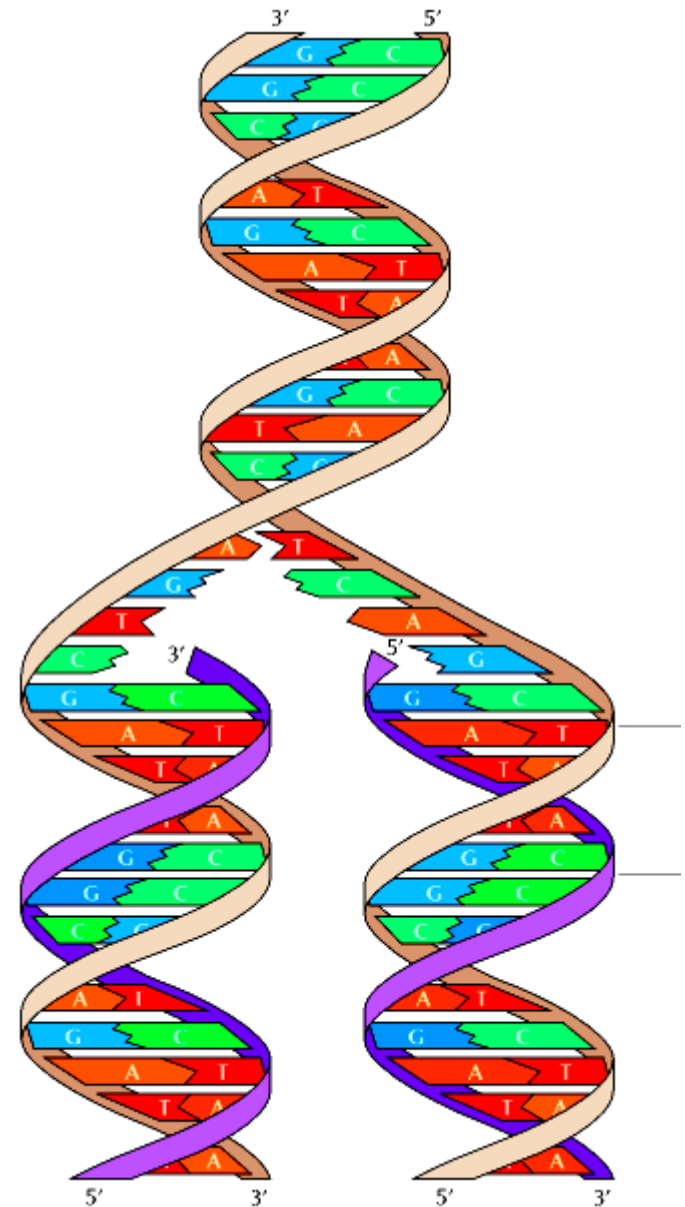


Lezione 5 - La replicazione del DNA

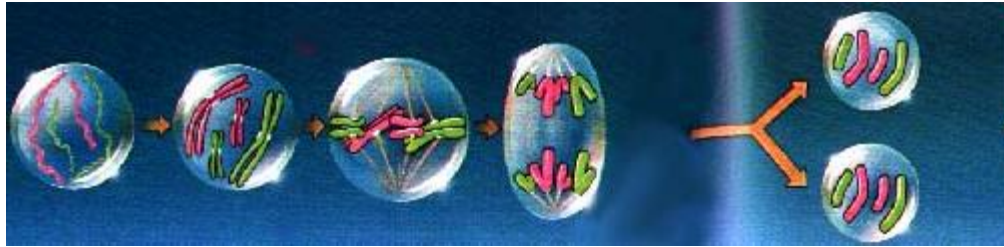
1. Introduzione

2. Modelli ed esperimenti
3. Replicazione nei procarioti
4. Complesso enzimatico
5. Svolgimento del DNA
6. Forcella replicativa
7. Primasi e innesco
8. Replicazione negli eucarioti
9. Telomerasi
10. Riparazione

