



DNA e replicazione del DNA

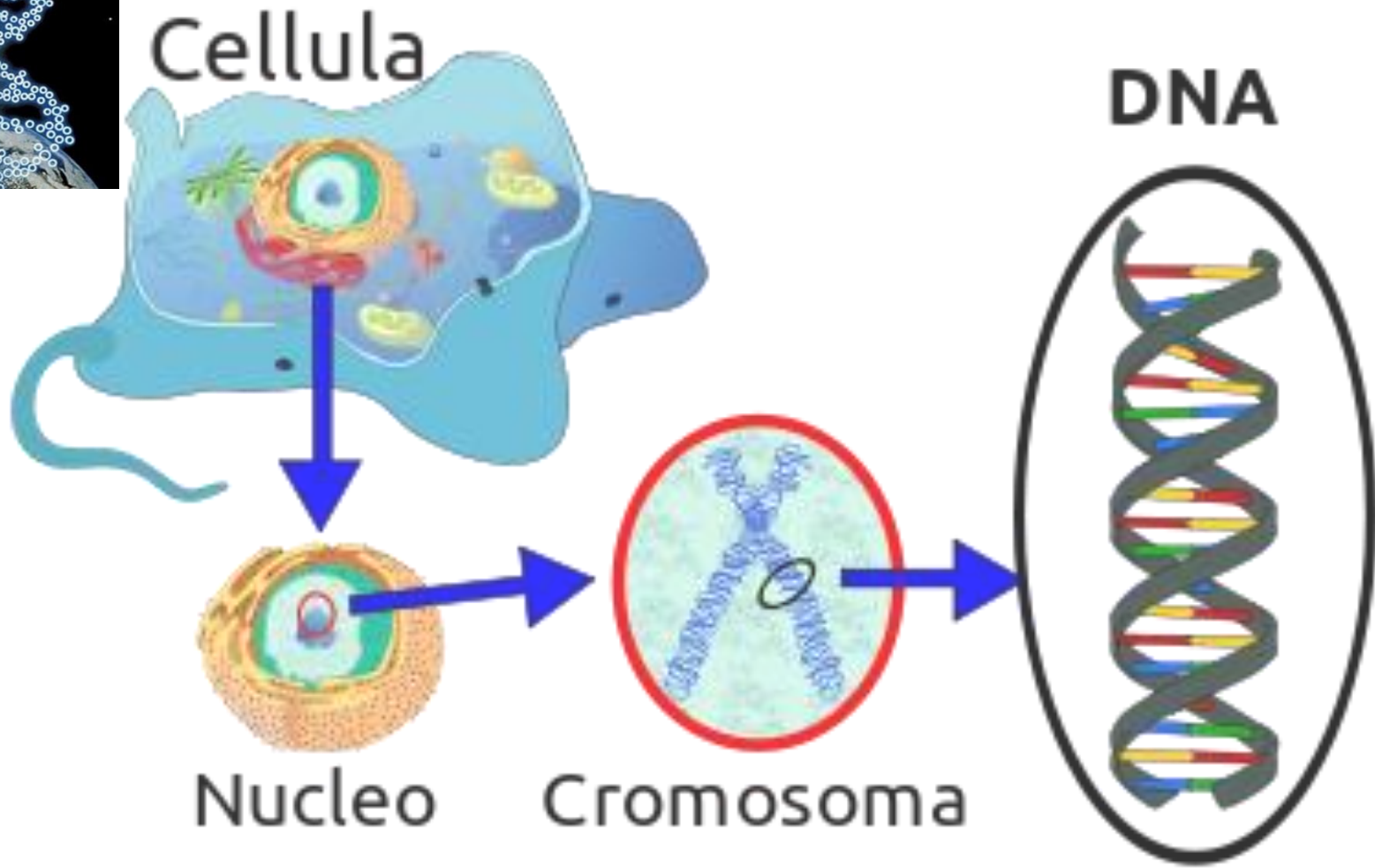
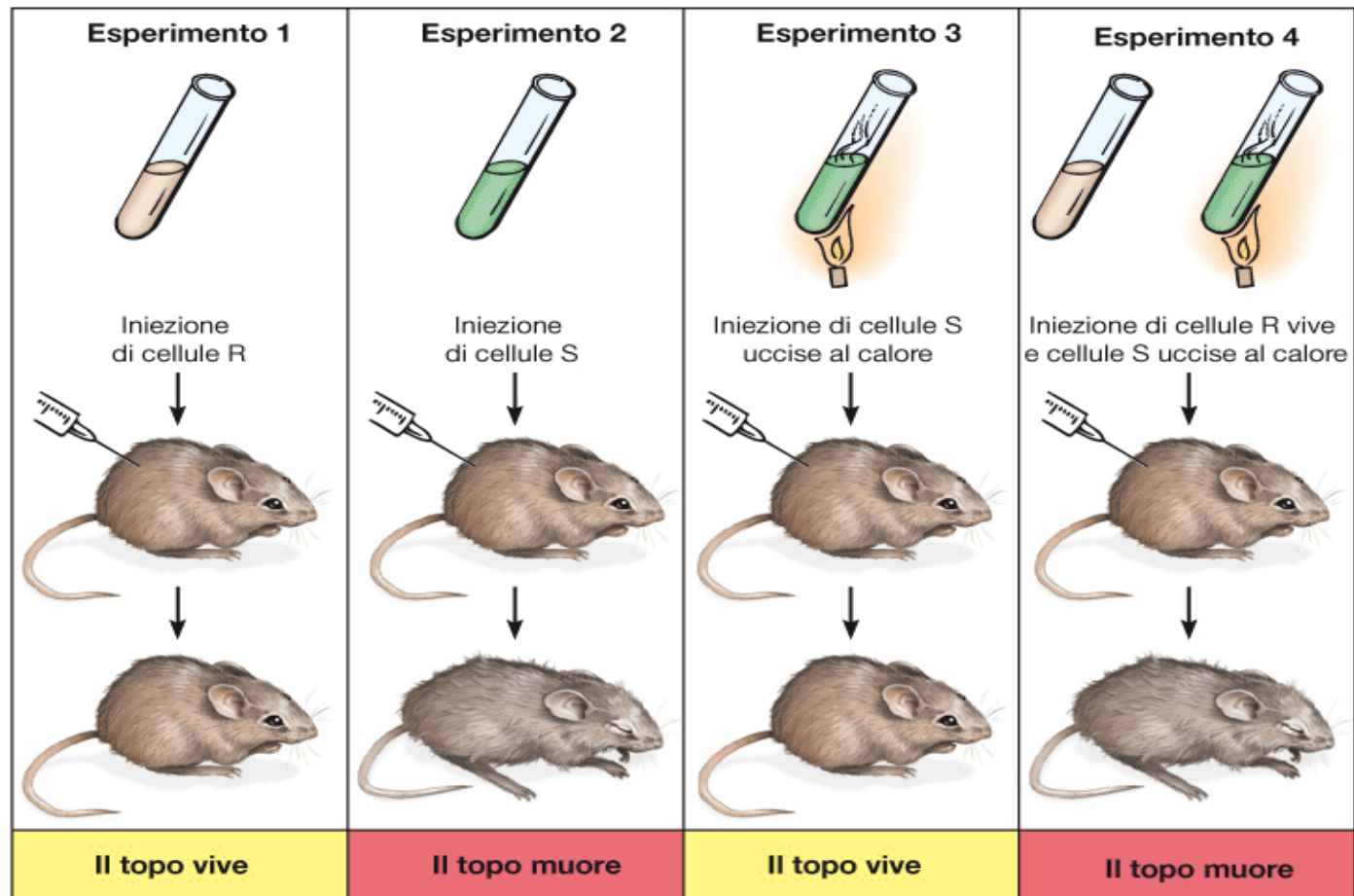


TABELLA 12-1

Cronologia di scoperte storiche relative al DNA

Data	Scoperta
1871	Friedrich Miescher riporta la scoperta di una nuova sostanza, la nucleina, presente nei nuclei delle cellule. Oggi sappiamo che la nucleina è una miscela di DNA, RNA e proteine.
1928	Frederick Griffith scopre una sostanza presente nei batteri uccisi al calore che “trasforma” i batteri vivi.
1944	Oswald Avery, Colin MacLeod e Maclyn McCarty identificano chimicamente il principio trasformante di Griffith nel DNA.
1949	Erwin Chargaff riporta le relazioni tra le basi del DNA che forniscono un indizio sulla struttura del DNA.
1952	Alfred Hershey e Martha Chase dimostrano che il DNA, e non le proteine, è coinvolto nella riproduzione virale.
1952	Rosalind Franklin produce un'immagine di diffrazione ai raggi X del DNA.
1953	James Watson e Francis Crick propongono un modello di struttura del DNA. Il loro contributo è considerato l'inizio di una rivoluzione nella biologia molecolare che continua tuttora.
1958	Matthew Meselson e Franklin Stahl dimostrano che la replicazione del DNA è semiconservativa.
1962	James Watson, Francis Crick e Maurice Wilkins sono insigniti del premio Nobel per la Medicina grazie alle scoperte sulla struttura molecolare degli acidi nucleici*.
1969	Alfred Hershey è insignito del premio Nobel per la Medicina grazie alla scoperta del meccanismo di replicazione e della struttura genetica dei virus.

1928:
EXP di
Griffith
Scoperto il
fattore
trasformante



RISULTATI E CONCLUSIONI: Anche se né il ceppo R né il ceppo S ucciso al calore erano in grado da soli di uccidere un topo, la combinazione di entrambi ci riusciva. L'autopsia dell'animale morto mostrò la presenza di pneumococchi vivi del ceppo S. Questi risultati suggerivano che una qualche sostanza presente nelle cellule S uccise al calore era in grado di trasformare le cellule R vive in virulente.

FIGURA 12-1 Gli esperimenti di trasformazione di Griffith

Griffith stava cercando di sviluppare un vaccino contro la polmonite, quando scoprì per caso il fenomeno della trasformazione.

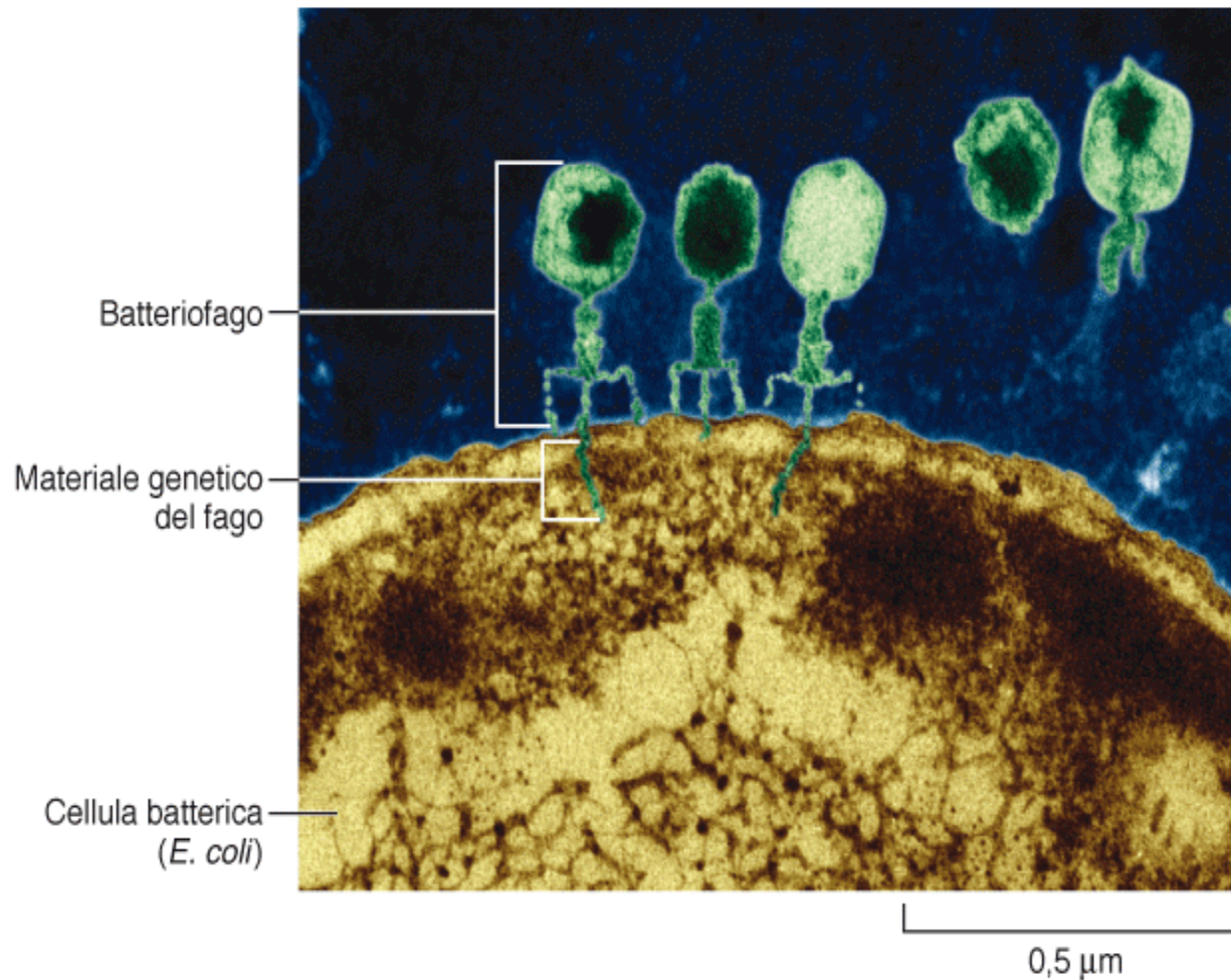
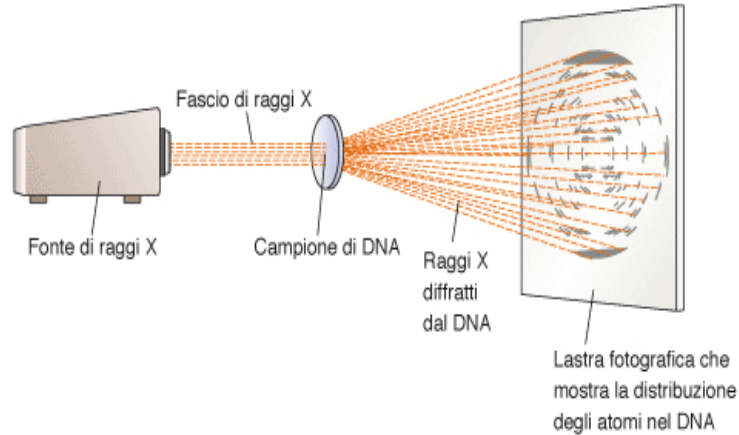


