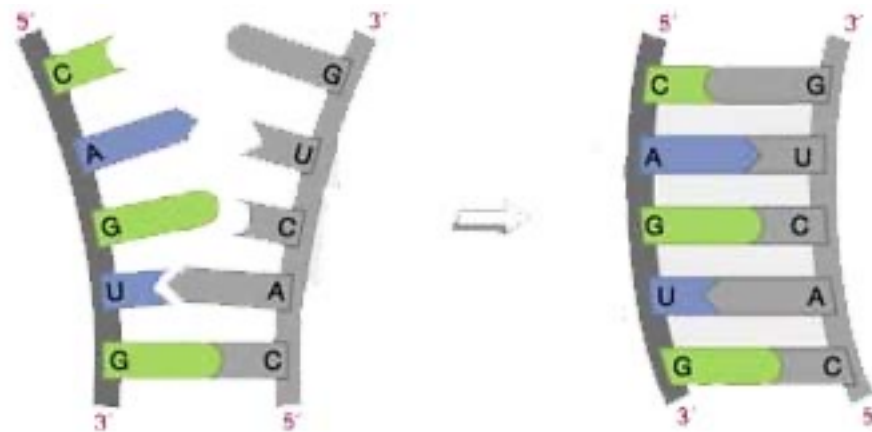


Purines

= Pyrimidines

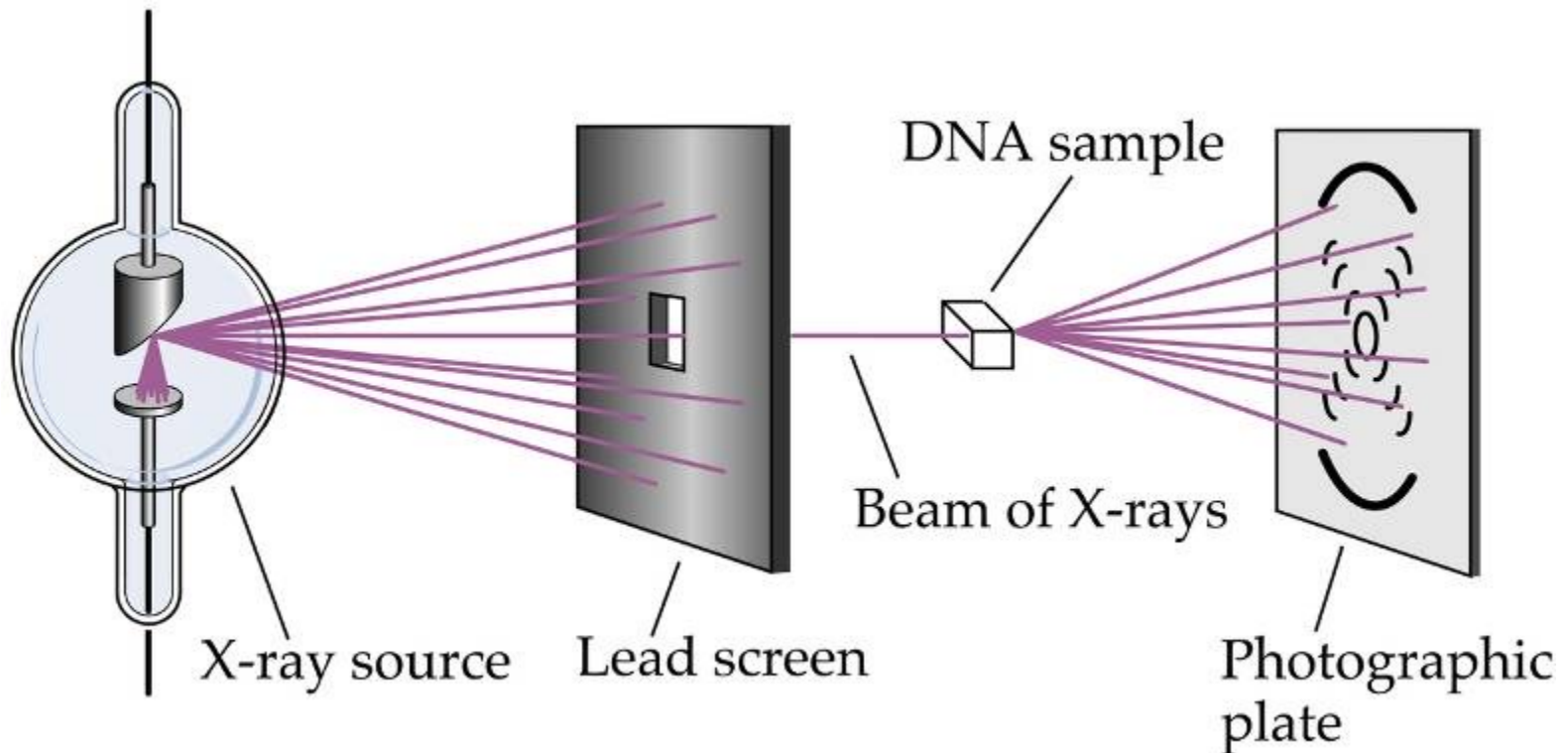
Sequence Alignment as a method to determine structure

- Bases pair in order to form backbones and determine the secondary structure
- Aligning bases based on their ability to pair with each other gives an algorithmic approach to determining the optimal structure