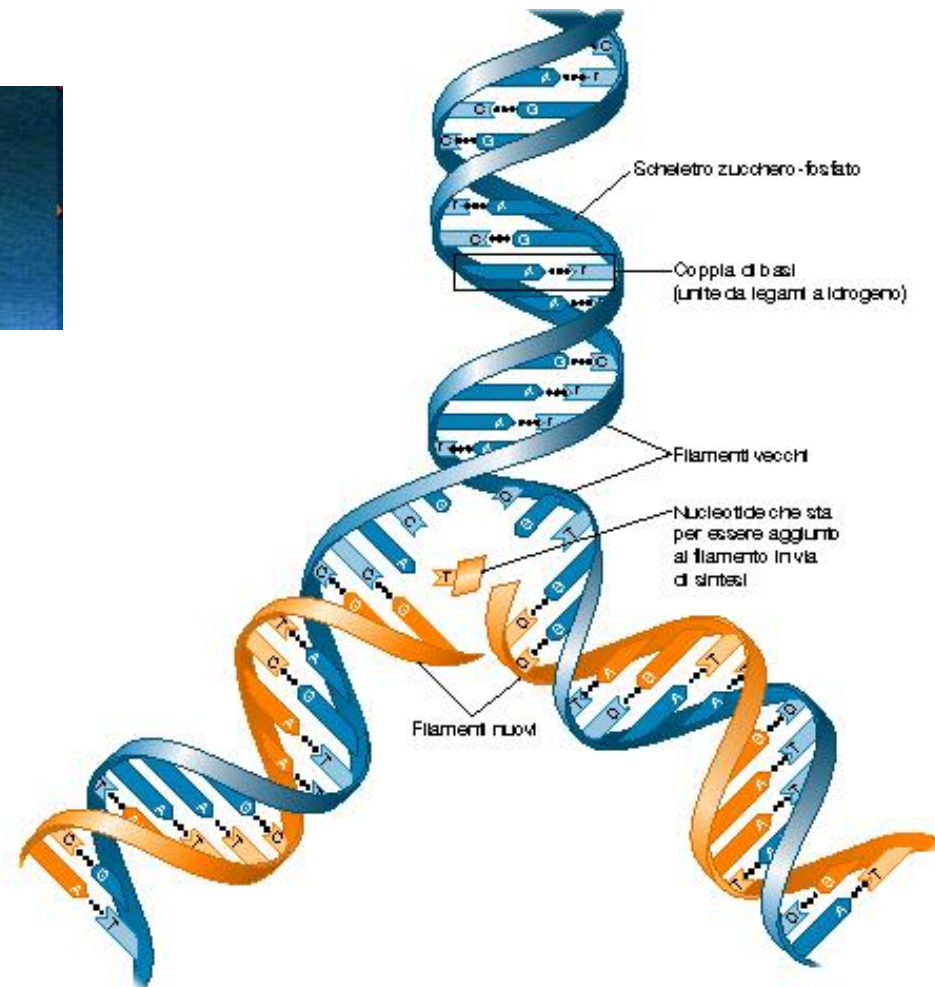


La replicazione del DNA

La capacità della cellula di mantenere l'ordine dei suoi componenti nel caos ambientale dipende dalla duplicazione accurata di una enorme quantità di **informazione genetica** conservata nel suo DNA.



Il processo di ricopiatura, detto **replicazione del DNA**, deve avvenire perché da una cellula si possano formare 2 cellule figlie geneticamente identiche