FIGURA 12-2 Batteriofagi sulla superficie di una cellula batterica

Questa immagine al microscopio elettronico a trasmissione (MET) mostra diversi fagi attaccati alla superficie del batterio *Escherichia coli*. Si noti il materiale genetico del virus che viene iniettato nel batterio.

Struttura elicoidale del DNA



2 L'immagine di diffrazione dei raggi X del DNA. L'andamento diagonale delle macchie nere che si allungano dalle 11 alle 5 e dall'1 alle 7, se paragonate alle lancette dell'orologio, suggerisce la struttura elicoidale del DNA. I riflessi allungati orizzontali al margine superiore ed inferiore della fotografia indicano che le basi puriniche e pirimidiniche si impilano l'una sull'altra ogni 0,34 nm e sono disposte perpendicolarmente rispetto all'asse dell'elica.

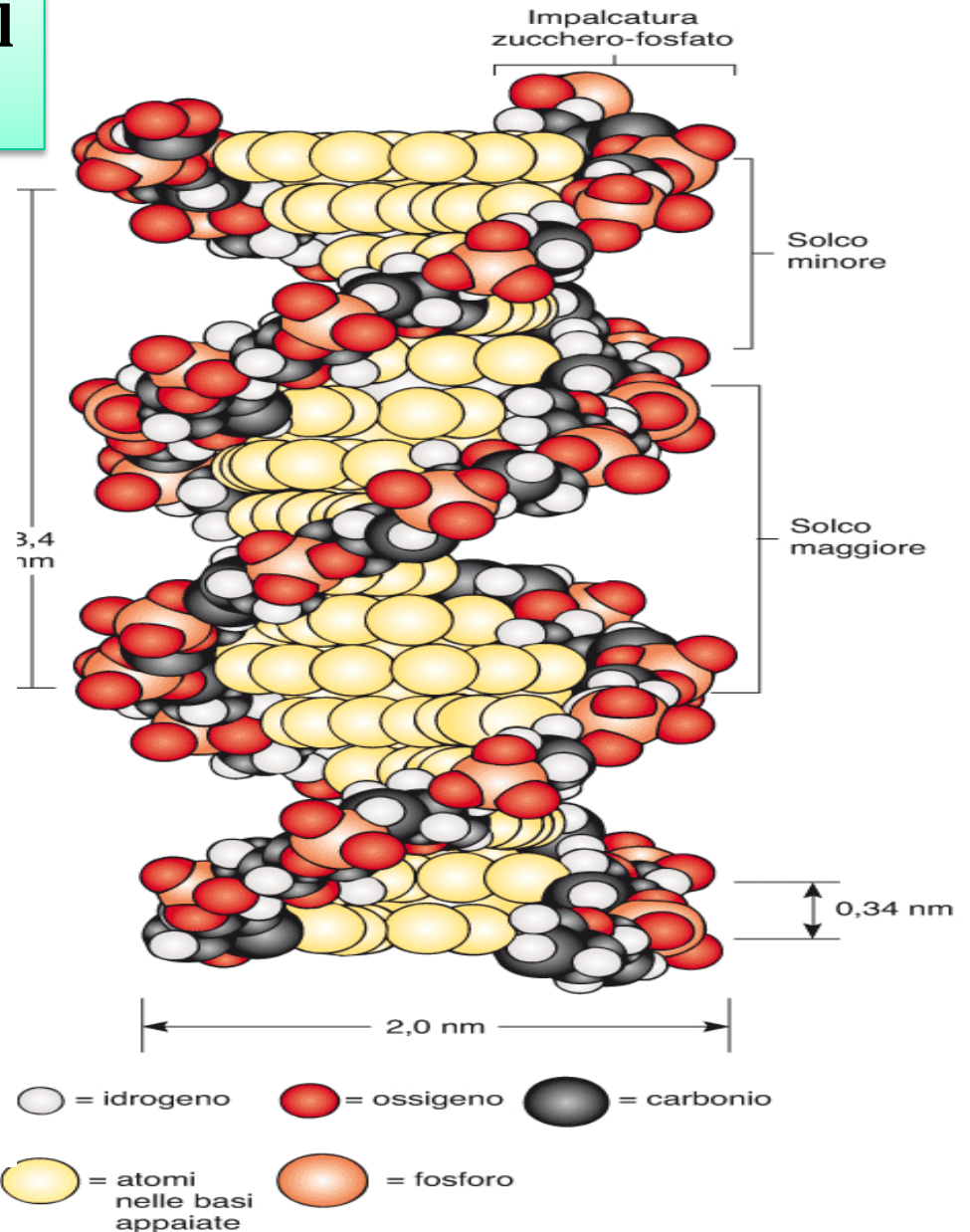
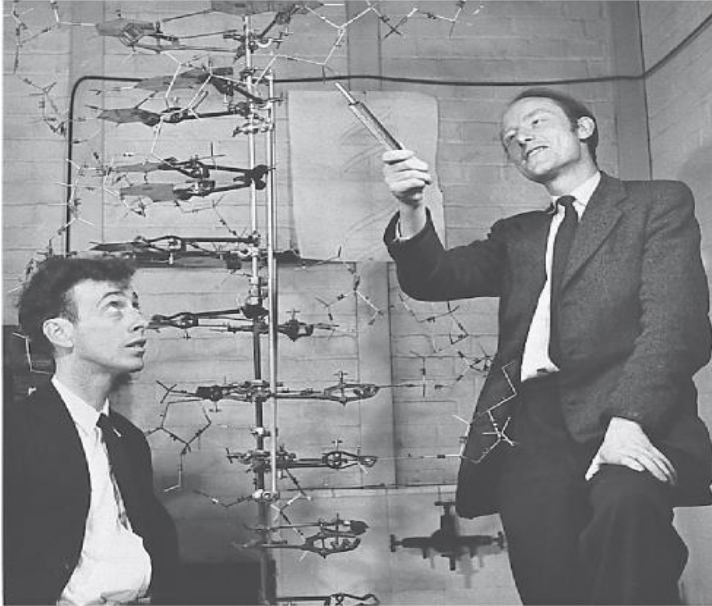


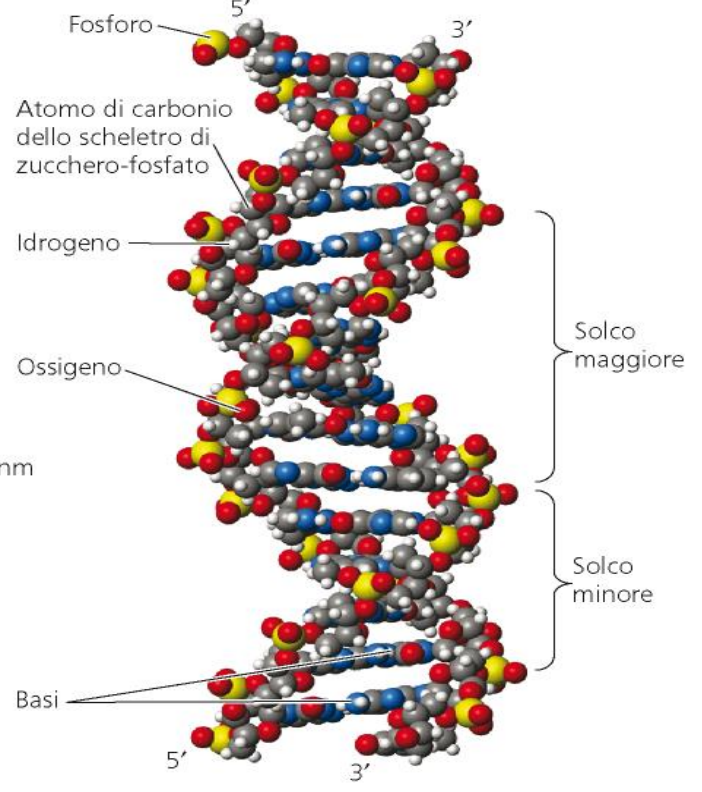
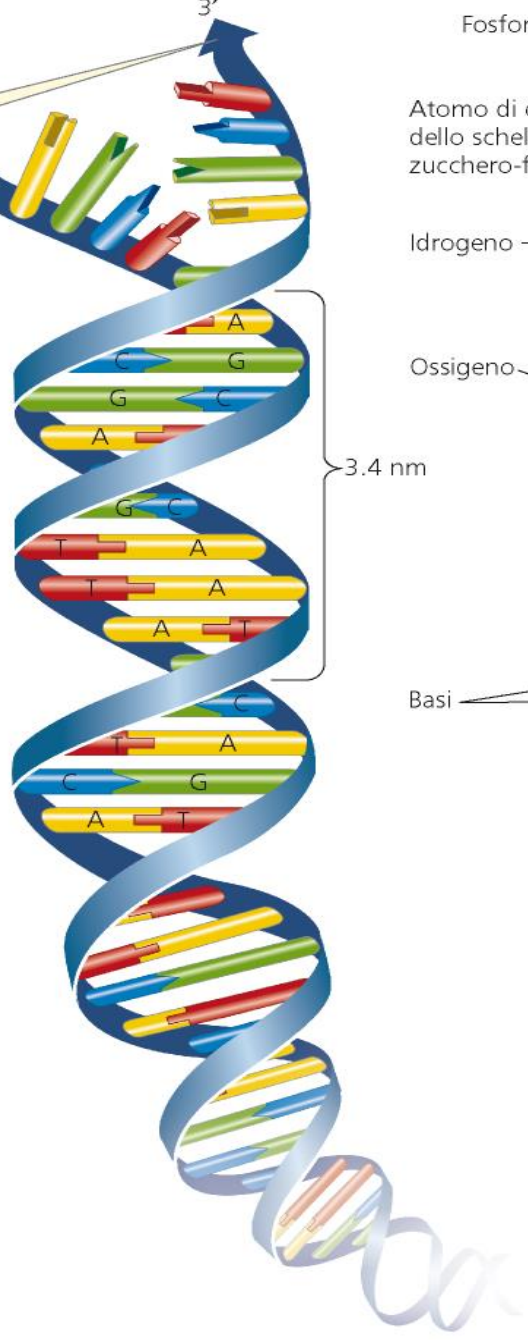
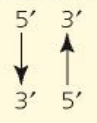
FIGURA 12-8 Modello tridimensionale della doppia elica del DNA. Le misure corrispondono a quelle derivate dalle immagini di diffrazione dei raggi X.