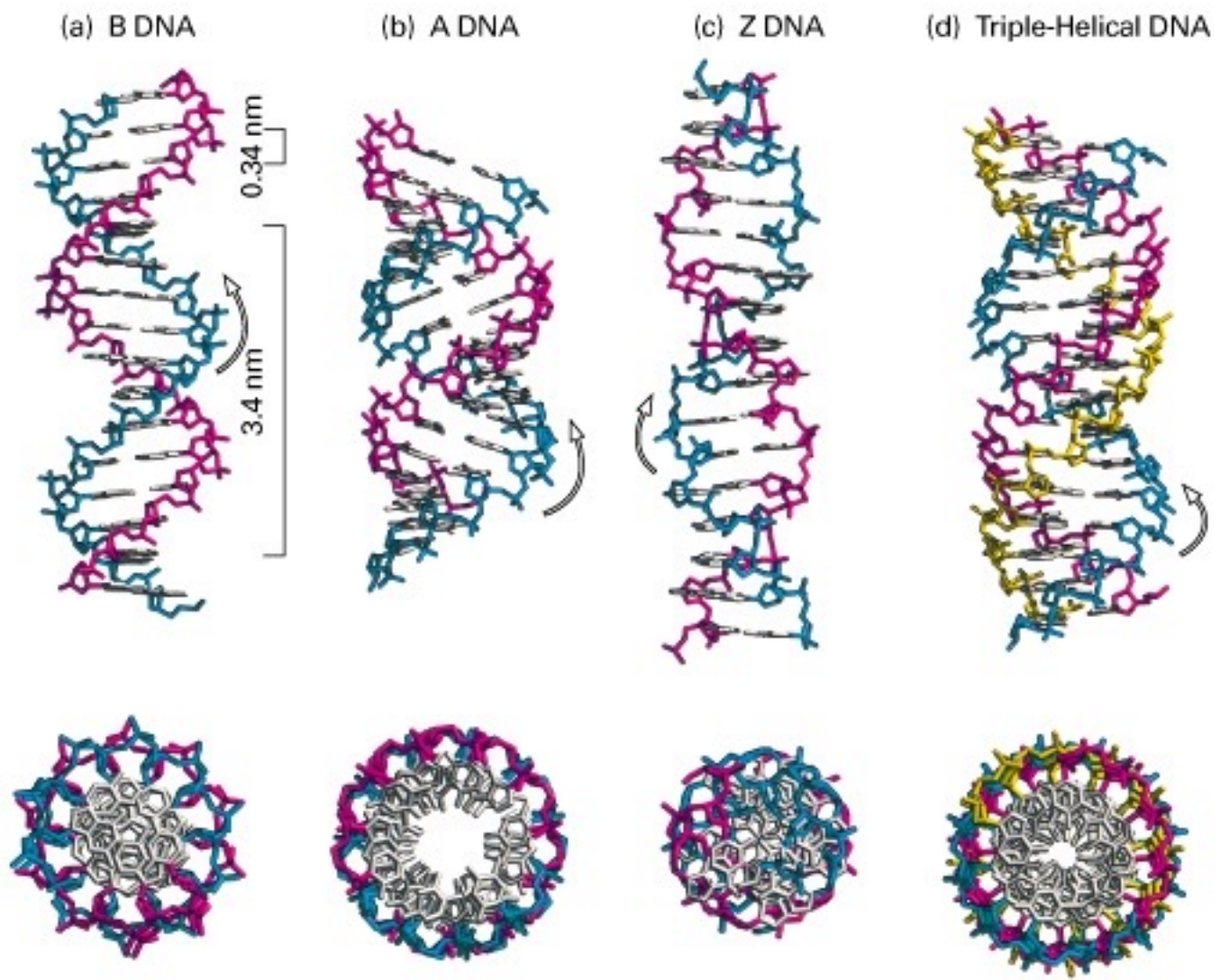
La struttura del DNA

Watson e Crick, Wilkins e Rosalind Franklin
-1953

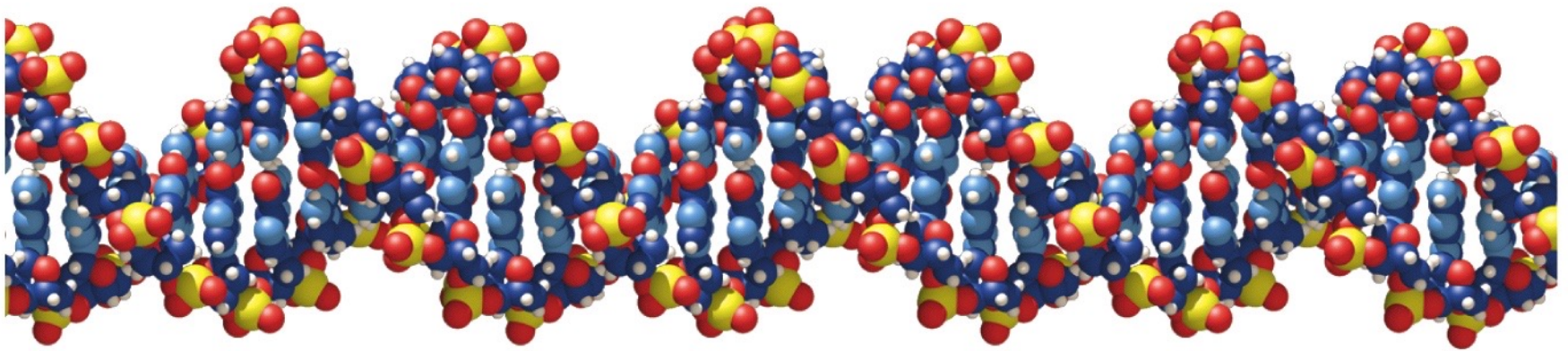


© 2000 Sinauer Associates, Inc.

- La cristallografia a raggi-X ha mostrato che la molecola di DNA è una doppia elica



Immagini cristallografiche



© 2001 Sinauer Associates, Inc.

-Struttura elicoidale

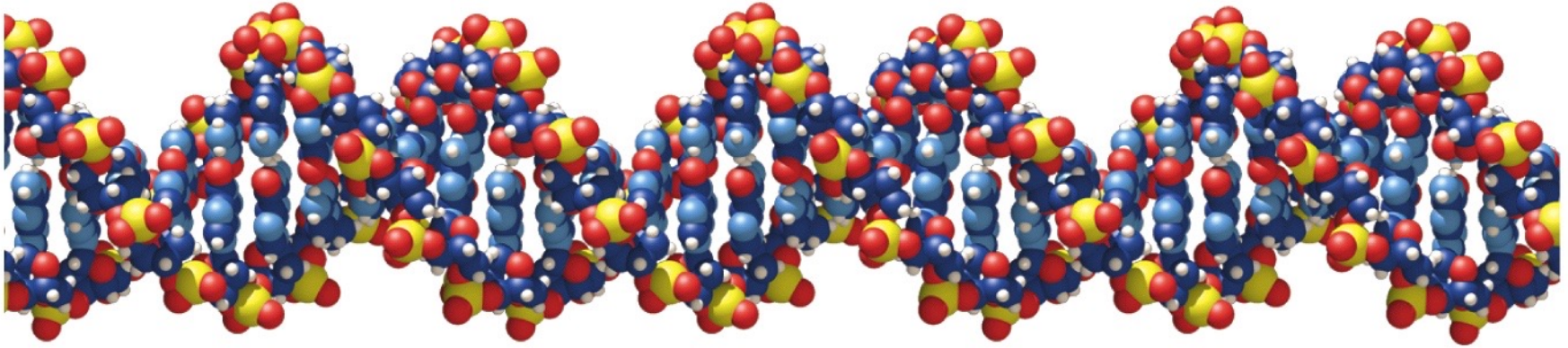
-La densità atomica escludeva un singolo filamento (2 0 3?)

-Come interagivano le basi fra di loro? Si sapeva che una soluzione di DNA perdeva la sua viscosità se esposta a 70-80° C (rottura di legami idrogeno)

-Le regole di Chargaff potevano essere spiegate mediante complementarità di 2filamenti nella struttura elicoidale

Seguendo queste indicazioni, W e C , con filo di ferro e sagome di cartone costruirono modelli su modelli sino ad ottenerne uno che soddisfaceva tutte le informazioni disponibili.

La struttura del DNA



© 2001 Sinauer Associates, Inc.

- Watson e Crick nel 1953 proposero per il DNA una struttura a doppia elica destrorsa con filamenti antiparalleli e con le basi mantenute appaiate da legami idrogeno.
- L'unica vera invenzione di W e C era la complementarità tra due eliche antiparallele (non provata sperimentalmente fino al 1961 da Korneberg). L'insieme del modello costituiva però una novità assoluta.

MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS

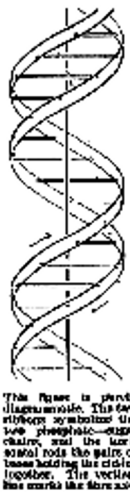
A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid

We wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.). This structure has novel features which are of considerable biological interest.

A structure for nucleic acid has already been proposed by Pauling and Corey (1). They kindly made their manuscript available to us in advance of publication. Their model consists of three intertwined chains, with the phosphates near the fibre axis, and the bases on the outside. In our opinion, this structure is unsatisfactory for two reasons: (1) We believe that the material which gives the X-ray diagrams is the salt, not the free acid. Without the acidic hydrogen atoms it is not clear what forces would hold the structure together, especially as the negatively charged phosphates near the axis will repel each other. (2) Some of the van der Waals distances appear to be too small.

Another three-chain structure has also been suggested by Fraser (in the press). In his model the phosphates are on the outside and the bases on the inside, linked together by hydrogen bonds. This structure as described is rather ill-defined, and for this reason we shall not comment on it.

We wish to put forward a radically different structure for the salt of deoxyribose nucleic acid. This structure has two helical chains each coiled round the same axis (see diagram). We have made the usual chemical assumptions, namely, that each chain consists of phosphate diester groups joining B-D-deoxyribofuranose residues with 3',5' linkages. The two chains (but not their bases) are related by a dyad perpendicular to the fibre axis. Both chains follow right-handed helices, but owing to the dyad the sequences of the atoms in the two chains run in opposite directions. Each chain loosely resembles Furberg's model No. 1; that is, the bases are on the inside of the helix and the phosphates on the outside. The configuration of the sugar and the atoms near it is close to Furberg's 'standard configuration', the sugar being roughly perpendicular to the attached base. There is a residue on each every 3.4 Å. in the z-direction. We have assumed an angle of 36° between adjacent



residues in the same chain, so that the structure repeats after 10 residues on each chain, that is, after 34 Å. The distance of a phosphorus atom from the fibre axis is 10 Å. As the phosphates are on the outside, cations have easy access to them.

The structure is an open one, and its water content is rather high. At lower water contents we would expect the bases to tilt so that the structure could become more compact.

The novel feature of the structure is the manner in which the two chains are held together by the purine and pyrimidine bases. The planes of the bases are perpendicular to the fibre axis. They are joined together in pairs, a single base from the other chain, so that the two lie side by side with identical z-co-ordinates. One of the pair must be a purine and the other a pyrimidine for bonding to occur. The hydrogen bonds are made as follows: purine position 1 to pyrimidine position 1; purine position 6 to pyrimidine position 6. If it is assumed that the bases only occur in the structure in the most plausible tautomeric forms (that is, with the keto rather than the enol configurations) it is found that only specific pairs of bases can bond

together. These pairs are: adenine (purine) with thymine (pyrimidine), and guanine (purine) with cytosine (pyrimidine).

In other words, if an adenine forms one member of a pair, on either chain, then on these assumptions the other member must be thymine; similarly for guanine and cytosine. The sequence of bases on a single chain does not appear to be restricted in any way. However, if only specific pairs of bases can be formed, it follows that if the sequence of bases on one chain is given, then the sequence on the other chain is automatically determined.

It has been found experimentally (3,4) that the ratio of the amounts of adenine to thymine, and the ratio of guanine to cytosine, are always very close to unity for deoxyribose nucleic acid.

It is probably impossible to build this structure with a ribose sugar in place of the deoxyribose, as the extra oxygen atom would make too close a van der Waals contact. The previously published X-ray data (5,6) on deoxyribose nucleic acid are insufficient for a rigorous test of our structure. So far as we can tell, it is roughly compatible with the experimental data, but it must be regarded as unproved until it has been checked against more exact results. Some of these are given in the following communications. We were not aware of the details of the results presented there when we devised our structure, which rests mainly though not entirely on published experimental data and stereochemical arguments.

It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.

Full details of the structure, including the conditions assumed in building it, together with a set of co-ordinates for the atoms, will be published elsewhere.