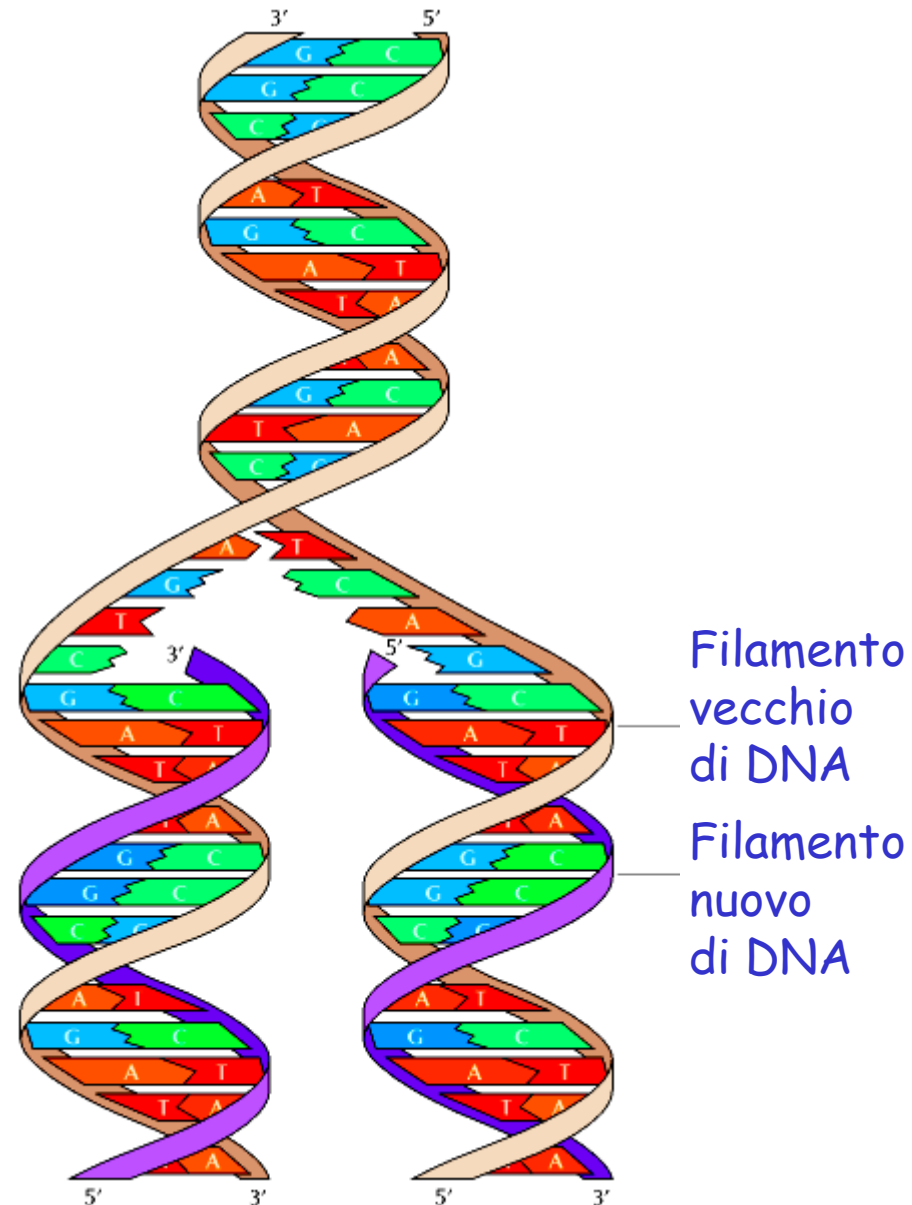


La replicazione del DNA

Replicazione semiconservativa

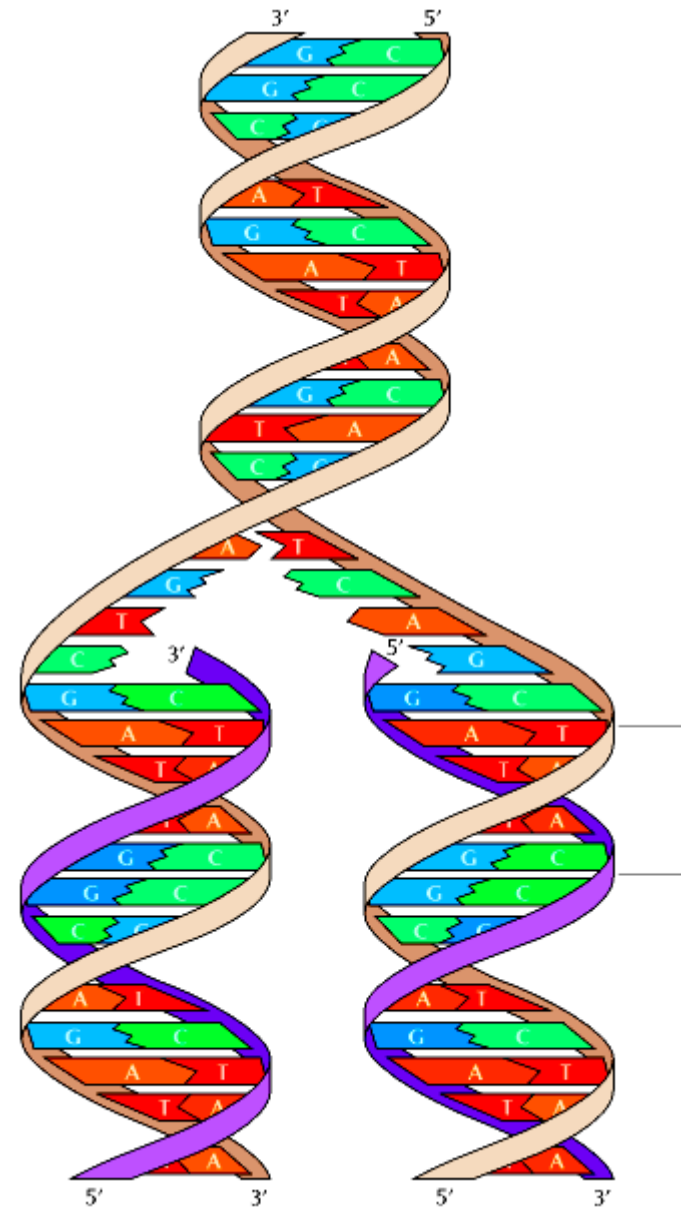
I due filamenti di DNA parentale si **separano** e ciascuno serve da **stampo** per la sintesi di un nuovo filamento **complementare** la cui sequenza è dettata dalla specificità dell'**accoppiamento delle basi**

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



La replicazione del DNA

1. Introduzione
2. Modelli ed esperimenti
3. Replicazione nei procarioti
4. Complesso enzimatico
5. Svolgimento del DNA
6. Forcella replicativa
7. Primasi e innesco
8. Replicazione negli eucarioti
9. Telomerasi
10. Riparazione