A



B

In questa rappresentazione del DNA, le strisce blu corrispondono ai due scheletri di zucchero-fosfato, orientati in direzioni opposte:



Struttura del DNA

Subunità nucleotidiche

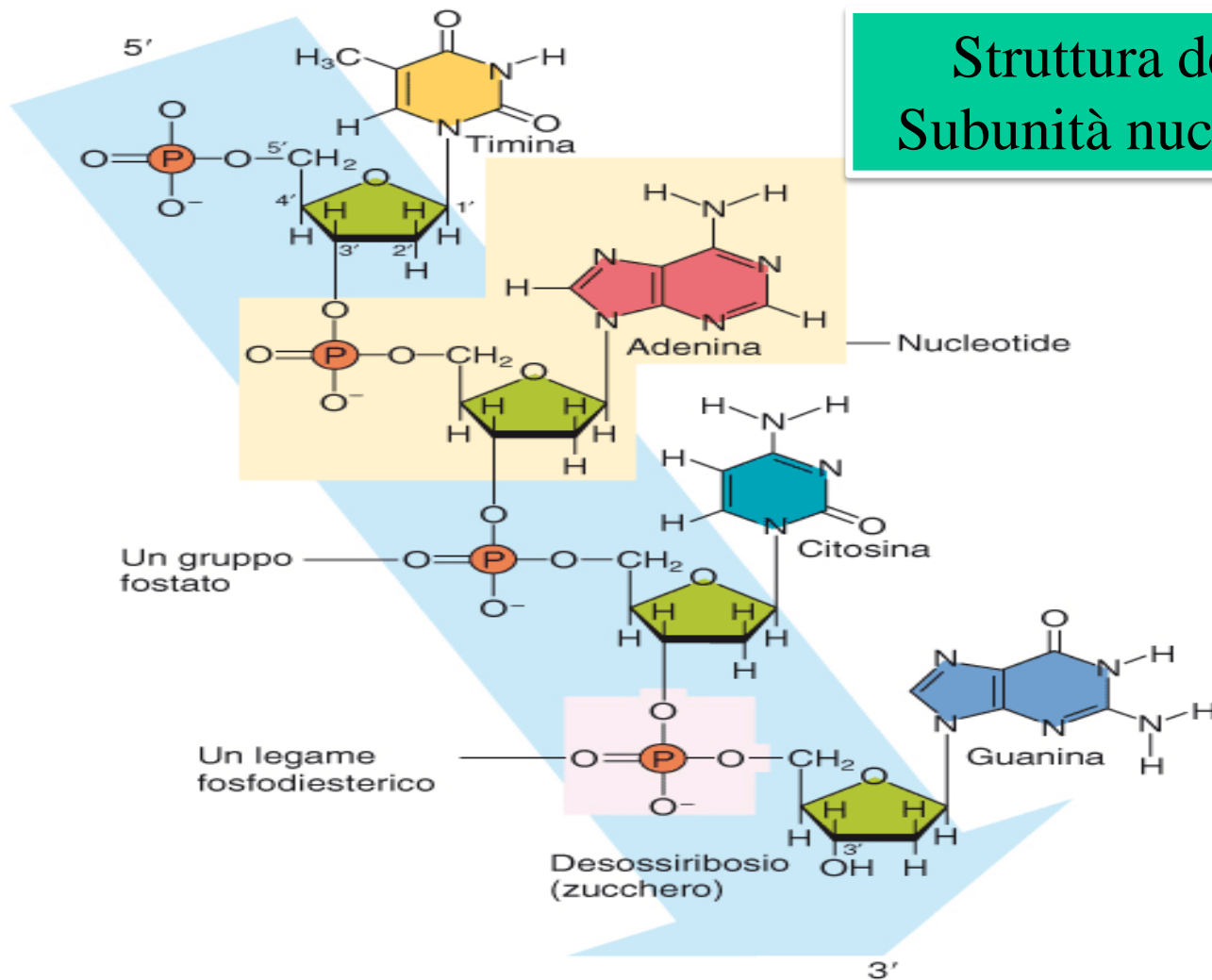
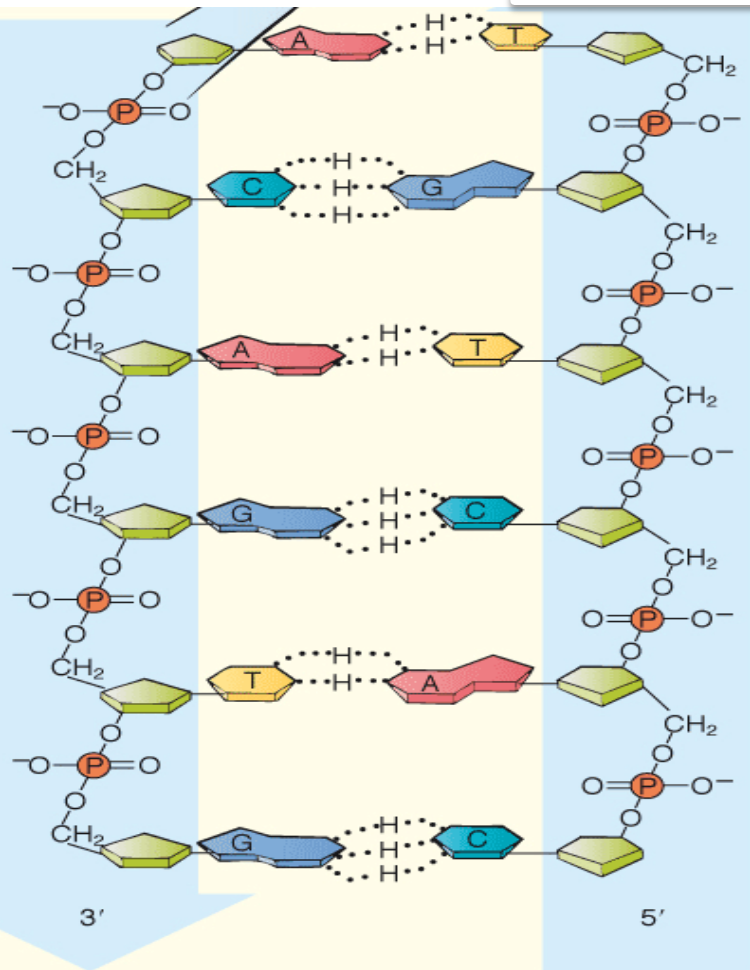


FIGURA 12-4 Le subunità nucleotidiche del DNA

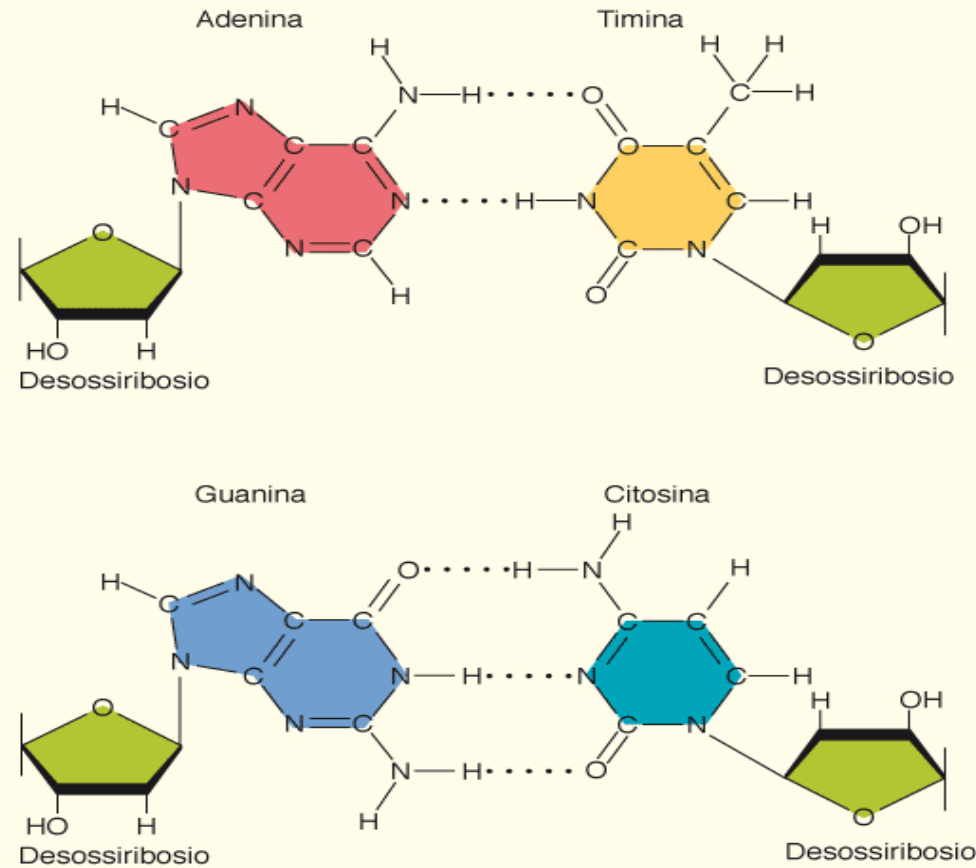
Un singolo filamento di DNA consiste di uno scheletro (*sovrainpresso sullo sfondo blu*) di gruppi fosfato che si alternano allo zucchero desossiribosio (*in verde*). Gli zuccheri di nucleotidi adiacenti sono uniti con legami fosfodiesterici (*in rosa*). Al carbonio 1' di ogni zucchero è legata una delle quattro basi azotate (*dall'alto verso il basso*): timina, adenina, citosina e guanina. (*Il nucleotide che contiene la base adenina è evidenziato in giallo*). Si noti la polarità della catena polinucleotidica, con l'estremità 5' in alto e l'estremità 3' in basso.

Struttura del DNA

Subunità nucleotidiche



(a) Le due catene zucchero-fosfato corrono in direzione opposta. Questo orientamento permette l'appaiamento complementare delle basi.



(b) Rappresentazione dei legami a idrogeno fra le coppie di basi adenina (A) e timina (T) (*in alto*) e tra guanina (G) e citosina (C) (*in basso*). La coppia A-T è unita da due legami a idrogeno; la coppia G-C da tre.

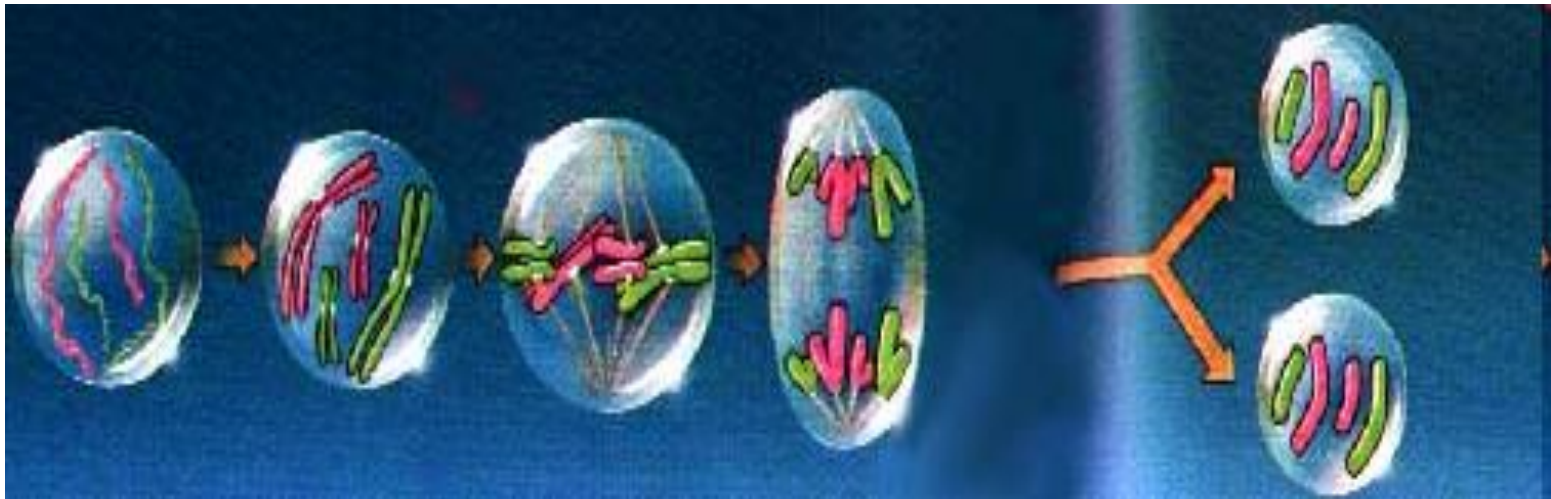
FIGURA 12-9 Appaiamento delle basi e legami a idrogeno

I due filamenti di una doppia elica di DNA sono tenuti insieme da legami a idrogeno tra le basi.