We are much indebted to Dr. Jerry Donohue for constant advice and criticism, especially on interatomic distances. We have also been stimulated by a knowledge of the general nature of the unpublished experimental results and ideas of Dr. M. H. F. Wilkins, Dr. R. E. Franklin and their co-workers at King's College, London. One of us (J. D. W.) has been aided by a fellowship from the National Foundation for Infantile Paralysis.

J. D. WATSON
F. H. C. CRICK

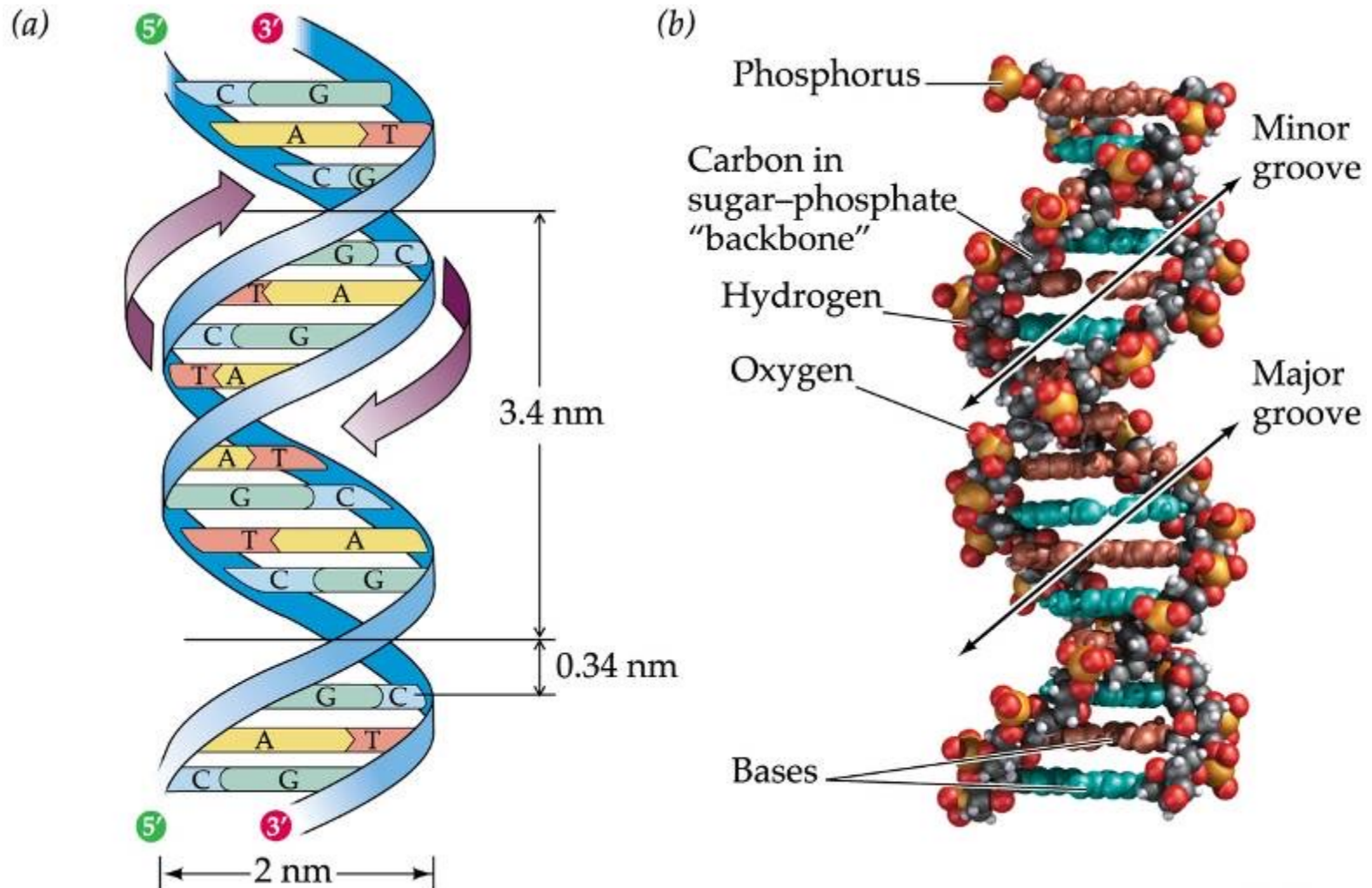
Medical Research Council Unit for the Study of Molecular Structure of Biological Systems, Cavendish Laboratory, Cambridge.

1. Pauling, L., and Corey, R. B., Nature, 171, 346 (1953); Proc. U.S. Nat. Acad. Sci., 39, 84 (1953).
2. Furberg, S., Acta Chem. Scand., 6, 634 (1952).
3. Chargaff, E., for references see Zamenhof, S., Brawerman, G., and Chargaff, E., Biochim. et Biophys. Acta, 9, 402 (1952).
4. Wyatt, G. R., J. Gen. Physiol., 36, 201 (1952).
5. Astbury, W. T., Symp. Soc. Exp. Biol. 1, Nucleic Acid, 66 (Camb. Univ. Press, 1947).
6. Wilkins, M. H. F., and Randall, J. T., Biochim. et Biophys. Acta, 10, 192 (1953).

e alla fine.....

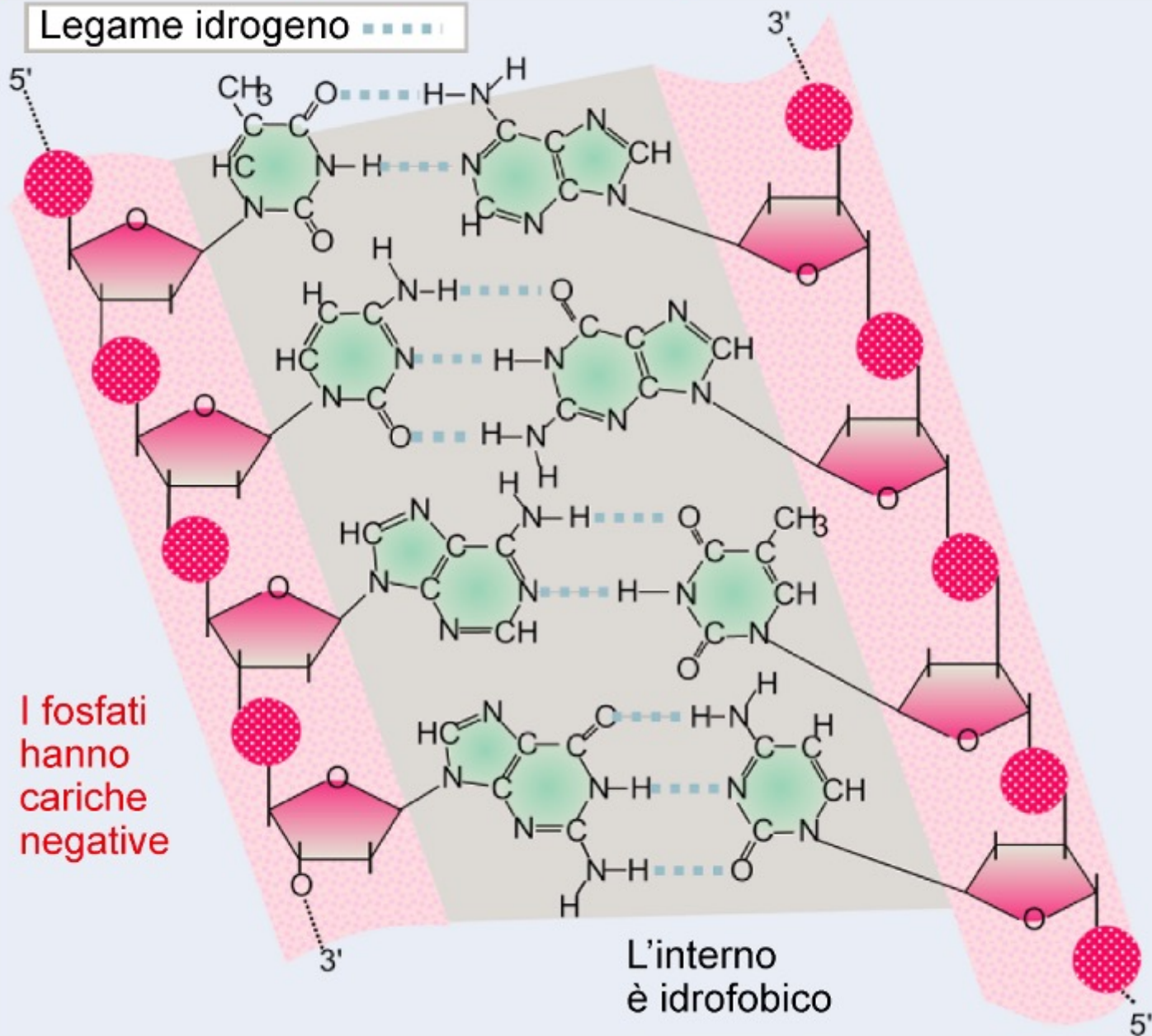
- Watson, Crick e Wilkins furono insigniti del Premio Nobel nel 1962.
- Rosalind Franklin era già morta di leucemia.