Esperimento di Meselson e Stahl, 1958

Inizio

Terreno contenente ^{15}N

Continuazione della crescita per una generazione in terreno ^{14}N

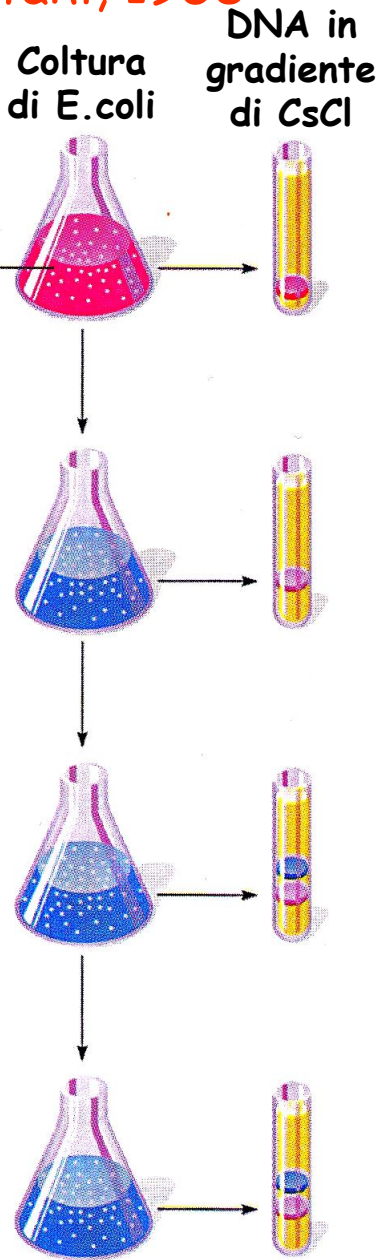
Primo ciclo di replicazione

Continuazione della crescita per una seconda generazione

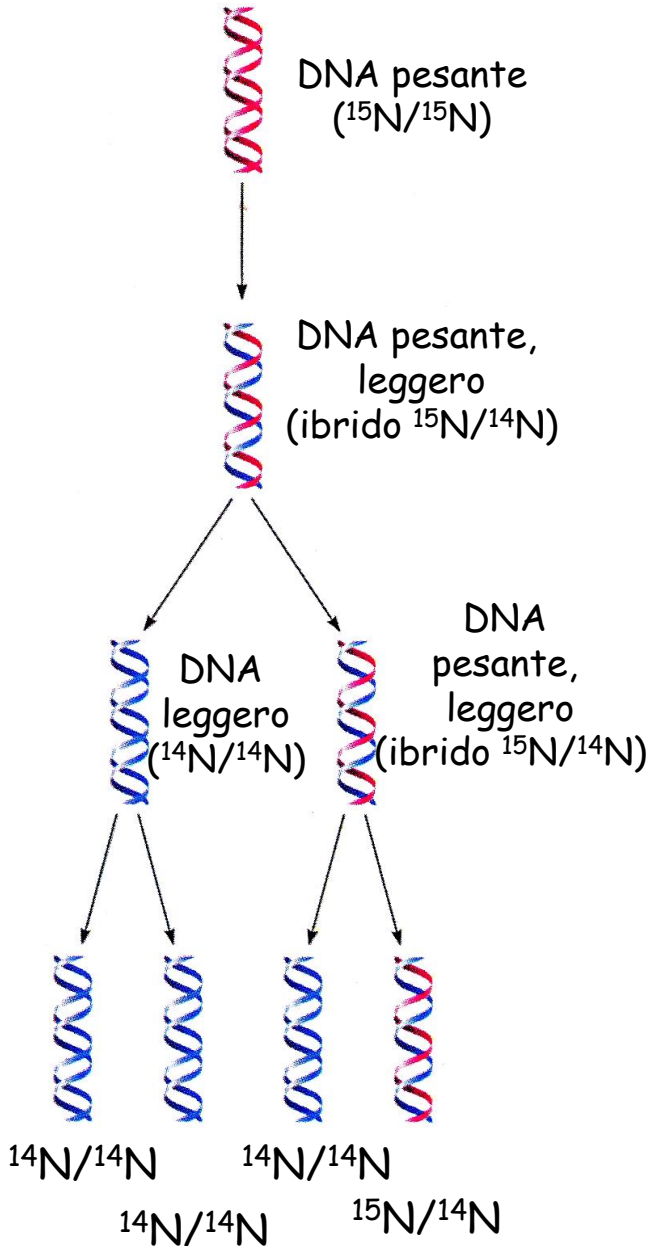
Secondo ciclo di replicazione

Continuazione della crescita per una terza generazione

Terzo ciclo di replicazione

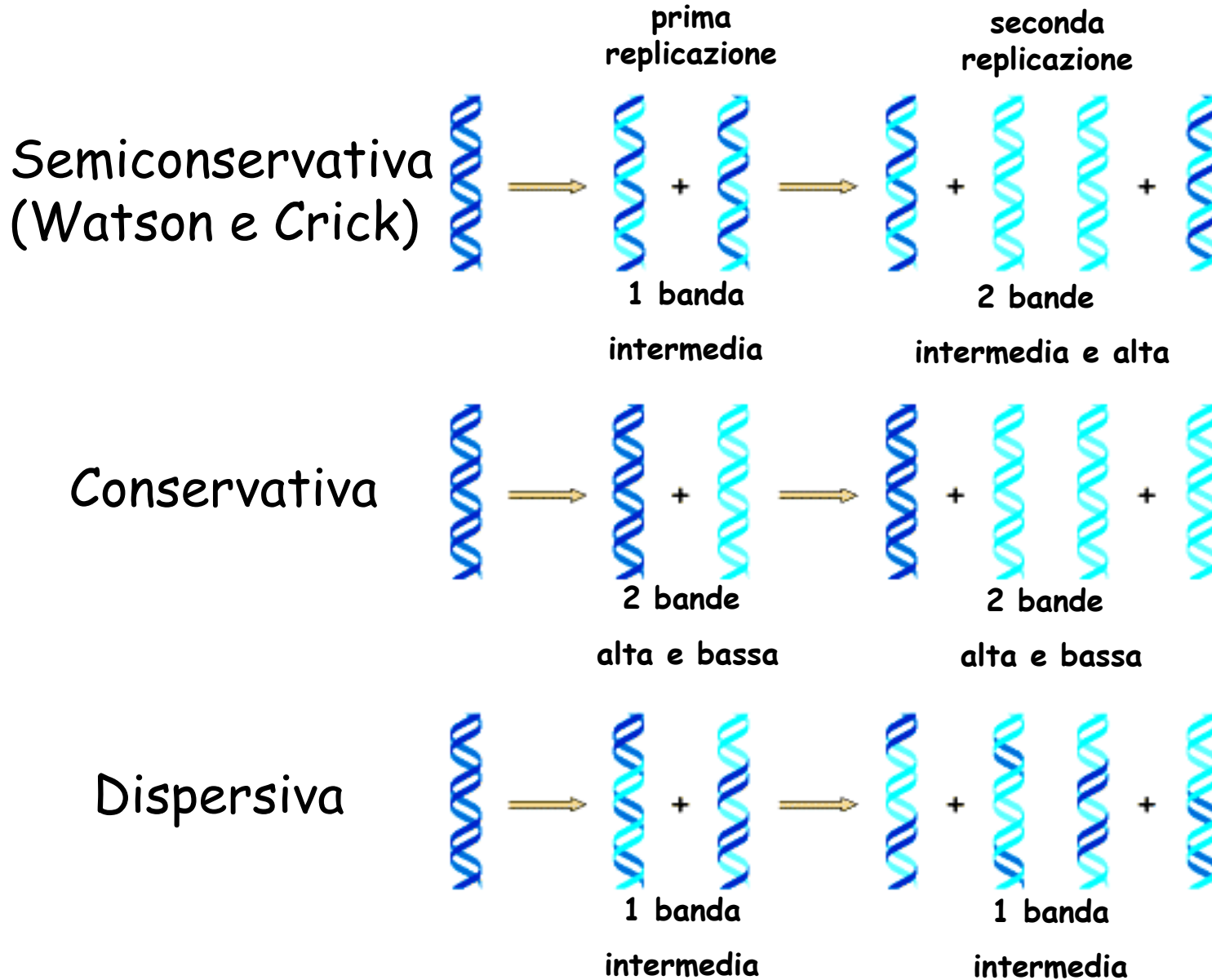