La replicazione del DNA

L'informazione genetica è conservata nel DNA

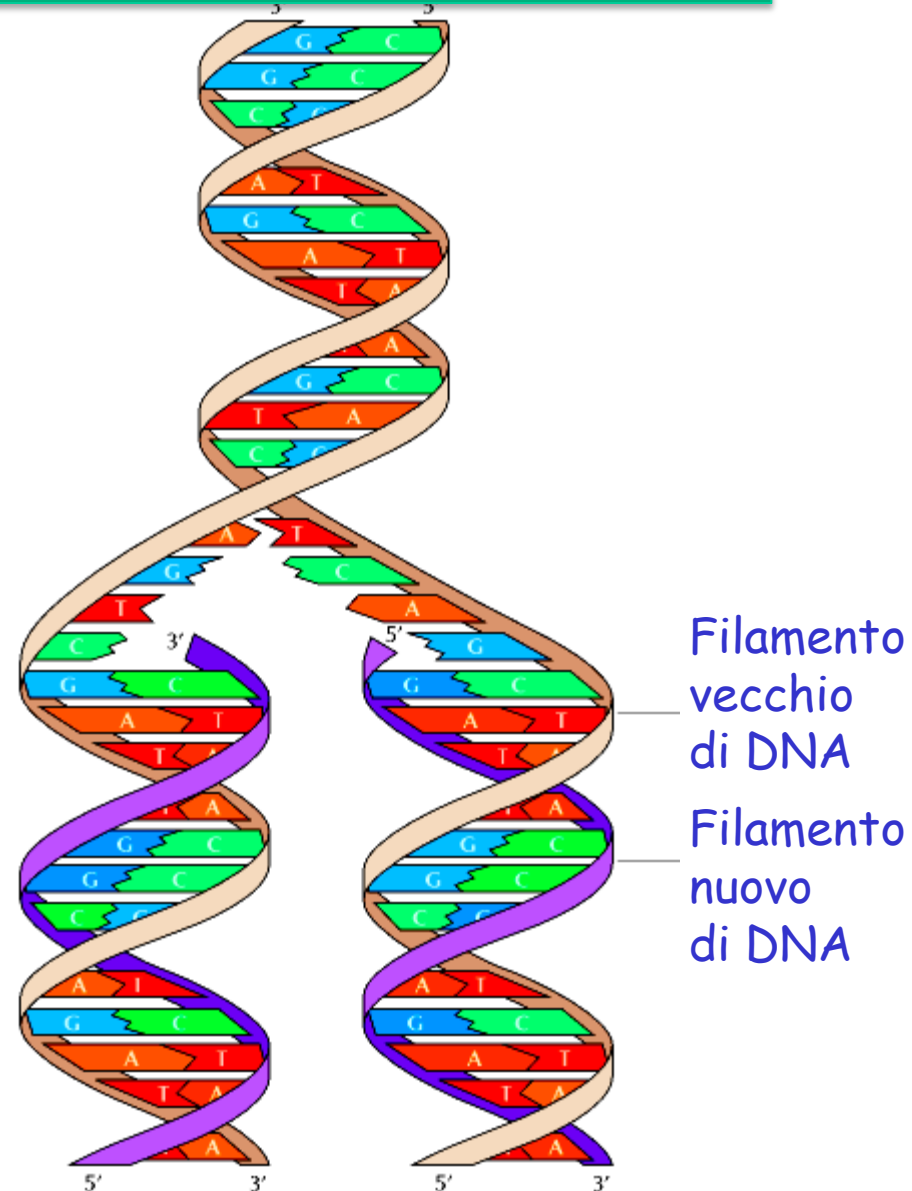
La replicazione del DNA, fa sì che le 2 cellule figlie (generate dalla Mitosi) ricevono il medesimo materiale genetico e che siano quindi geneticamente identiche



La replicazione del DNA è semiconservativa

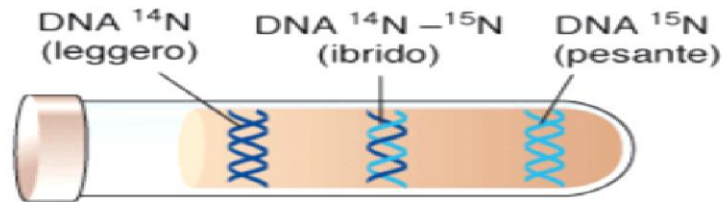
I due filamenti di DNA parentale si **separano** e ciascuno serve da **stampo** per la sintesi di un nuovo filamento **complementare** la cui sequenza è dettata dalla specificità dell'**accoppiamento delle basi**

Il processo si chiama **replicazione semiconservativa** perché un filamento di DNA parentale viene conservato in ogni molecola figlia di DNA



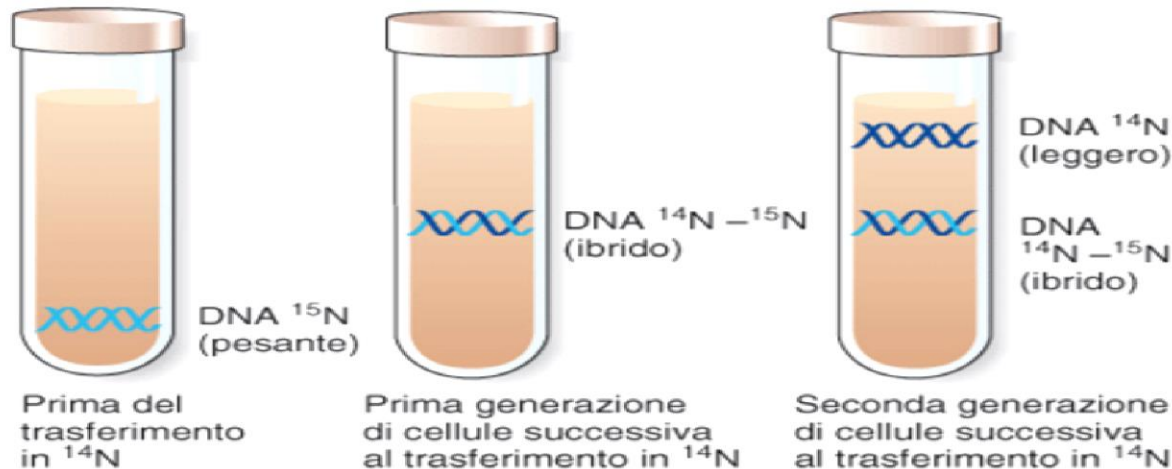
La replicazione del DNA è semiconservativa

ESPERIMENTO DI MESELSON –STAHl



Nel gradiente di densità in centrifugazione, la concentrazione di CsCl è massima nella parte inferiore del tubo e minima in alto. Le molecole di DNA si posizionano dove la loro densità è uguale a quella della soluzione in CsCl nella quale sono state centrifugate.

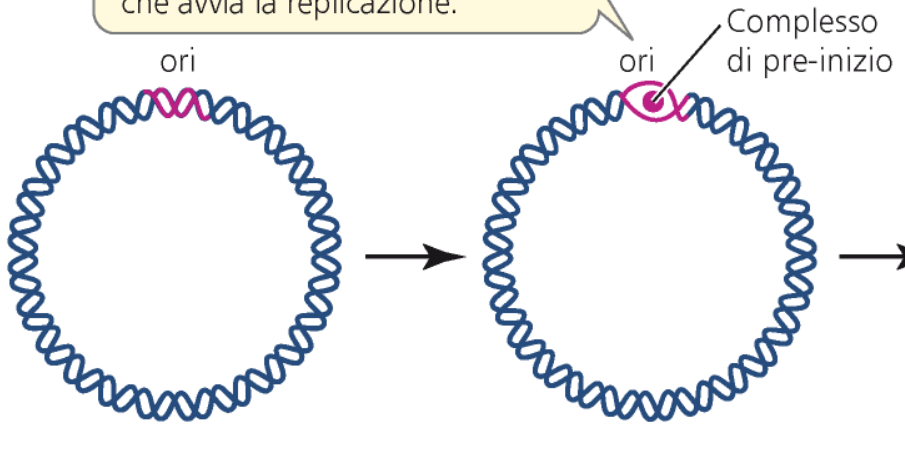
RISULTATI E CONCLUSIONI: Sulla base delle densità delle molecole di DNA osservate in ciascuna generazione, Meselson e Stahl conclusero che il modello di replicazione semiconservativa rispecchiava accuratamente il meccanismo di replicazione del DNA.



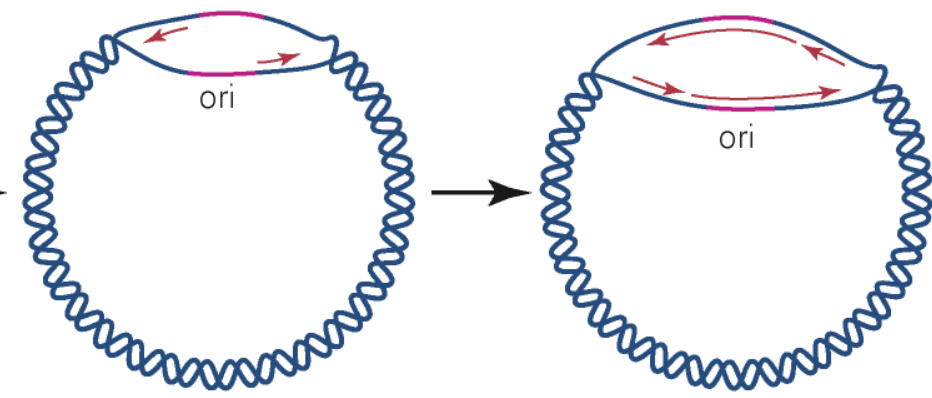
La posizione delle molecole di DNA all'interno della provetta da centrifuga può essere determinata mediante un sistema ottico a raggi UV. Infatti, le soluzioni di DNA assorbono fortemente la lunghezza d'onda di 260 nm.

A Cromosomi procariotici

1 La sequenza *ori* lega il complesso che avvia la replicazione.



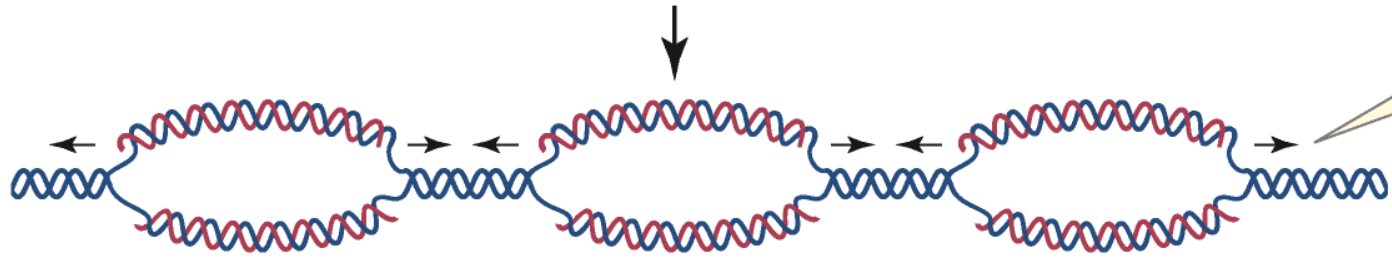
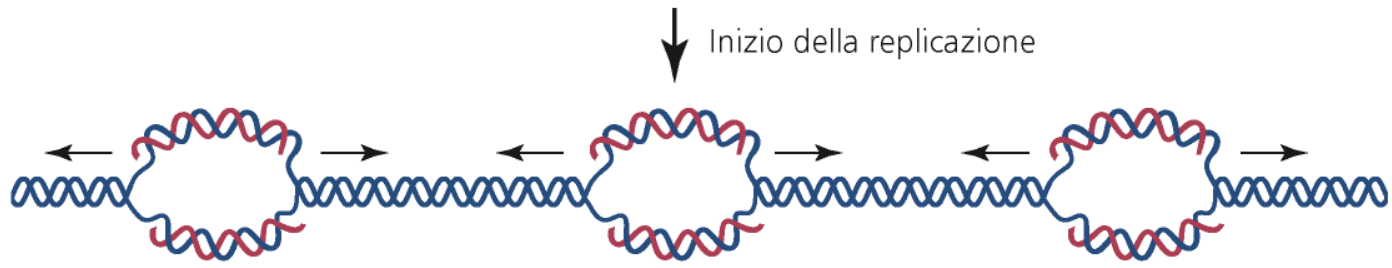
2 Due forcelle di replicazione avanzano in direzioni opposte, allontanandosi l'una dall'altra.