Il DNA nativo è una doppia elica destrorsa di catene antiparallele complementari



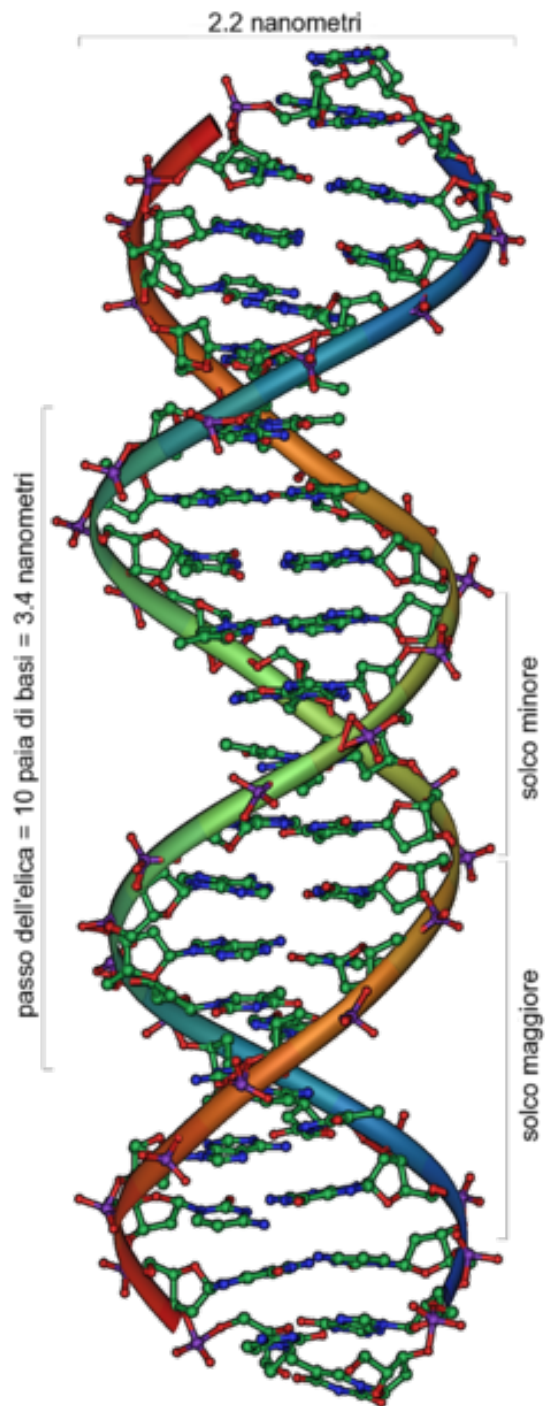
La doppia elica ha una larghezza costante

Legame idrogeno

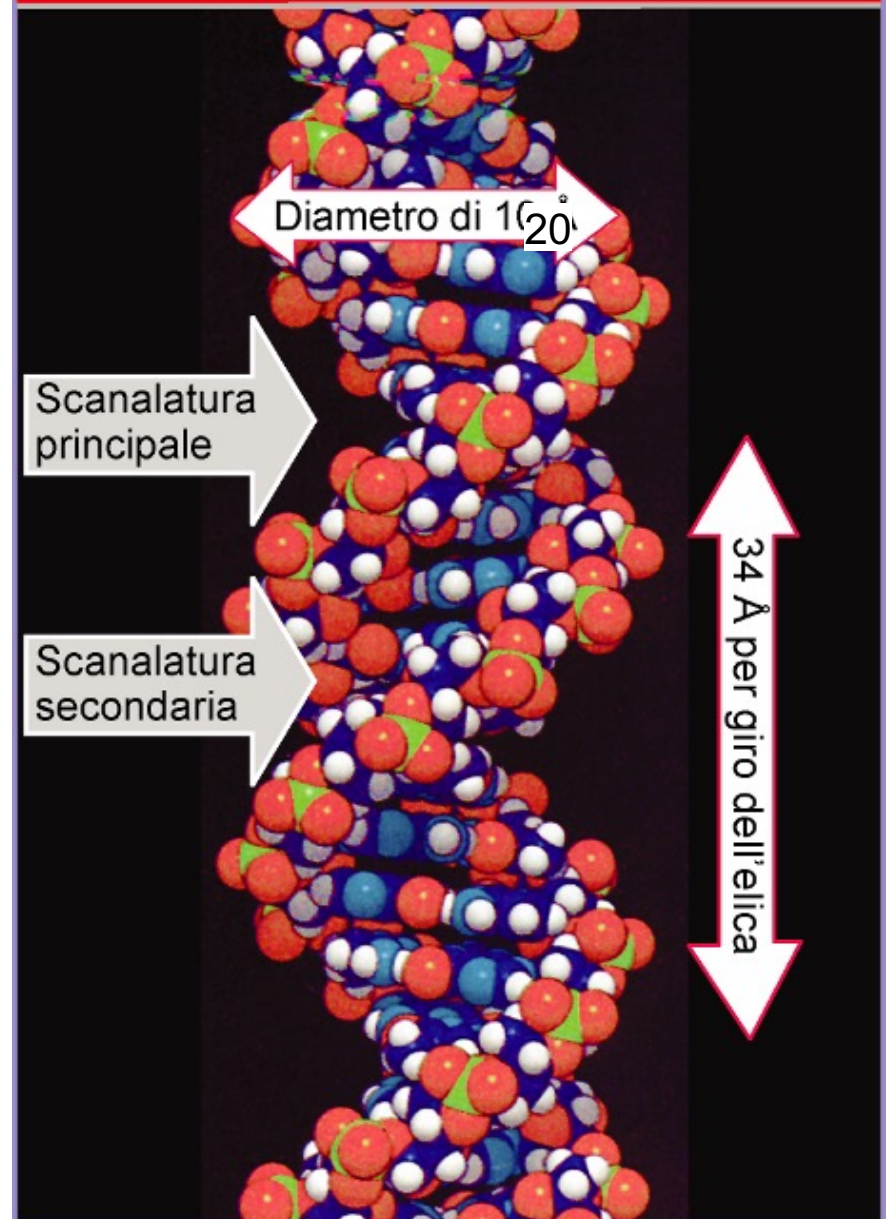


I fosfati hanno cariche negative

L'interno è idrofobico



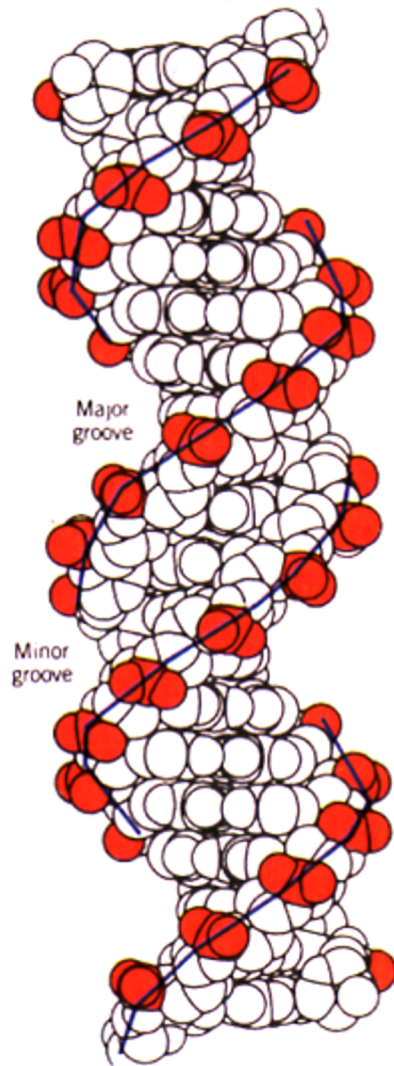
La doppia elica del DNA ha due scanalature



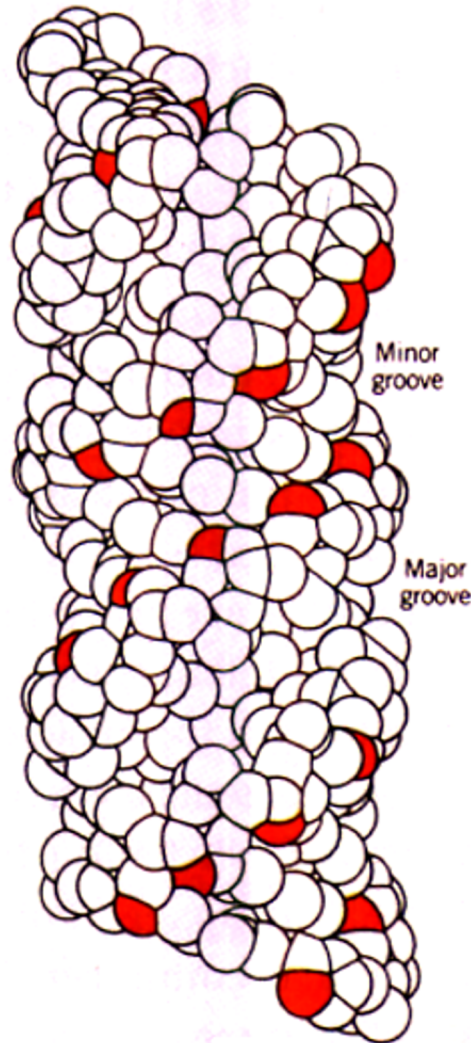
La struttura del DNA (B)