Composizione del DNA



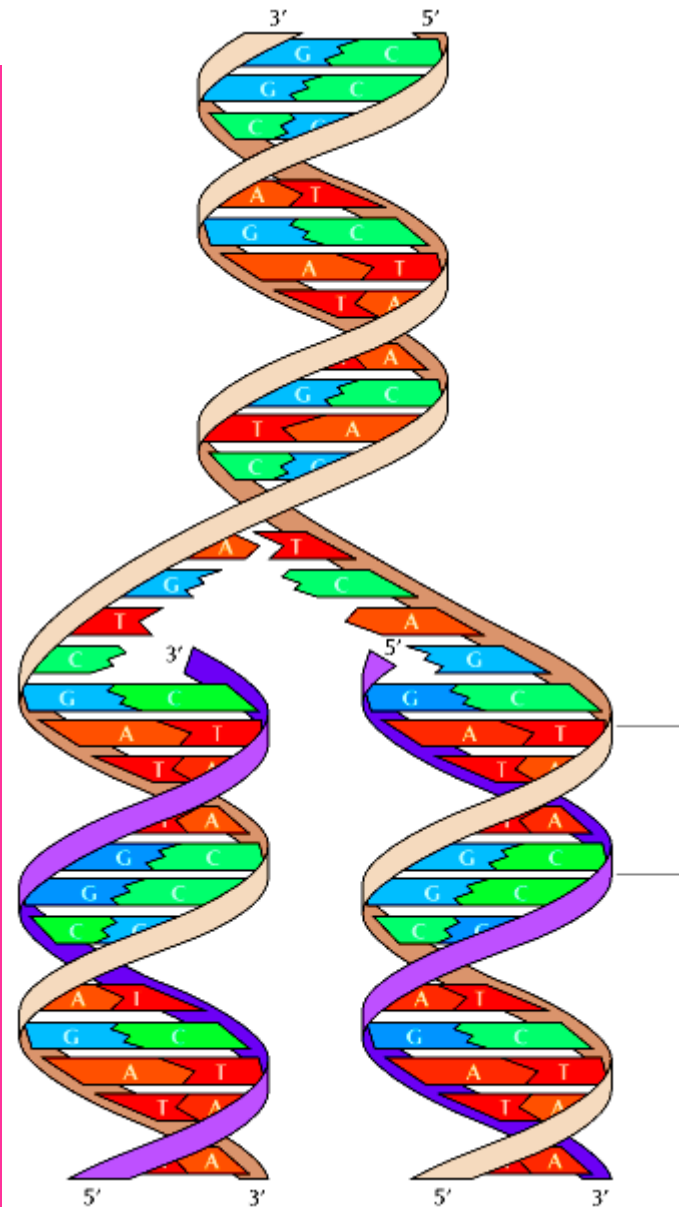
Esperimento di Meselson e Stahl

La replicazione semiconservativa del DNA



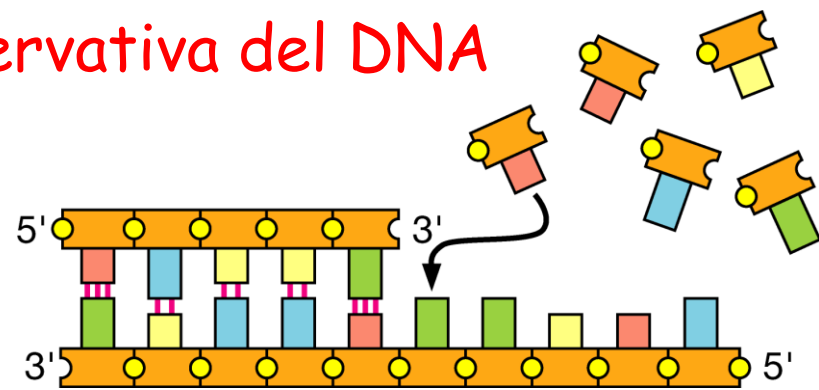
La replicazione del DNA

1. Introduzione
2. Modelli ed esperimenti
3. **Replicazione nei procarioti**
4. Complesso enzimatico
5. Svolgimento del DNA
6. Forcella replicativa
7. Primasi e innesco
8. Replicazione negli eucarioti
9. Telomerasi
10. Riparazione