B Cromosomi eucariotici

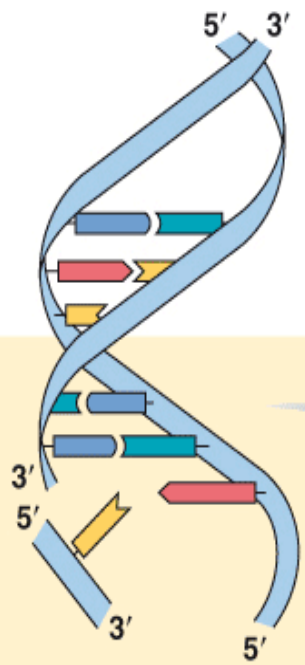


Contengono origini di replicazione multiple.



Le forcelle si muovono in direzioni opposte

La replicazione del DNA



Nucleotide legato alla catena in crescita dalla DNA polimerasi

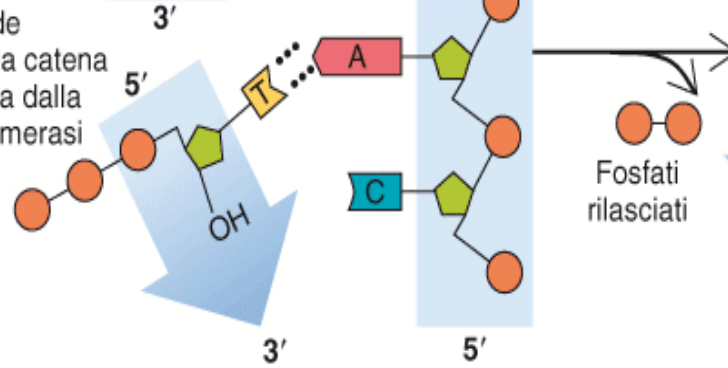


FIGURA 12-13 Una visione semplificata della replicazione del DNA

Un nucleotide alla volta viene aggiunto all'estremità 3' della catena nascente.

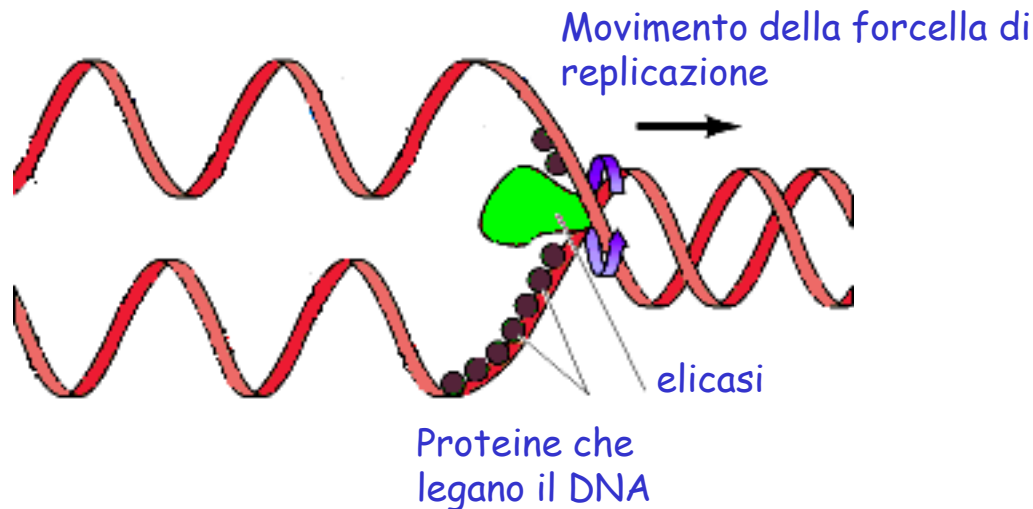
1. Svolgimento del DNA: le elicasi

Il processo replicativo del DNA prevede che i filamenti della doppia elica vengano slegati e distanziati.

Questo implica che la doppia elica debba subire uno srotolamento.

Lo srotolamento dipende dall'enzima **elicasi** che utilizza una molecola di ATP per ogni giro di elica svolto

Le **elicasi** catalizzano lo svolgimento del DNA parentale davanti alla forcella di replicazione.

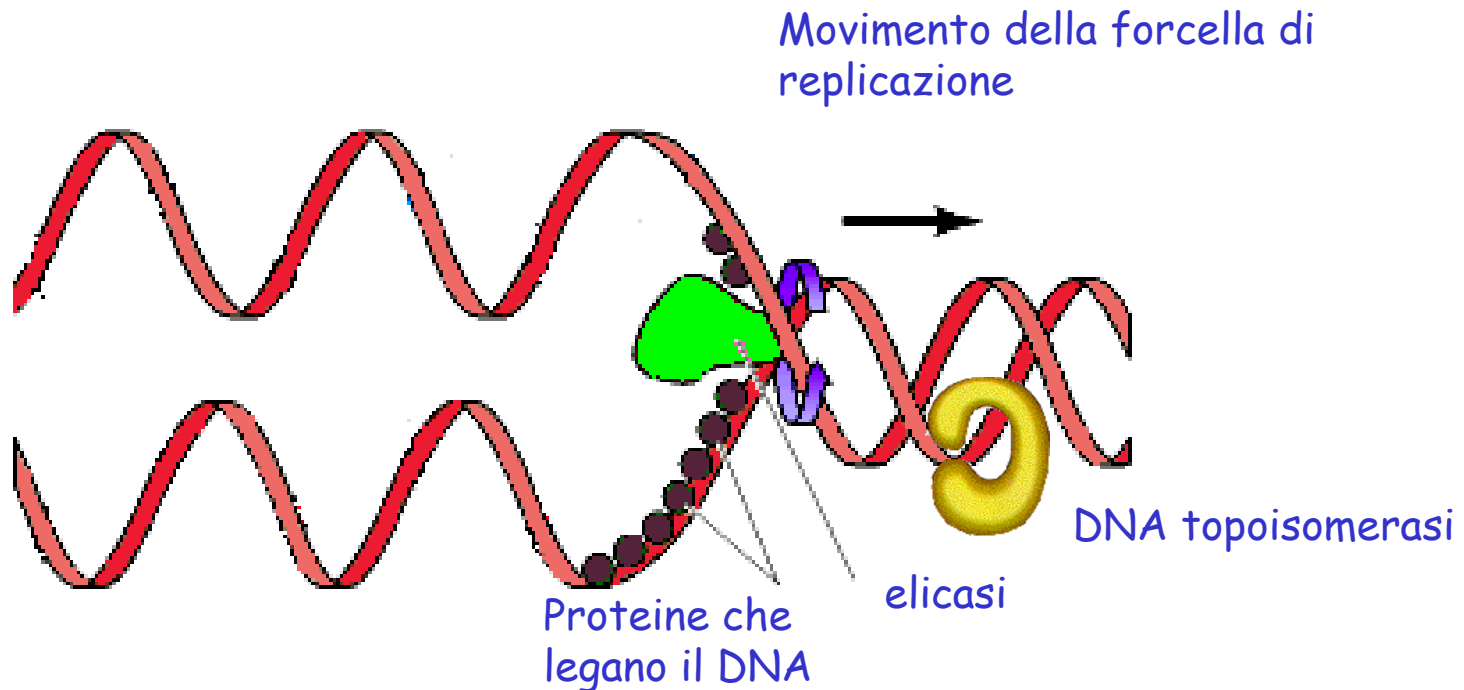


I filamenti nucleotidici separati vengono stabilizzati dalle **proteine che legano il DNA a singolo filamento**

2. Svolgimento del DNA: le topoisomerasi

Le proteine **topoisomerasi** sono enzimi che catalizzano la rottura e la riunione reversibili dei filamenti di DNA

Quando i filamenti parentali del DNA si svolgono, il DNA davanti alla forcella di replicazione è forzato a ruotare. Se non venisse controllata, questa rotazione farebbe attorcigliare su se stesse le molecole di DNA, bloccando la replicazione