- Il DNA ha una forma ad elica regolare, diametro 20Å, passo 34Å
- Legami idrogeno tra le basi
- L'impilamento delle basi è determinato da interazioni idrofobiche
- Ogni coppia è ruotata di 36°
- Solchi maggiore (22Å) e minore (12Å)
- Avvolgimento in senso orario (elica destrorsa)

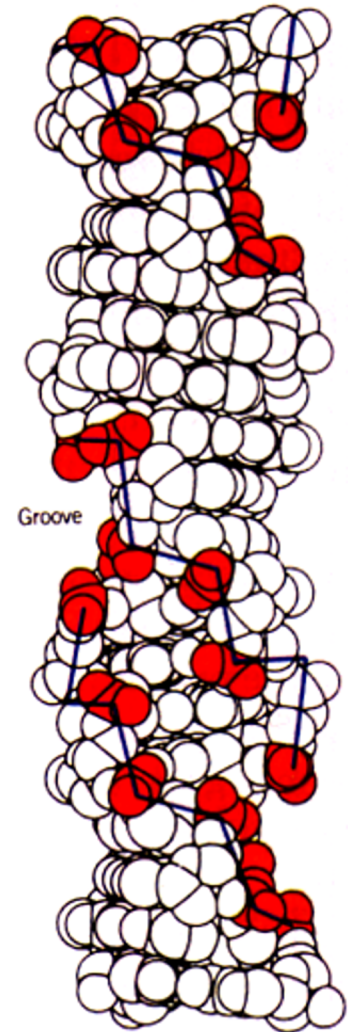
Gli acidi nucleici possono formare vari tipi di doppia elica



DNA B



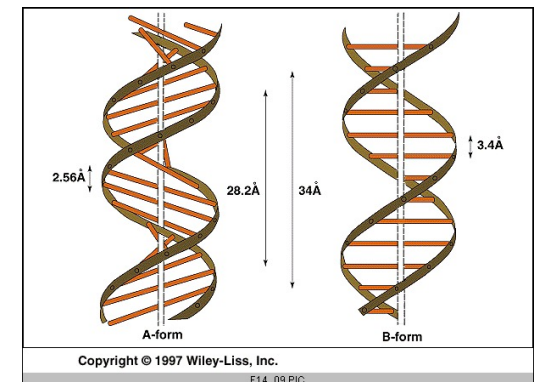
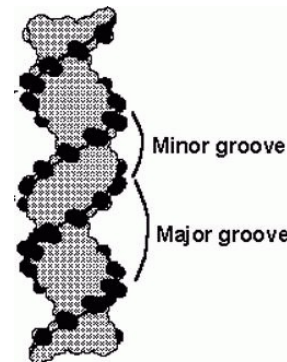
DNA A



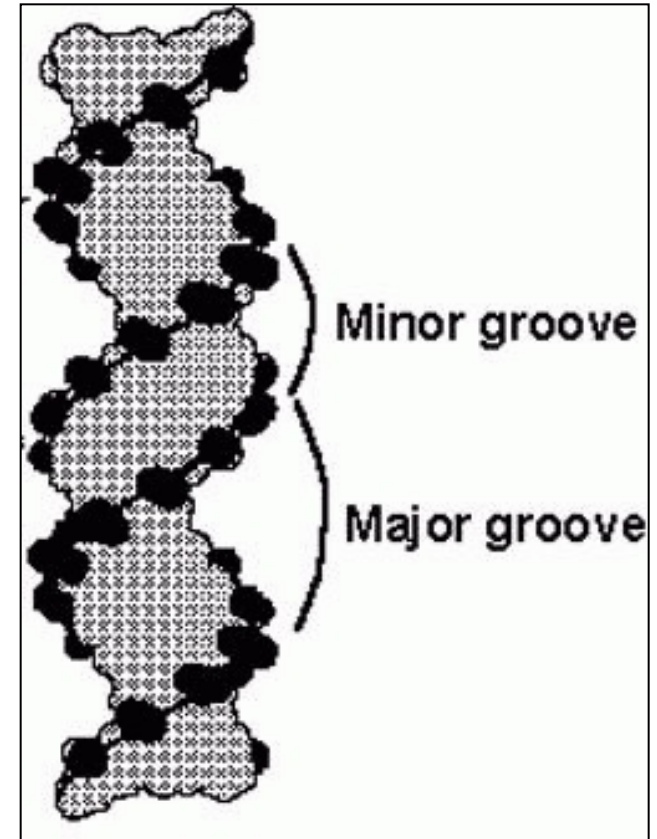
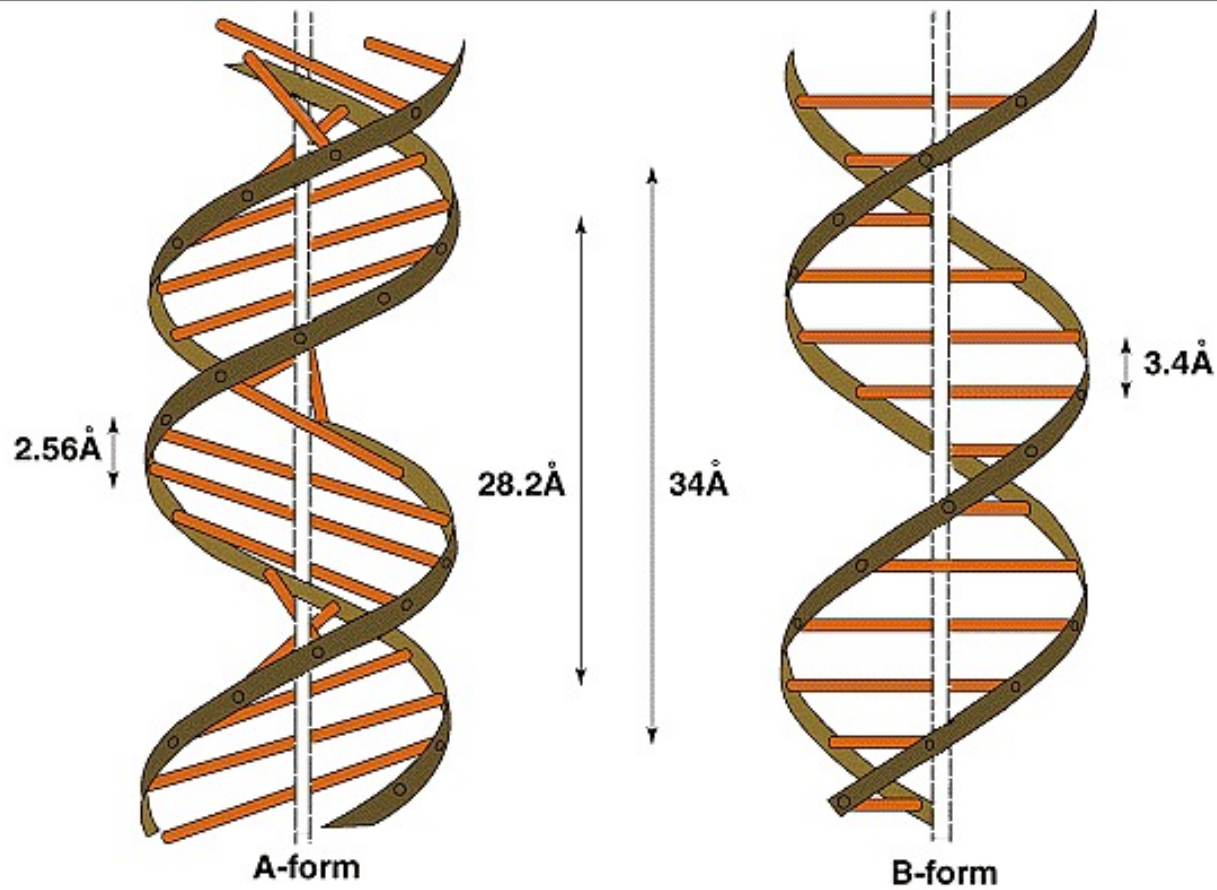
DNA Z

B-DNA

- Forma predominante = regolare elica destrorsa di Watson e Crick, con basi perpendicolari all'asse dell'elica
- Si ottiene quando il DNA è completamente idratato (*in vivo*)
- 10 basi per giro completo dell'elica
- $3,4 \text{ \AA}$ = distanza tra due basi 36° = angolo rotazione tra due basi
- La superficie esterna mostra due solchi separati dalla catena fosfato-ribosio: solco maggiore (major groove) e solco minore (minor groove). Il “pavimento” di questi solchi è costituito dai fianchi delle basi azotate interazioni sequenza specifiche DNA-Proteine.



