

**Programma di Biologia Molecolare per ammissione a la LM in SNSU**  
**Prof.ssa Carmela Gissi**

### **DNA e RNA**

Il DNA è la molecola deputata alla trasmissione dell'informazione genetica: gli esperimenti di Griffith, Avery e Hershey.

Basi azotate, nucleosidi, nucleotidi. Composizione chimica e struttura tridimensionale del DNA.

La doppia elica del DNA: forma A, B, Z. La flessibilità della doppia elica di DNA: DNA curvo e strutture cruciformi.

La topologia del DNA: topoisomeri e loro separazione tramite elettroforesi su gel di agarosio.

Cambiamenti della topologia del DNA: cenni su topoisomeri di tipo I e di tipo II.

Denaturazione del DNA.

RNA: composizione chimica, strutture secondarie e struttura tridimensionale.

### **Impacchettamento e replicazione del DNA**

Impacchettamento del DNA in eubatteri e eucarioti. I cromosomi eucariotici: struttura di centromeri e telomeri. La struttura della cromatina in interfase: le fibre da 10 nm e da 30 nm. Composizione e struttura dei nucleosomi. Le proteine istoniche e le loro caratteristiche. Posizionamento dei nucleosomi. Replicazione del DNA e assemblaggio dei nucleosomi.

Replicazione del DNA: esperimento di Meselson e Stahl. I diversi tipi di DNA polimerasi procariotiche e eucariotiche e le loro caratteristiche (processività, fedeltà, attività proofreading). Dettagli sulla DNA polimerasi III dei procarioti. Il replisoma e i suoi componenti: DNA primasi, SSB, DNA elicasi, DNA ligasi, "pinze scorrevoli" e caricatore delle "pinze scorrevoli". Il modello del replicone. Inizio e terminazione della replicazione in *E. coli*. Replicazione delle estremità dei cromosomi eucariotici: le telomerasi.

### **Il codice genetico**

Il codice genetico: degenerazione e universalità. Effetti della struttura del codice genetico per la mutabilità del DNA e l'efficienza della traduzione. Interazione codone-anticodone e vacillamento

### **Trascrizione**

La trascrizione nei procarioti: struttura e cambiamenti conformazionali della RNA polimerasi. Ruolo dei fattori sigma, struttura dei promotori e presenza di elementi consensus conservati. Dettagli della fase di inizio e di allungamento della trascrizione procariotica. Terminazione intrinseca e Rho-dipendente.

La trascrizione negli eucarioti: peculiarità delle tre RNA polimerasi eucariotiche. La RNA polimerasi I e le caratteristiche dei relativi promotori; la RNA polimerasi III e le caratteristiche delle varie categorie di promotori riconosciuti dalla RNA Pol III. Maturazione degli rRNA e dei tRNA per tagli eso/endonucleolitici e per modificazioni dei nucleotidi. Struttura del promotore della RNA polimerasi II e apparato trascrizionale basale. Fasi di inizio e di allungamento della trascrizione della RNA Pol II. Maturazione degli mRNA: capping, taglio e poliadenilazione al 3'. La struttura interrotta dei geni proteici eucariotici e il processo di splicing. Composizione e azione dello spliceosoma. Splicing alternativo e regolazione dello splicing.

## **Regolazione dell'espressione genica**

Regolazione dell'espressione genica nei procarioti: controllo positivo e negativo; sistemi inducibili e reprimibili. Controllo positivo e negativo dell'operone lac: azione del repressore e dell'attivatore CAP. Integrazione dei due sistemi di controllo. Operone del triptofano: controllo negativo reprimibile all'inizio della trascrizione e controllo per attenuazione della terminazione della trascrizione.

Regolazione dell'espressione genica negli eucarioti: attivatori e repressori trascrizionali, struttura modulare dei promotori della RNA polimerasi II. Enhancer e silencer. Struttura modulare e domini dei fattori di trascrizione. I domini di legame al DNA: Helix-Turn-Helix, Zn finger, leucine zipper e Helix-Loop-Helix.

## **Traduzione**

La traduzione nei procarioti e negli eucarioti. Caratteristiche strutturali di tRNA e mRNA. Struttura e composizione dei ribosomi procariotici ed eucariotici. Inizio, allungamento e terminazione della traduzione in procarioti ed eucarioti. I fattori proteici di inizio, allungamento e terminazione della traduzione. Meccanismo cap-indipendente di inizio della traduzione negli eucarioti. Bilancio energetico della traduzione. Stabilità e degradazione di mRNA.

## **Cenni sulla tecnologia del DNA ricombinante**

Il clonaggio di un frammento di DNA. Gli enzimi di restrizione: creazione di estremità piatte, appiccicose e compatibili. La reazione di ligazione e le strategie di ottimizzazione. Vettori di clonaggio di tipo plasmidico e cenni su altre categorie di vettori. Trasformazione delle cellule batteriche.

L'elettroforesi su gel per la separazione di frammenti di DNA

La reazione a catena della DNA polimerasi (PCR). Caratteristiche dei primer per la PCR e costruzione di primer eterologhi.

Sequenziamento del DNA con il metodo di Sanger. Strategia di sequenziamento per primer walking.

Ottimizzazione del metodo di Sanger per il sequenziamento automatico (tipo di marcatura, DNA polimerasi usate ed elettroforesi ad alta risoluzione).

## **Testo consigliato e capitoli**

- *“Biologia Molecolare”* F. Amaldi, P. Benedetti, G. Pesole, P. Plevani - Casa Editrice Ambrosiana, **Terza edizione**, 2018
- In alternativa, stessi argomenti da *“Biologia Molecolare”* F. Amaldi, P. Benedetti, G. Pesole, P. Plevani - Casa Editrice Ambrosiana, **Seconda edizione**, 2014: Capitoli 2, 3, 4, 6 (escluso paragrafo 6.7), 9, 10 (escluso paragrafo 10.4), 11, 12. Capitolo 13 e 14.1. Capitolo 15 e 16. Paragrafi 21.4, 21.6, e 21.7. Finestra 21.3 (cioè; Tecniche di Biologia molecolare: Tecnologie di base per l'isolamento e la manipolazione di geni, PCR, sequenziamento del DNA con il metodo di Sanger
- Per le tecniche del DNA ricombinante: **“Dai Geni ai Genomi”** J. W. Dale, M. von Schantz, N. Plant (terza edizione) - Edises