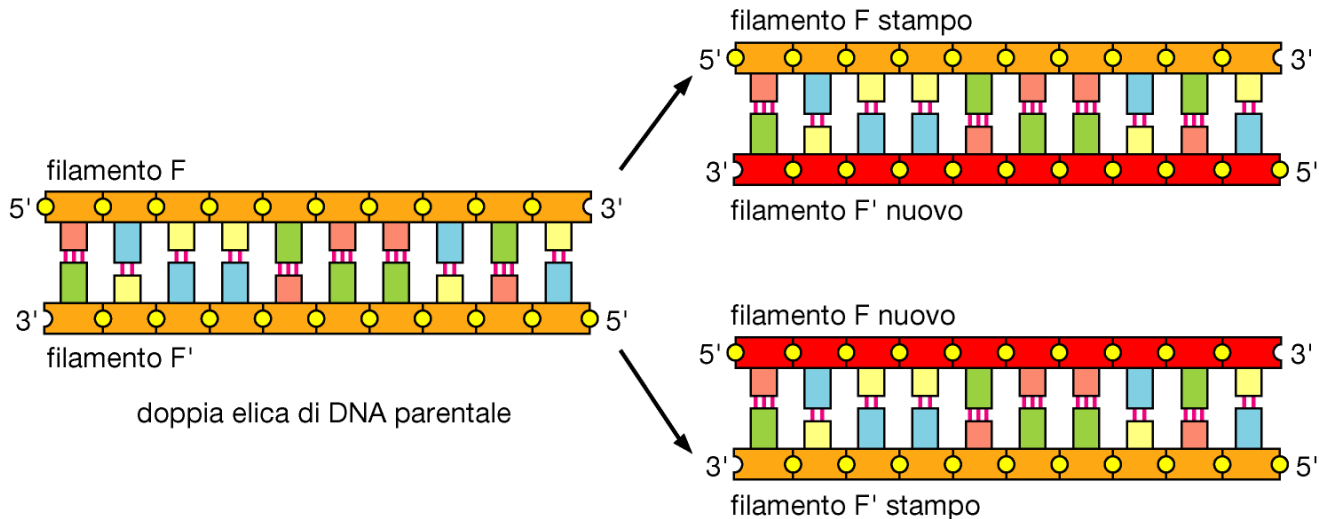


La replicazione semiconservativa del DNA

Ogni filamento di DNA contiene una sequenza nucleotidica esattamente **complementare** a quella del filamento opposto: per questo ognuno di essi può fare da **stampo** per la sintesi di un altro filamento complementare.



Se si indicano i due filamenti come F e F', il filamento F funge da stampo per un nuovo filamento F', mentre F' fa da stampo per un nuovo filamento F.