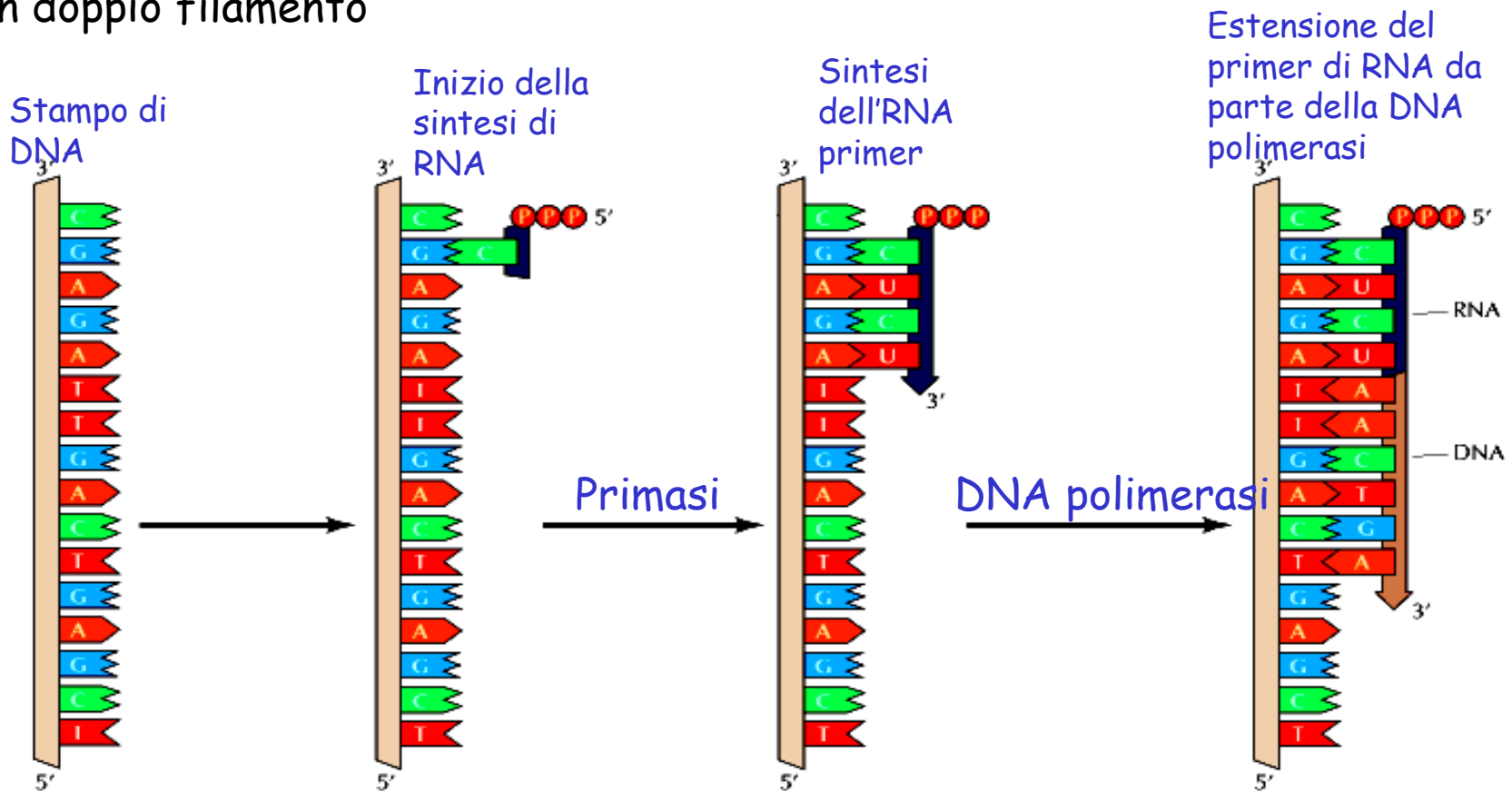
3. La DNA primasi

La Primasi sintetizza brevi tratti (10 nt) di **RNA** usando DNA come stampo

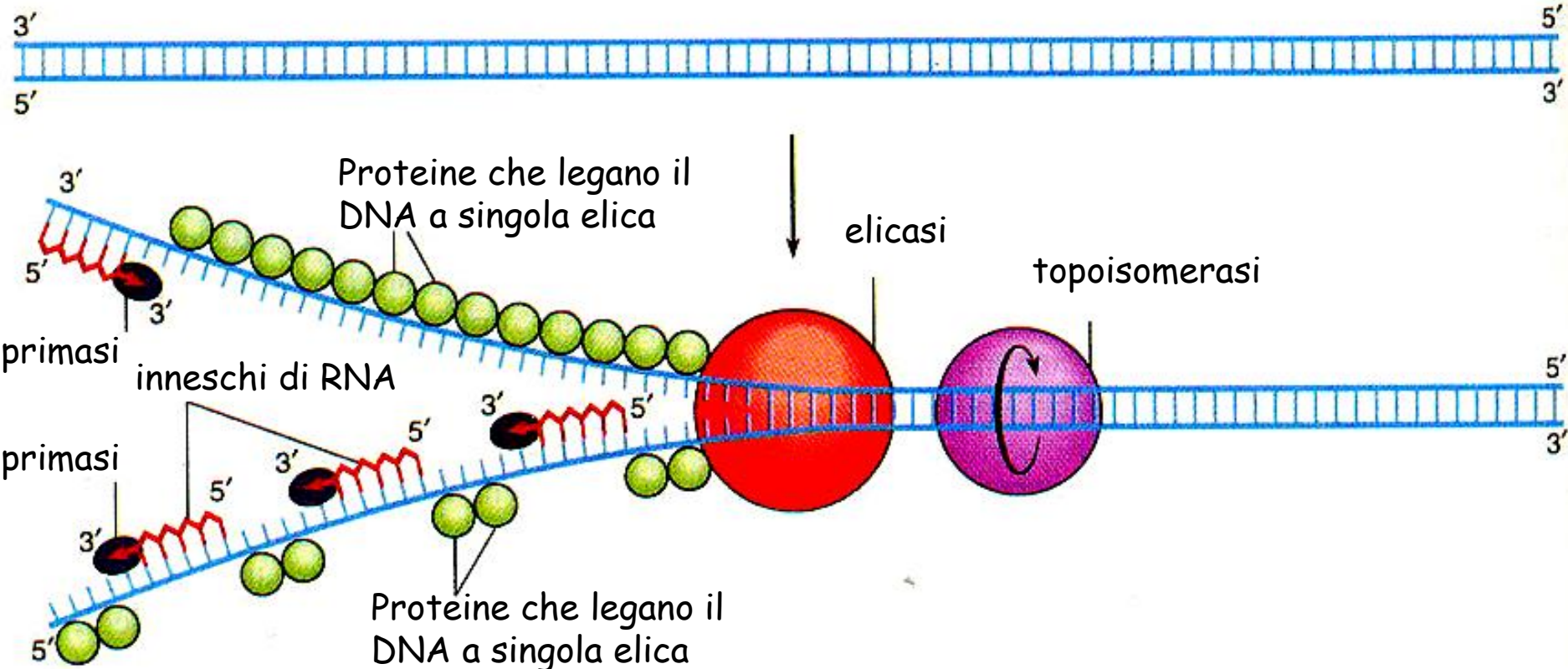
Tratti di RNA fanno da **innesco o primer** per la sintesi del DNA

La DNA polimerasi è **incapace di dare inizio** a un filamento di DNA totalmente nuovo

La DNA polimerasi procede sommando nucleotidi solo ad altri nucleotidi già appaiati in un doppio filamento



3. La DNA primasi



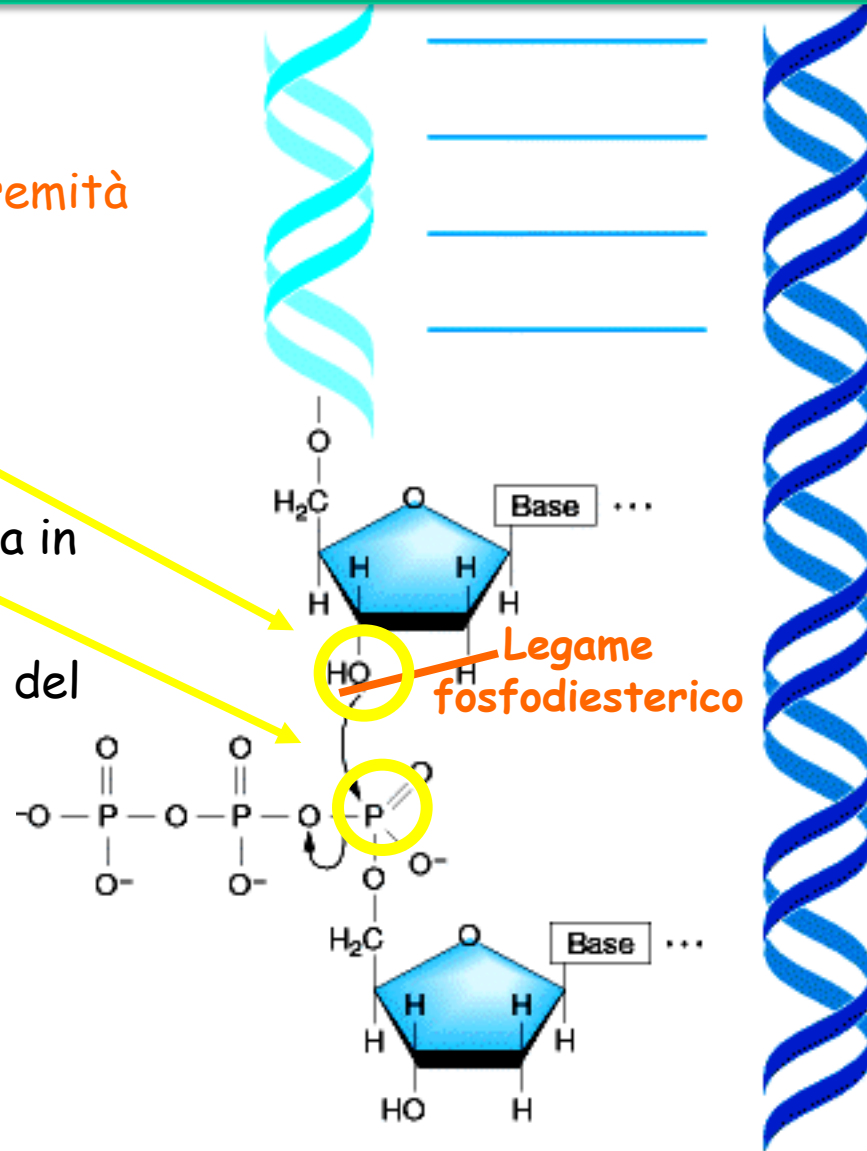
4. Reazione di allungamento della catena di DNA catalizzata dalla DNA polimerasi

La DNA polimerasi catalizza l'aggiunta di nucleotidi **all'estremità 3'** di una catena di DNA in allungamento, formando

legami fosfodiesterici tra

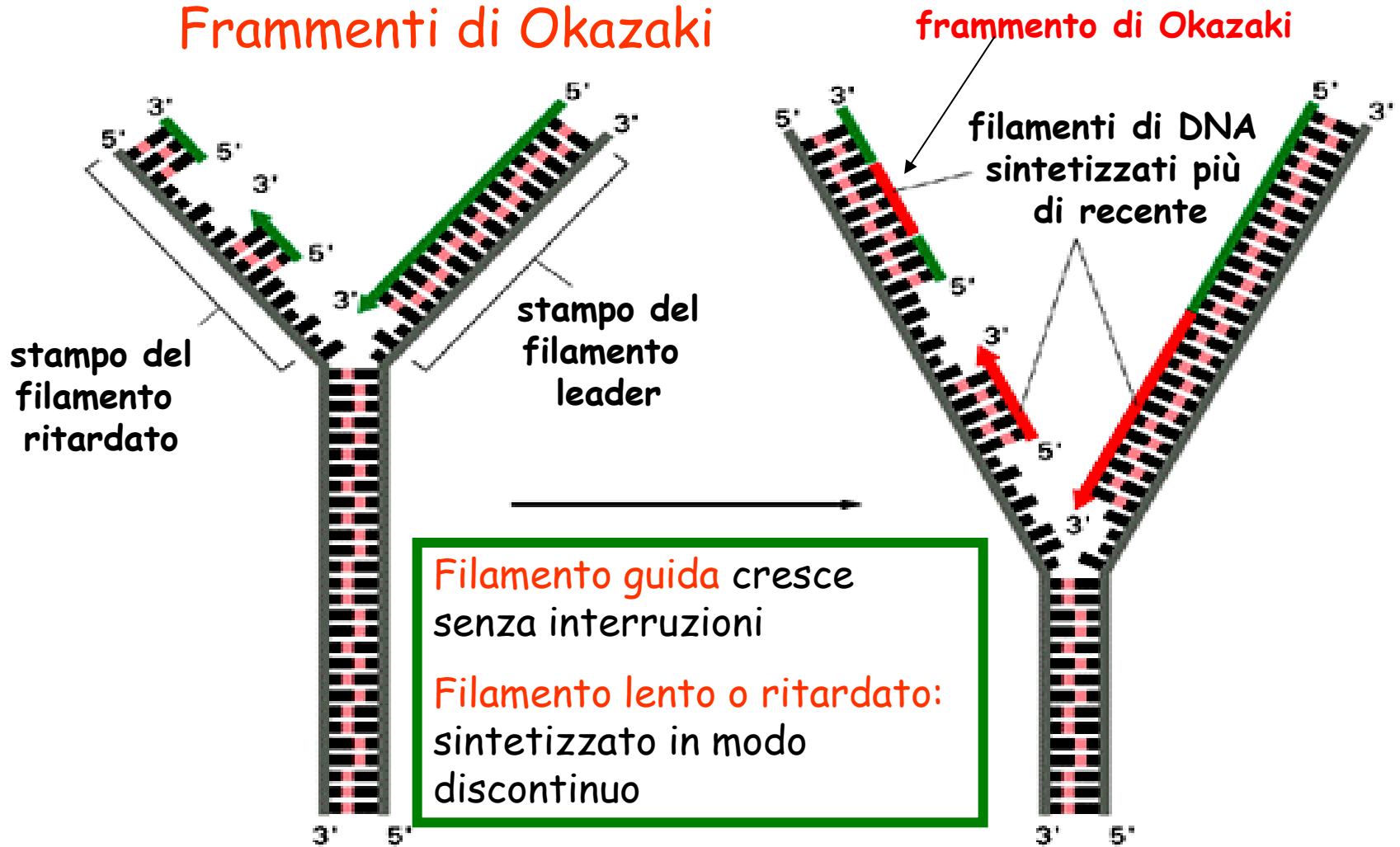
l'OH legato al C3' dell'ultimo nucleotide già unito alla catena in allungamento e

il gruppo fosfato legato al C5' del nucleotide aggiuntivo



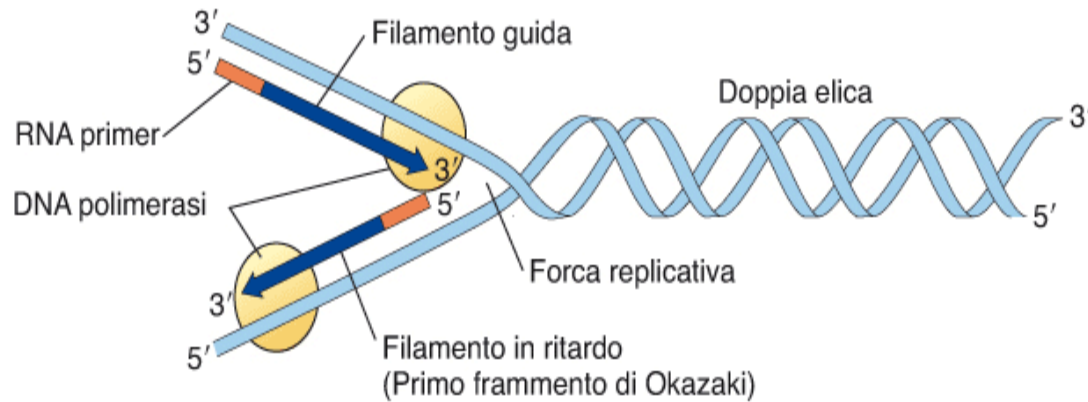
La DNA polimerasi **non** si dissocia dal DNA ogni volta che aggiunge un altro nucleotide alla catena ma vi **resta attaccata e vi scorre sopra** continuando a catalizzare la sintesi di nuovo polimero