B-DNA

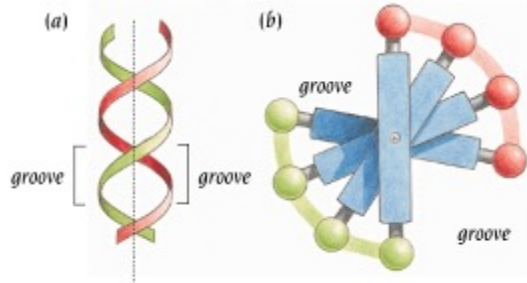


Major e Minor Groove

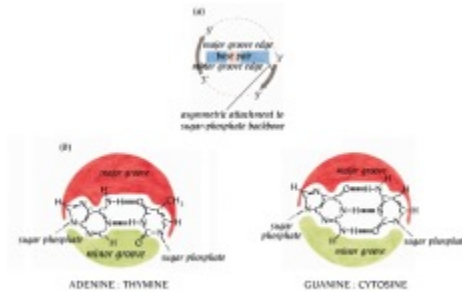
Nel B-DNA:

- asse dell'elica attraversa il centro di ciascuna base, posta perpendicolarmente ad esso.
- attacco delle basi alla catena ribosio-fosfato è asimmetrico

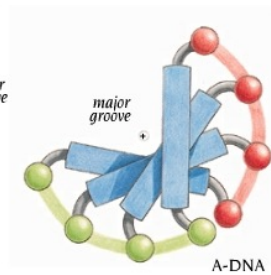
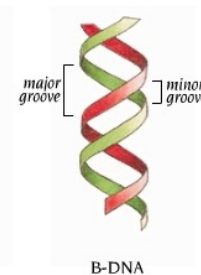
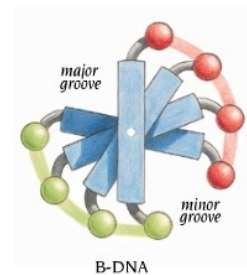
Solco maggiore e minore hanno profondità simile, ma diversa ampiezza.



© 1999 GARLAND PUBLISHING INC.
A member of the Taylor & Francis Group



© 1999 GARLAND PUBLISHING INC.
A member of the Taylor & Francis Group

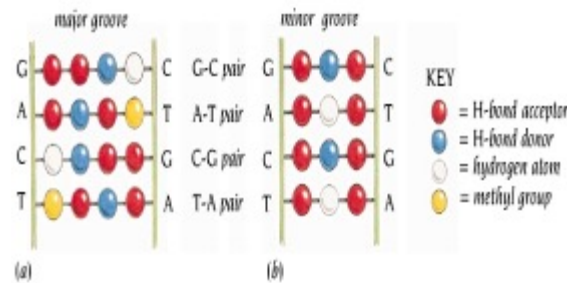
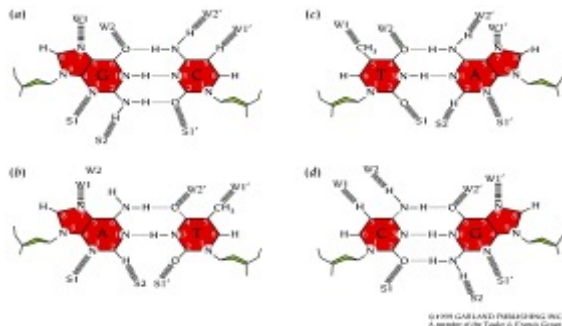


© 1999 GARLAND PUBLISHING INC.
A member of the Taylor & Francis Group

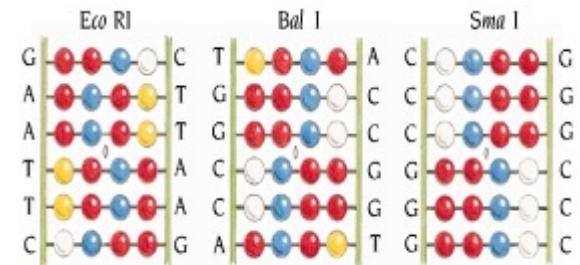
Principi di interazione DNA-Proteine

Nel B-DNA le zone di possibile interazione specifica con proteine sono i “pavimenti” dei solchi maggiori.

Gli atomi di N e O ed i gruppi metile delle basi possono interagire con le catene laterali delle proteine in modo specifico.



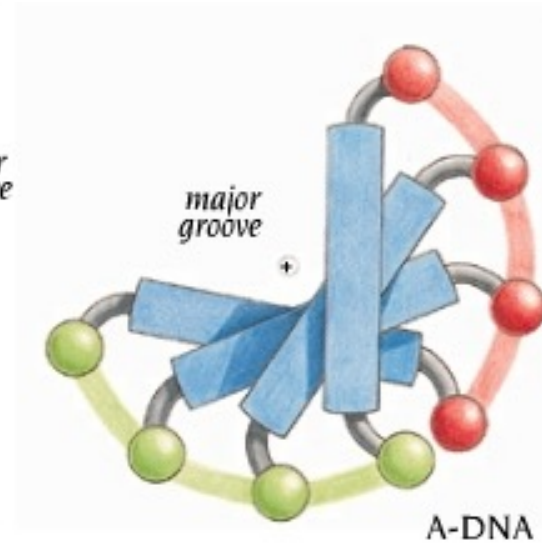
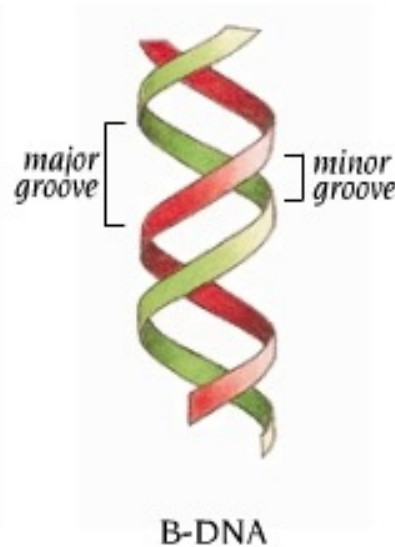
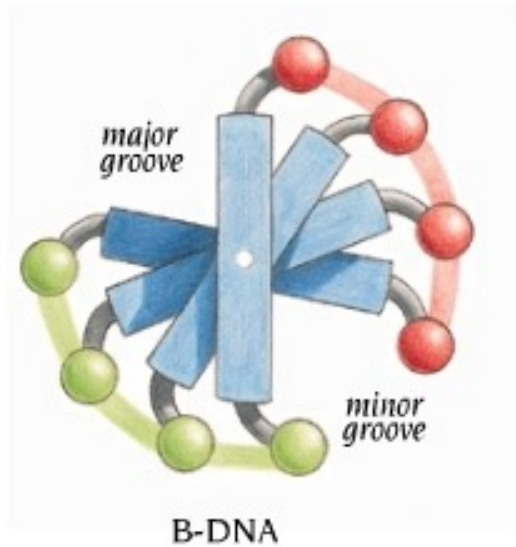
© 1990 GARLAND PUBLISHING INC.
A member of the Taylor & Francis Group



© 1990 GARLAND PUBLISHING INC.
A member of the Taylor & Francis Group

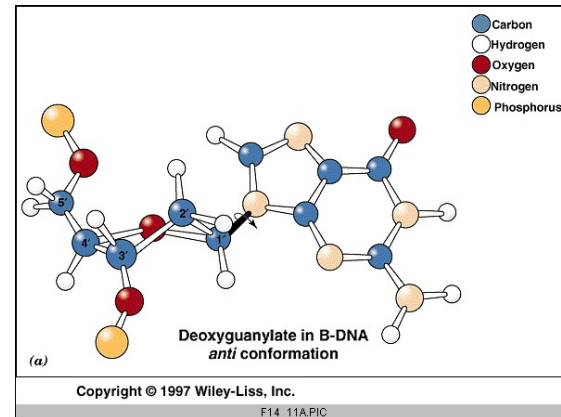
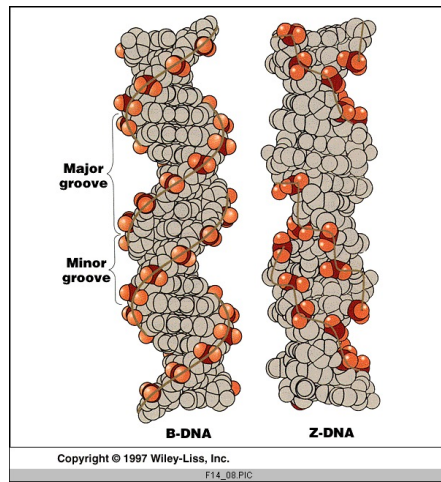
A-DNA

- Ottenuto in condizioni di disidratazione non fisiologica (sembra non esistere in vivo)
- Elica destrorsa con catene antiparallele
- 10.9 basi per giro completo dell'elica
- $33,1^\circ$ rotazione angolare tra due basi adiacenti
- $2,9 \text{ \AA}$ = distanza tra due basi adiacenti



Z-DNA

- **Struttura trovata in sequenze caratterizzate da alternanza di G e C. Probabile anche *in vivo***
- **Elica è sinistrorsa e la dorsale zucchero-fosfato segue un andamento a zig-zag.**
- **Guanidine in posizione syn.**
- **Major groove molto superficiale e minor molto stretto.**