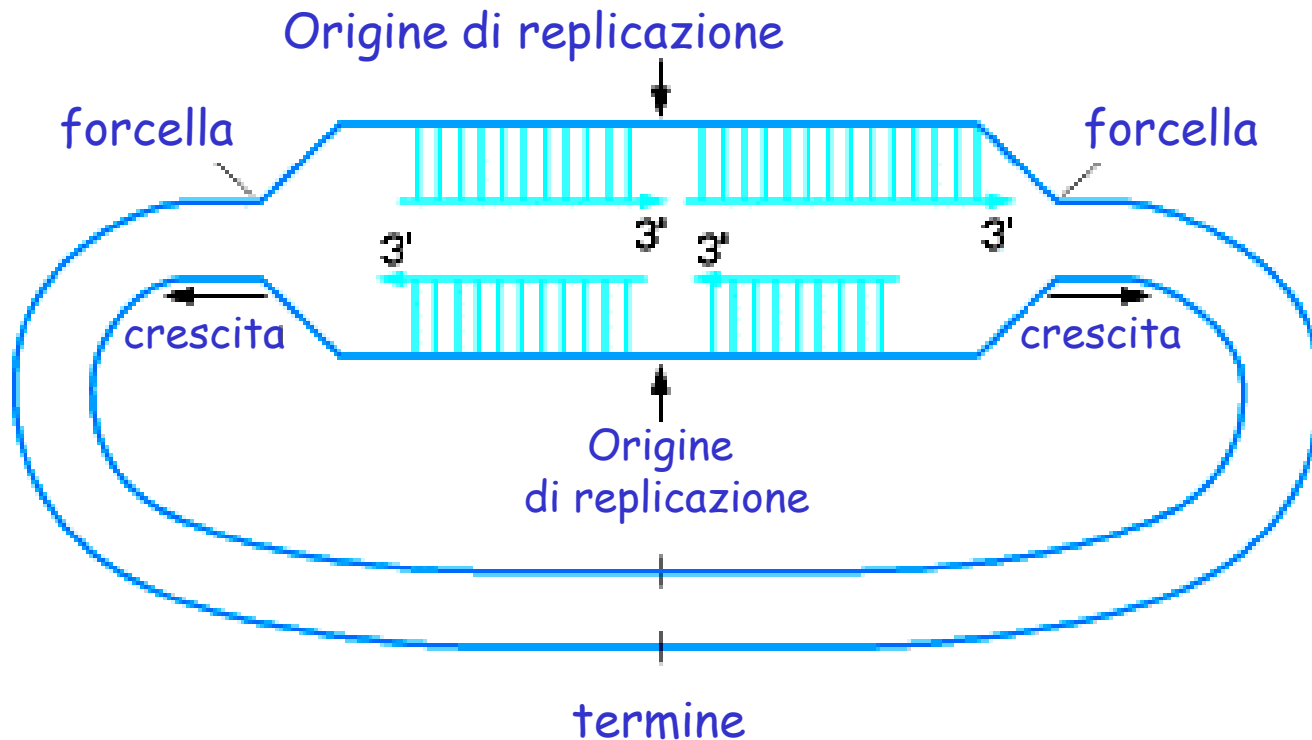


Replicazione: impresa formidabile che comporta la copiatura di miliardi di coppie nucleotidiche ad ogni divisione

La copiatura deve essere **veloce ed accurata**: una cellula in replicazione riproduce in 8 ore l'equivalente di 1000 libri sbagliando in media non più di 1 o 2 lettere!

Origini di replicazione

Il processo replicativo del DNA viene innescato da proteine iniziatrici (**DnaA**) che si legano al DNA e distanziano le catene rompendo i legami idrogeno tra le basi in modo che le basi disaccoppiate si possano utilizzare da stampo



Genoma batterico: una molecola circolare: una sola origine di replicazione

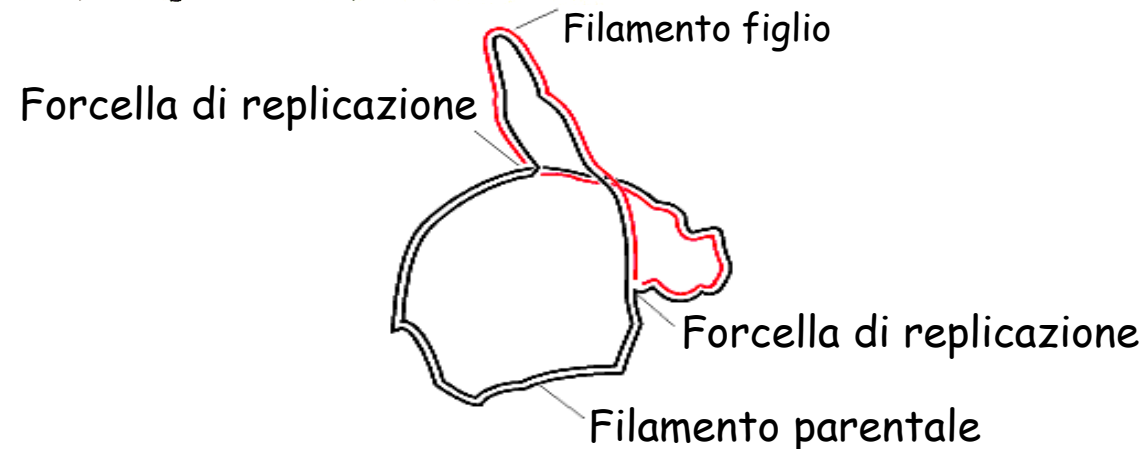
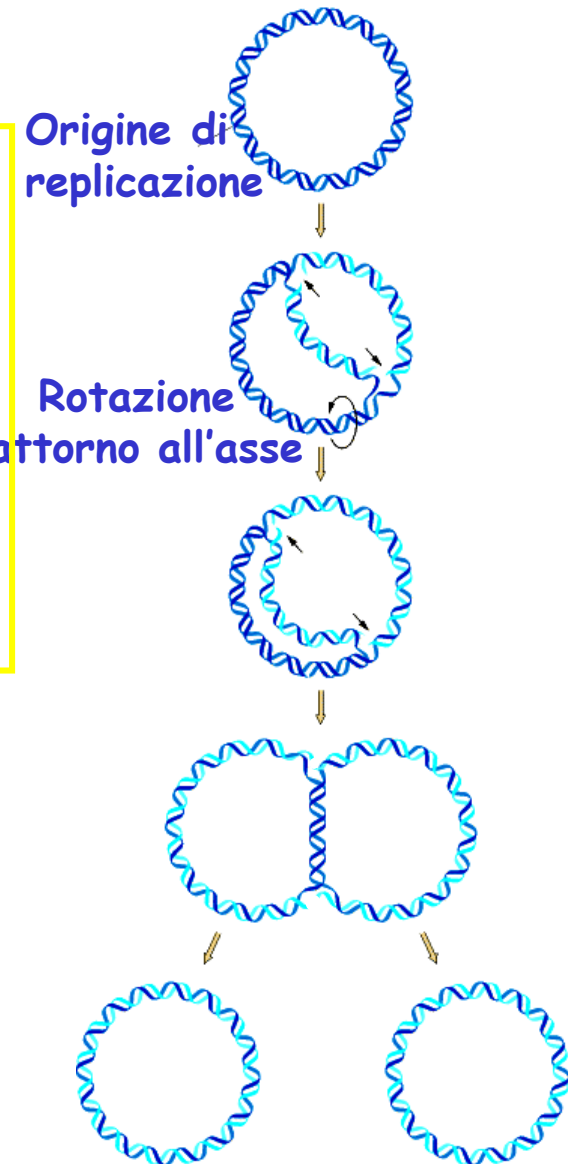
Genoma umano: 10 000 origini di replicazione