Frammenti di Okazaki

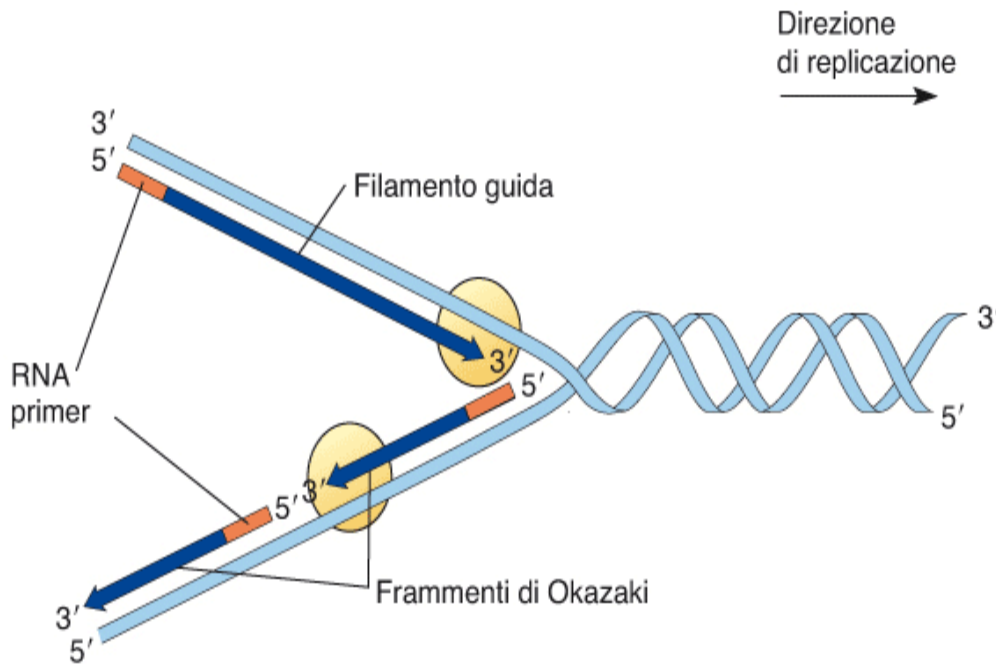


Il filamento di DNA che deve allungarsi all'estremità 5' viene **sintetizzato in modo discontinuo**, in brevi tronconi successivi dalla DNA polimerasi che si muove all'indietro rispetto alla forcella, quindi **in direzione 5'-3'** per ogni troncone

Questi pezzi detti **frammenti di Okazaki**, vengono **ricuciti** in seguito formando un filamento nuovo continuo



1 Il filamento guida (leading) è sintetizzato senza interruzione nella direzione della forza di replicazione, mentre il filamento in ritardo (lagging) è sintetizzato in direzione opposta alla forza di replicazione. L'inizio della sintesi per entrambi i filamenti richiede un primer di RNA poiché il DNA può essere allungato solo per aggiunta di nucleotidi all'estremità 3' di un filamento polinucleotidico già esistente.

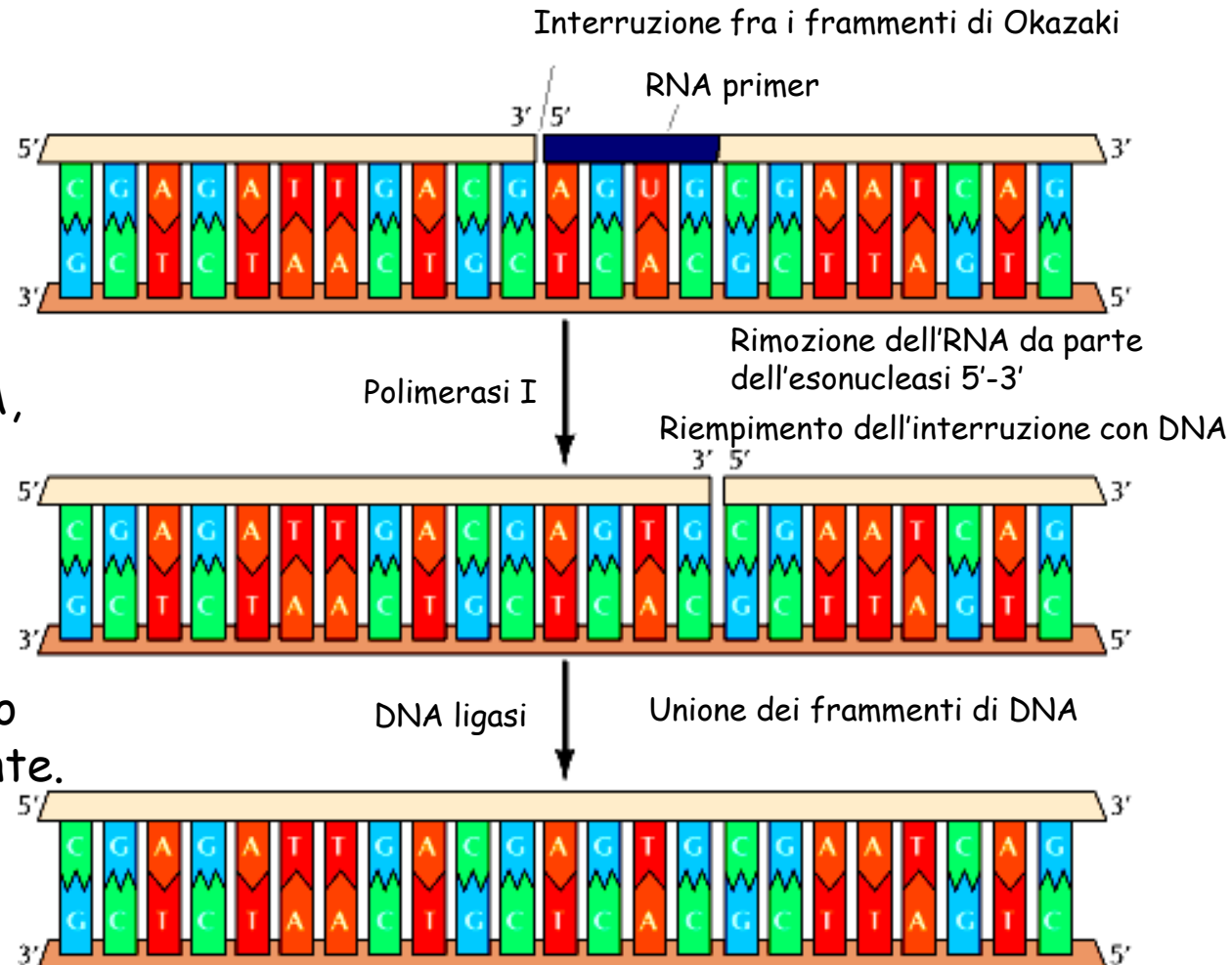


2 Il filamento in ritardo è sintetizzato come una serie di corti frammenti, chiamati frammenti di Okazaki. La sintesi di ogni frammento di Okazaki inizia con la sintesi di un primer di RNA. Notare che il primo frammento di Okazaki sintetizzato è ora quello più lontano dalla forza di replicazione.

5. Rimozione del primer e unione dei frammenti di Okazaki

Per trasformare in un filamento continuo tutti i frammenti separati costruiti sul filamento lento, intervengono altri 3 enzimi:

1. **Nucleasi:** degrada gli inneschi a RNA
2. **Polimerasi riparativa:** sostituisce DNA all'RNA, usando come innesco il frammento di Okazaki adiacente
3. **DNA ligasi:** unisce il P in 5' di un frammento con l'OH in 3' del seguente. Richiede ATP o NADH



La replicazione del DNA: DNA polimerasi

Sia le cellule procariotiche che eucariotiche contengono parecchie DNA polimerasi diverse che hanno ruoli distinti nella replicazione e nella riparazione del DNA

Enzimi	Direzione della sintesi	Attività esonucleasica	Funzioni possibili
Procariotici			
Polimerasi I	5' → 3'	5' → 3' 3' → 5'	riempimento dei "gap" lasciati dalla rimozione dell'innesco; riparazione del DNA
Polimerasi II	5' → 3'	3' → 5'	riempimento dei "gap" lasciati dalla rimozione dell'innesco; riparazione del DNA
<u>Polimerasi III</u>	5' → 3'	3' → 5'	enzima principale della replicazione
Eucariotici			
<u>Polimerasi α</u>	5' → 3'	5' → 3'	enzima principale della replicazione (con la Polimerasi δ); riparazione del DNA
Polimerasi β	5' → 3'	nessuna	riparazione del DNA
Polimerasi γ	5' → 3'	3' → 5'	enzima principale della repl. nei mitocondri e cloroplasti
<u>Polimerasi δ</u>	5' → 3'	3' → 5'	enzima principale della replicazione (con la Polimerasi α)
Polimerasi ε	5' → 3'	3' → 5'	riparazione del DNA; può cooperare con le Polimerasi α e δ nei meccanismi principali della replicazione