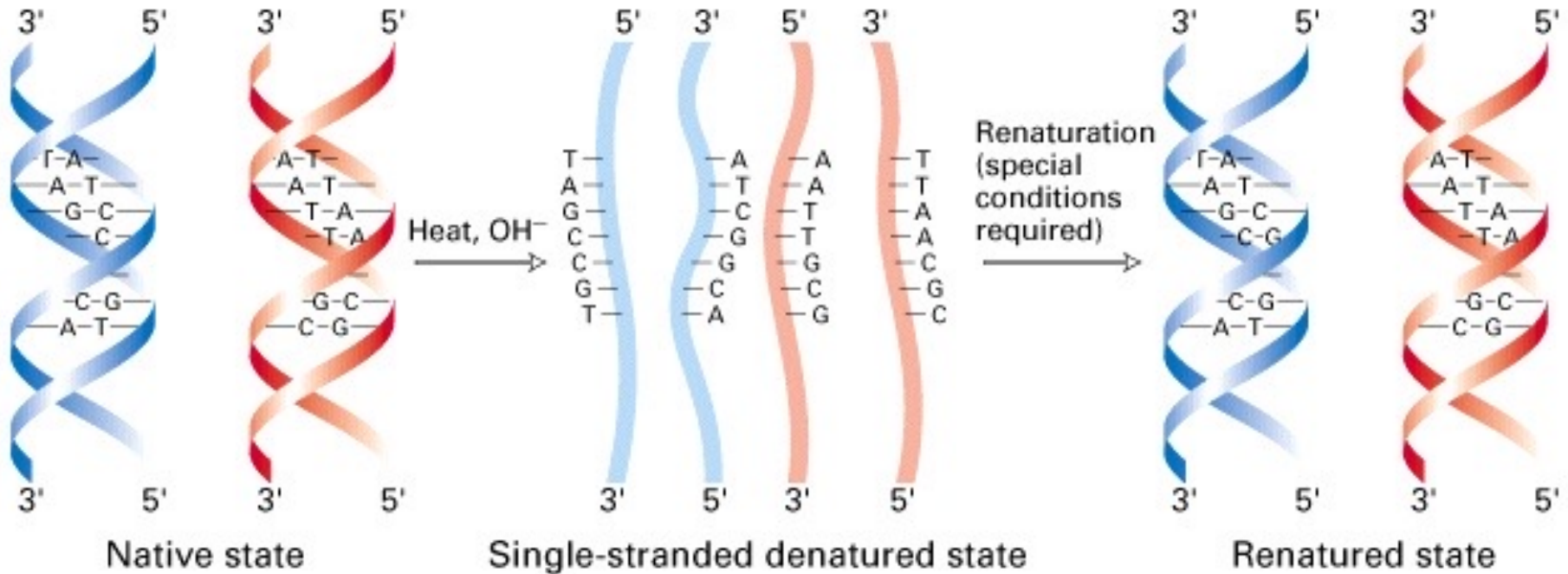
Gli acidi nucleici possono formare vari tipi di doppia elica

Elica	Coppie di basi per giro	Rotazione tra due basi	Diametro
B	10 (10,4)	36 (34,6)	20 (19)
A	11	32,7	23
Z	12	-30	18

Tabella 2.3 Proprietà dell'A-DNA, del B-DNA e dello Z-DNA.

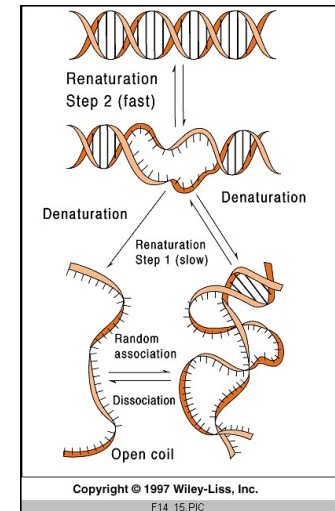
Proprietà	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
Direzione dell'elica	Destrorsa	Destrorsa	Sinistrorsa
Paia di basi per giro dell'elica	10,9	10,0	12,0
Morfologia generale	Corto e largo	Più lungo e sottile	Allungato e sottile
Solco maggiore	Estremamente stretto e molto profondo	Largo e di profondità intermedia	Appiattito sulla superficie dell'elica
Solco minore	Molto largo e poco profondo	Stretto e di profondità media	Estremamente stretto e molto profondo
Posizione dell'asse dell'elica	Solco maggiore	Attraverso le coppie di basi	Solco minore
Diametro dell'elica	2,2 nm	2,0 nm	1,8 nm

Il DNA può andare incontro ad una separazione reversibile dei due filamenti

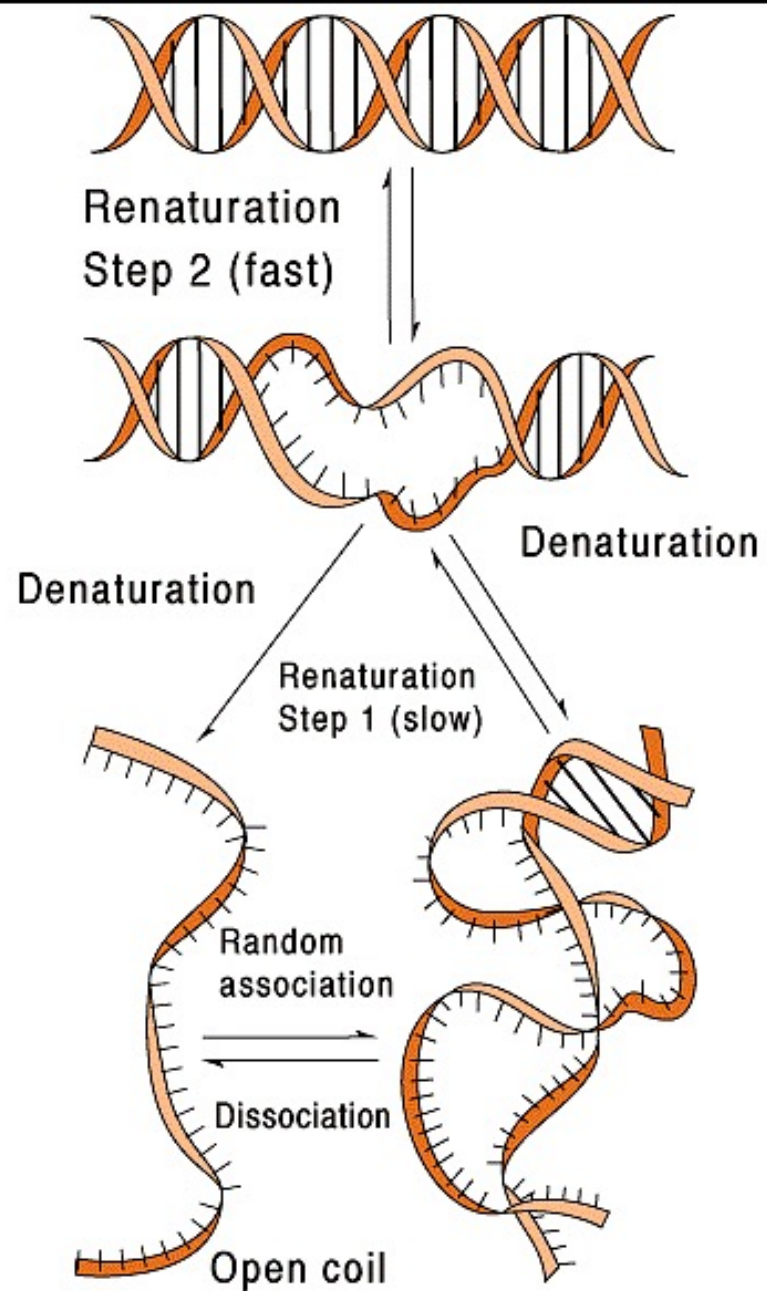


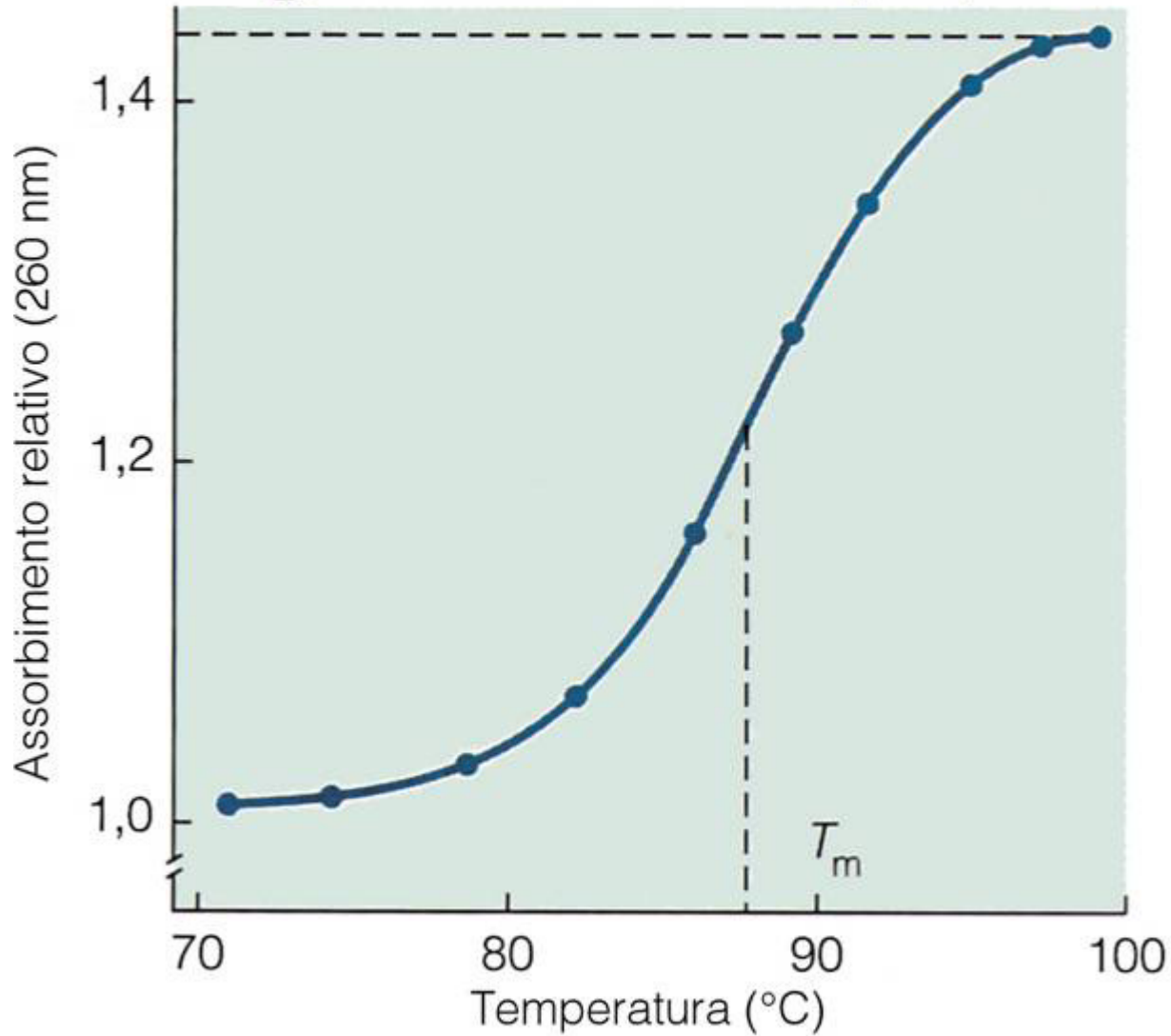
Proprietà termiche

- **Se il DNA è portato ad alte temperature i legami H diventano instabili e le due catene si separano: DENATURAZIONE TERMICA.**
- **Le sequenze ricche di A e T si denaturano più facilmente di quelle ricche in G e C**
- **La temperatura alla quale il 50% del DNA è denaturato è detta T_m (Melting Temperature) dipende dalla sequenza (solvente e ioni)**
- **Dopo raffreddamento le basi si riappaiano: rinaturazione, ibridizzazione o annealing**

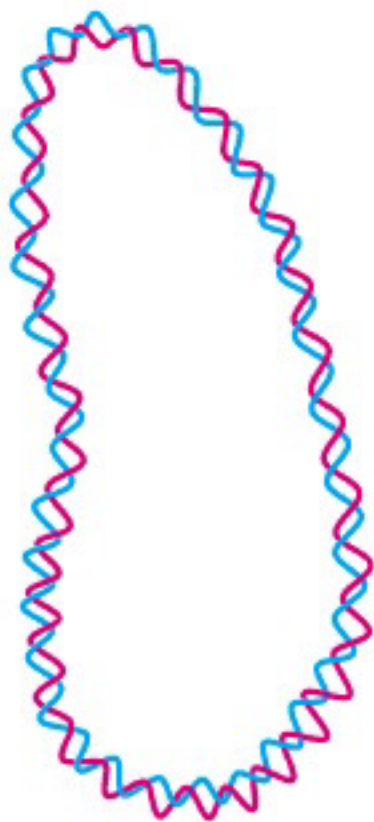


Denaturazione termica

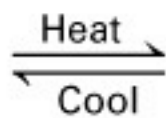




(a)

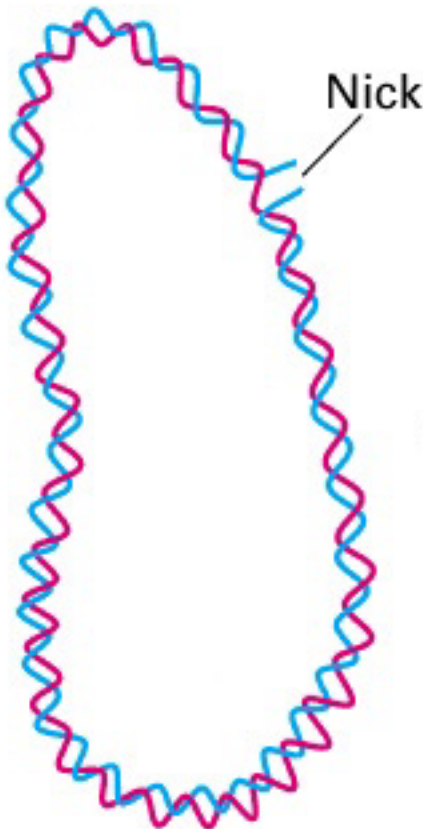


Double-stranded
native molecule

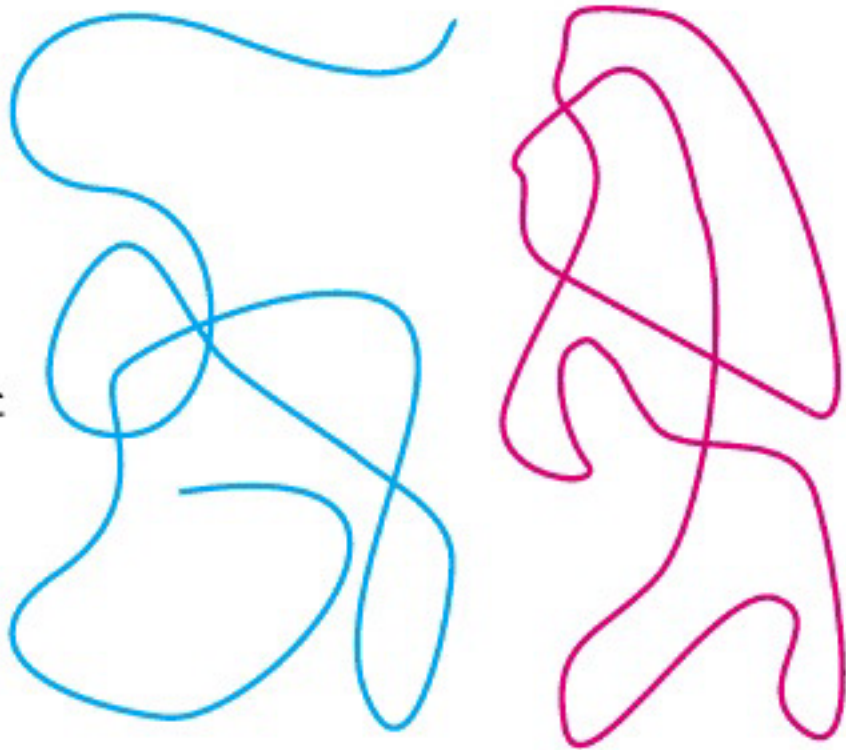


Tangled linked strands

(b)

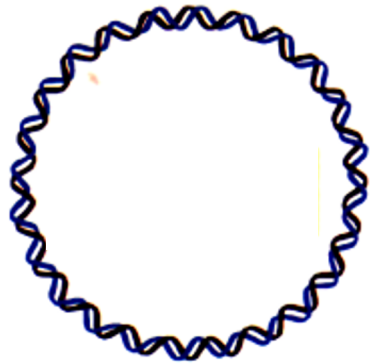


Heat
Cool

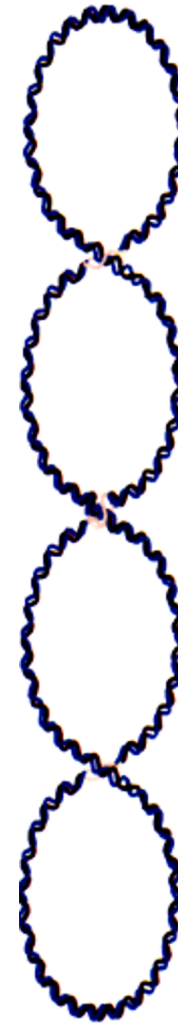
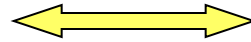


Nick in one strand

Strands completely separated



DNA circolare con
superavvolgimento = 0



DNA superavvolto
negativamente

Il DNA circolare può essere superavvolto



DNA lineare

The image is a black and white electron micrograph showing three distinct forms of DNA molecules against a grainy background. The top form is a long, thin, irregularly shaped line. The middle form is a circular loop with some internal folding. The bottom form is a highly compact, tangled structure with multiple overlapping loops.

DNA circolare
rilassato

DNA superavvolto