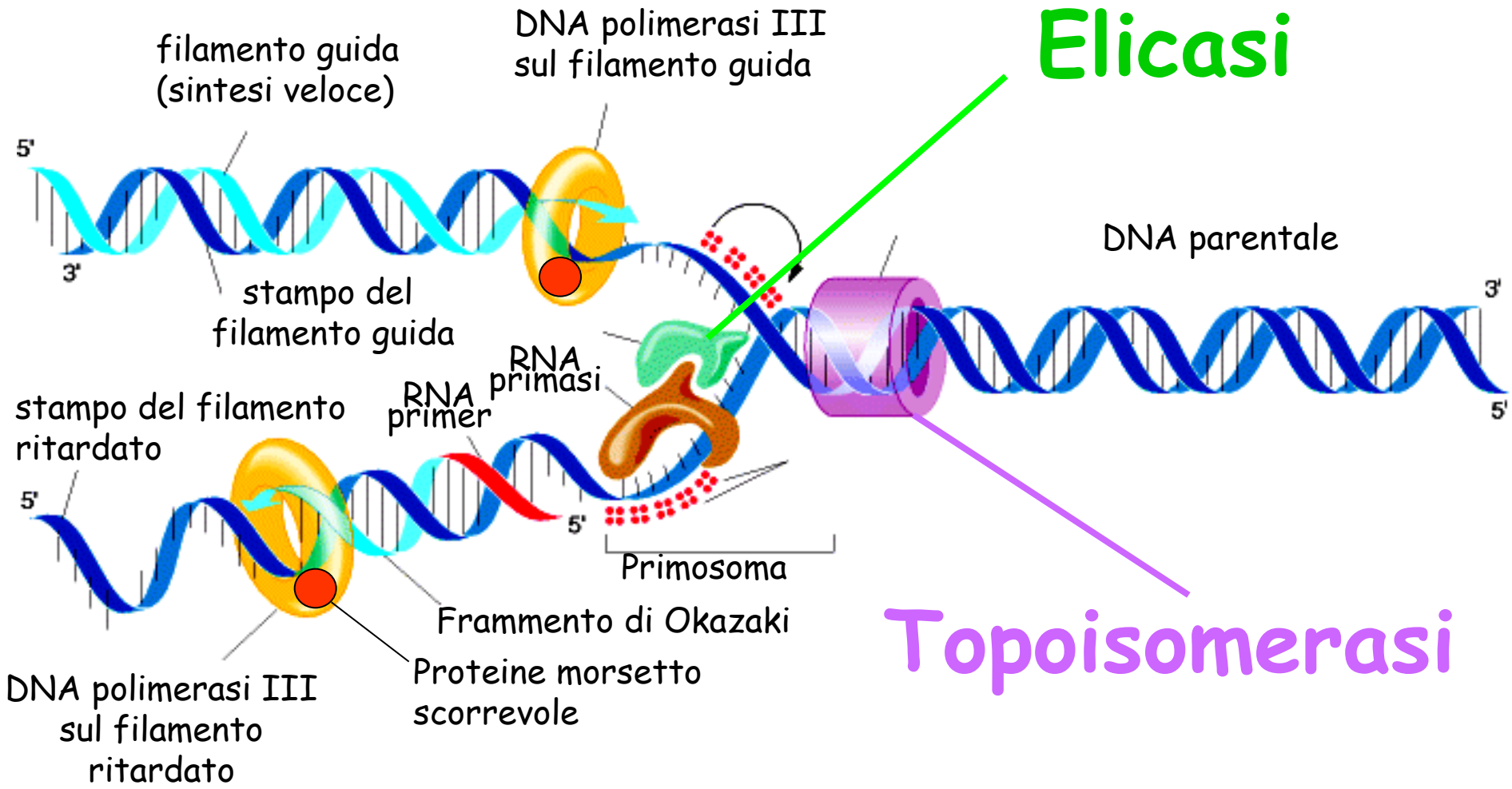
TABELLA 12-3

Le proteine coinvolte nella replicazione del DNA



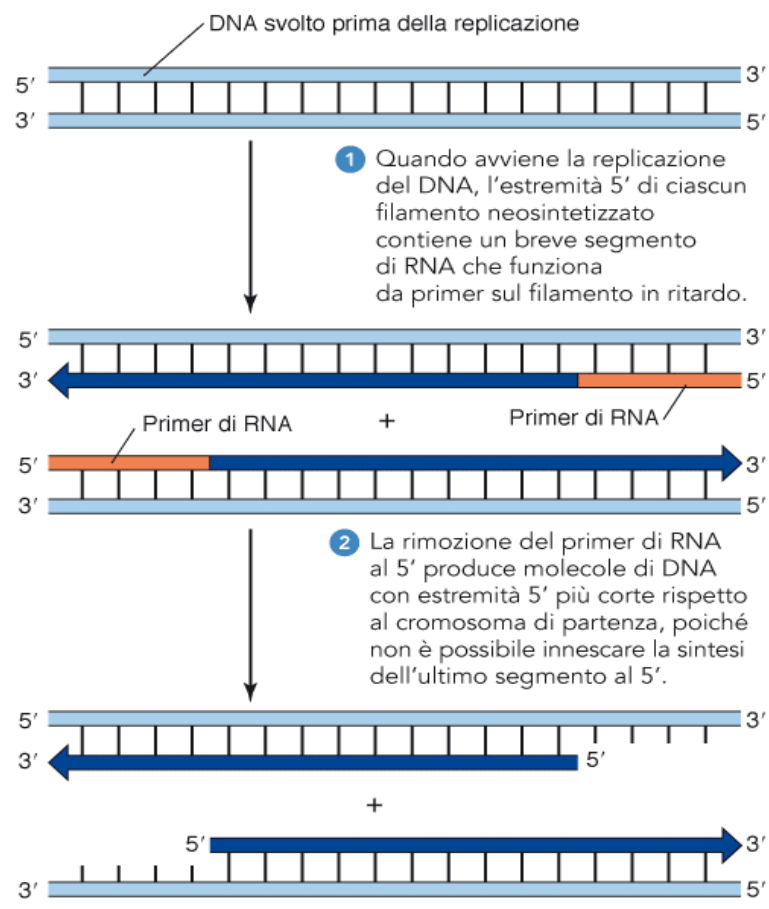
Enzima	Funzione
Elicasi	Svolge la doppia elica in corrispondenza delle forche di replicazione rompendo i legami a idrogeno che tengono insieme i due filamenti
Proteina che lega il singolo filamento (SSB)	Si lega ai singoli filamenti di DNA ed impedisce la riformazione della doppia elica prima che i singoli filamenti siano stati utilizzati come stampo per la replicazione
Topoisomerasi	Taglia uno o entrambi i filamenti di DNA, evitando l'eccessivo avvolgimento durante la replicazione, e li risalda in una configurazione più rilassata
DNA polimerasi	Legge le subunità nucleotidiche tra loro per formare un nuovo filamento di DNA a partire da un filamento di DNA stampo
DNA primasi	Sintetizza tratti di RNA (primer) sul filamento in ritardo. Avvia la replicazione del filamento guida
DNA ligasi	Legge tra loro i frammenti di Okazaki unendo l'estremità 3' del nuovo frammento di DNA all'estremità 5' del tratto di DNA adiacente

Complesso multienzimatico implicato nella replicazione del DNA

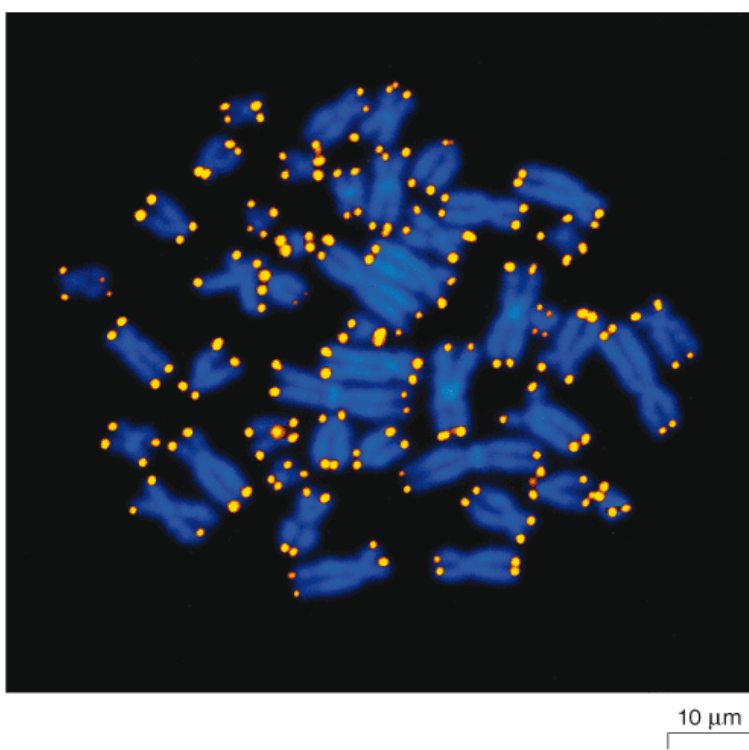


6. La telomerasi

la **telomerasi**, aggiunge copie multiple della stessa sequenza di DNA in fondo al cromosoma, producendo un tratto di DNA supplementare e consentendo di completare il filamento lento



(a) Il motivo per cui un filamento di DNA è più corto di quello della generazione precedente.

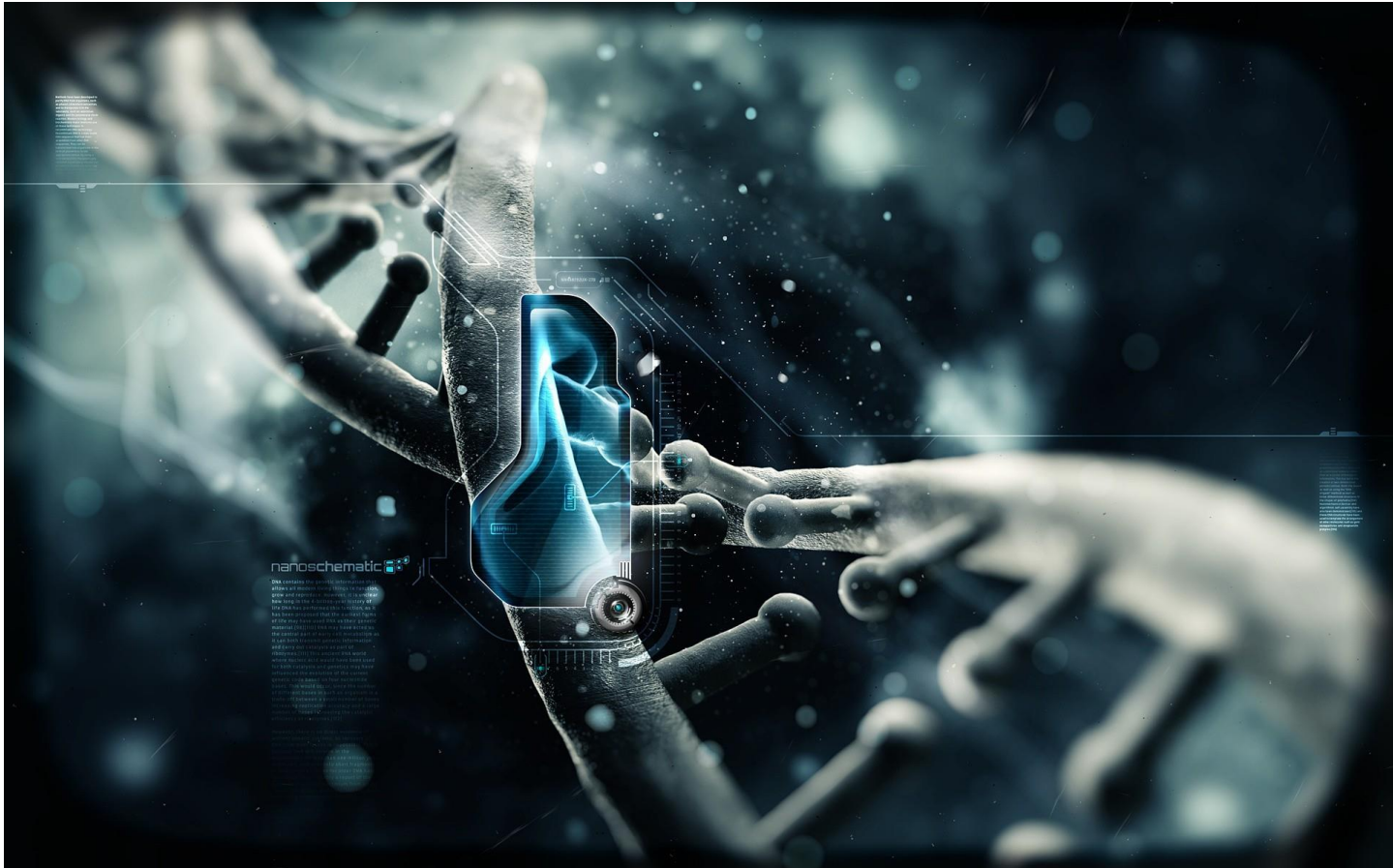


(b) Immagine al microscopio ottico di cromosomi umani con i telomeri marcati con traccianti fluorescenti (giallo).

FIGURA 12-18 I telomeri

Riparazione del DNA

Polimerasi II e Polimerasi III



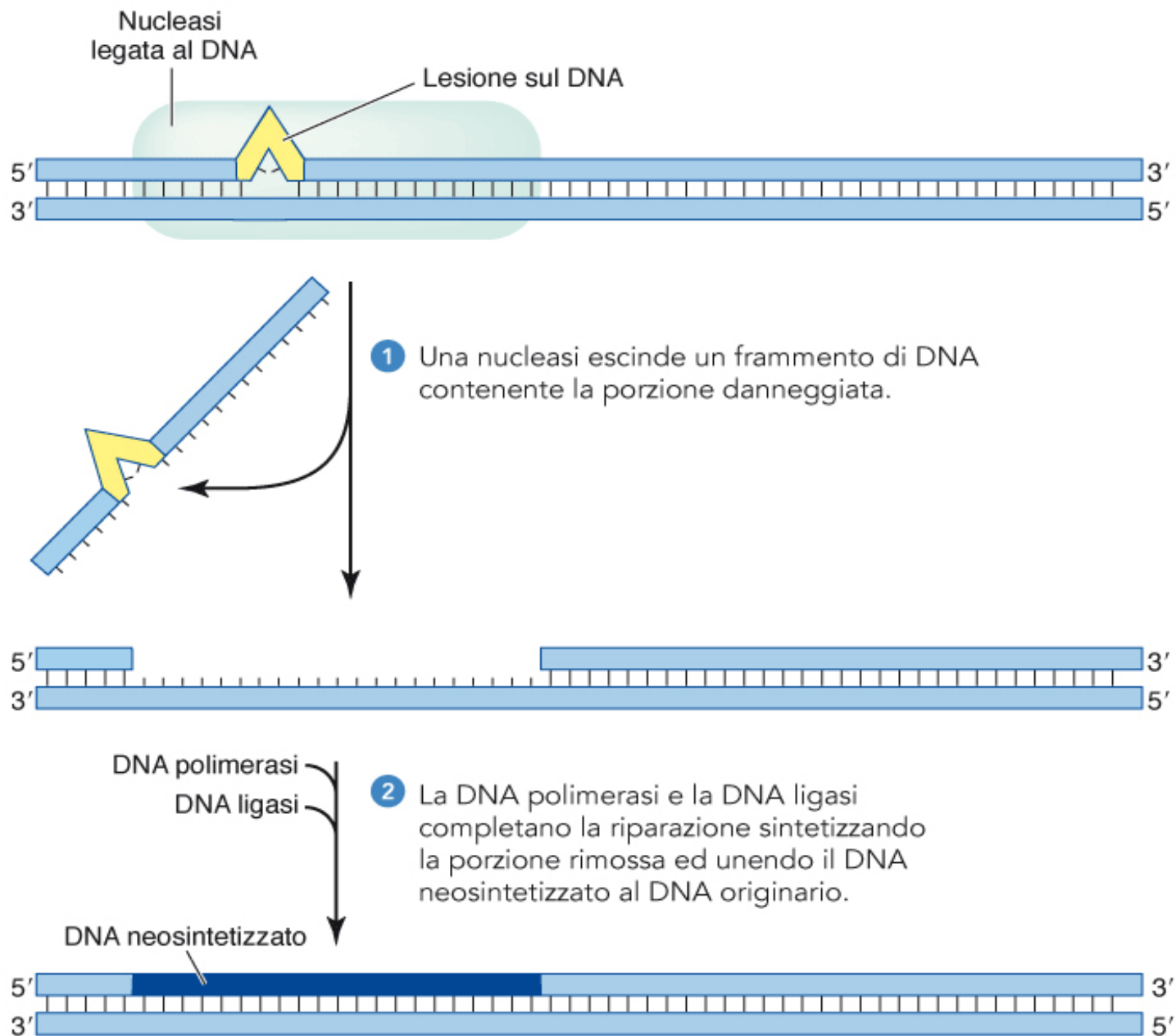


FIGURA 12-17 Riparazione per escissione nucleotidica del DNA danneggiato

Grazie dell'attenzione