Origini di replicazione



Il genoma batterico contiene 2 **forcelle di replicazione**, che rappresentano le regioni di sintesi attiva del DNA

A livello di ciascuna forcella i filamenti parentali del DNA si separano e vengono sintetizzati due filamenti figli

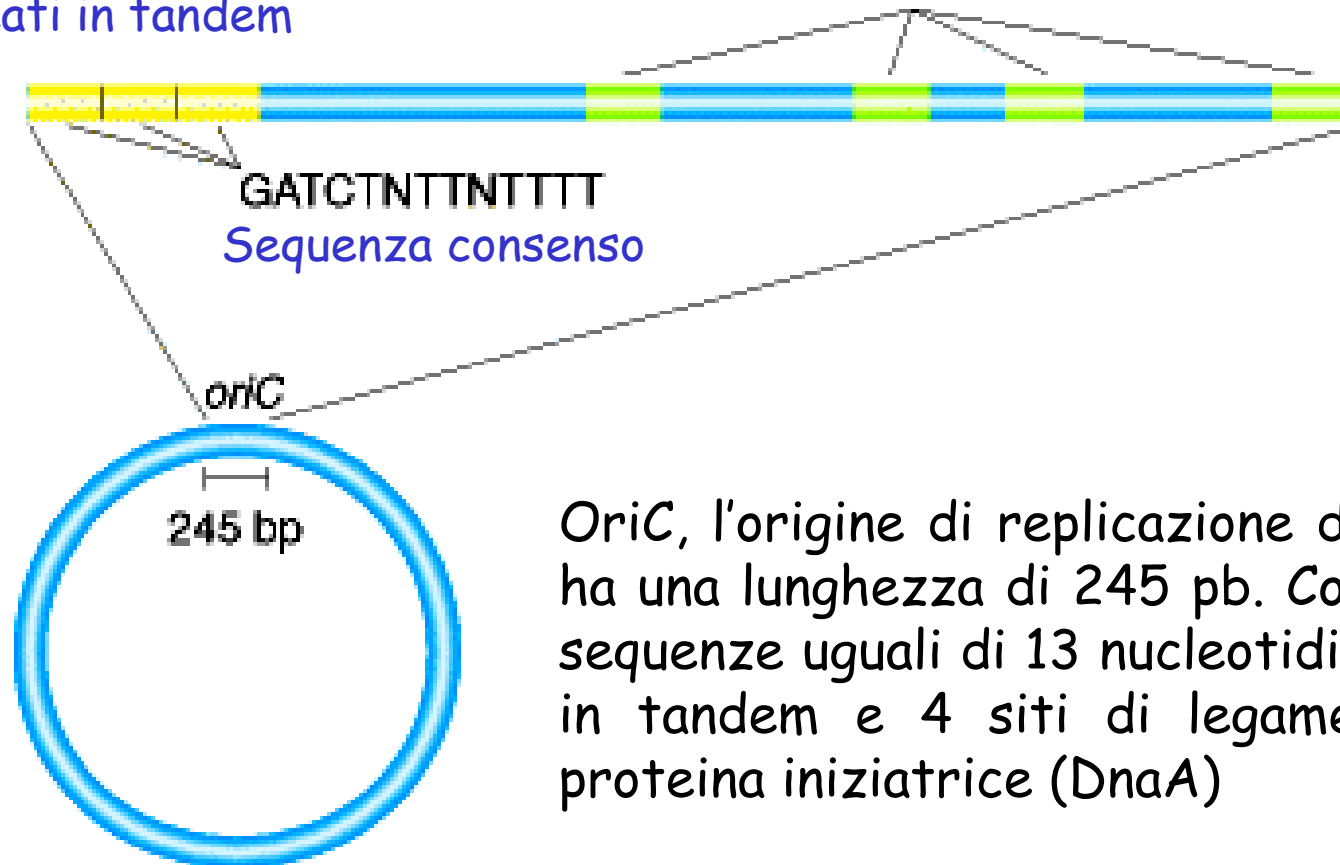


Origini di replicazione

Origini di replicazione: sono caratterizzate da una particolare sequenza

3 sequenze di 13 nucleotidi allineati in tandem

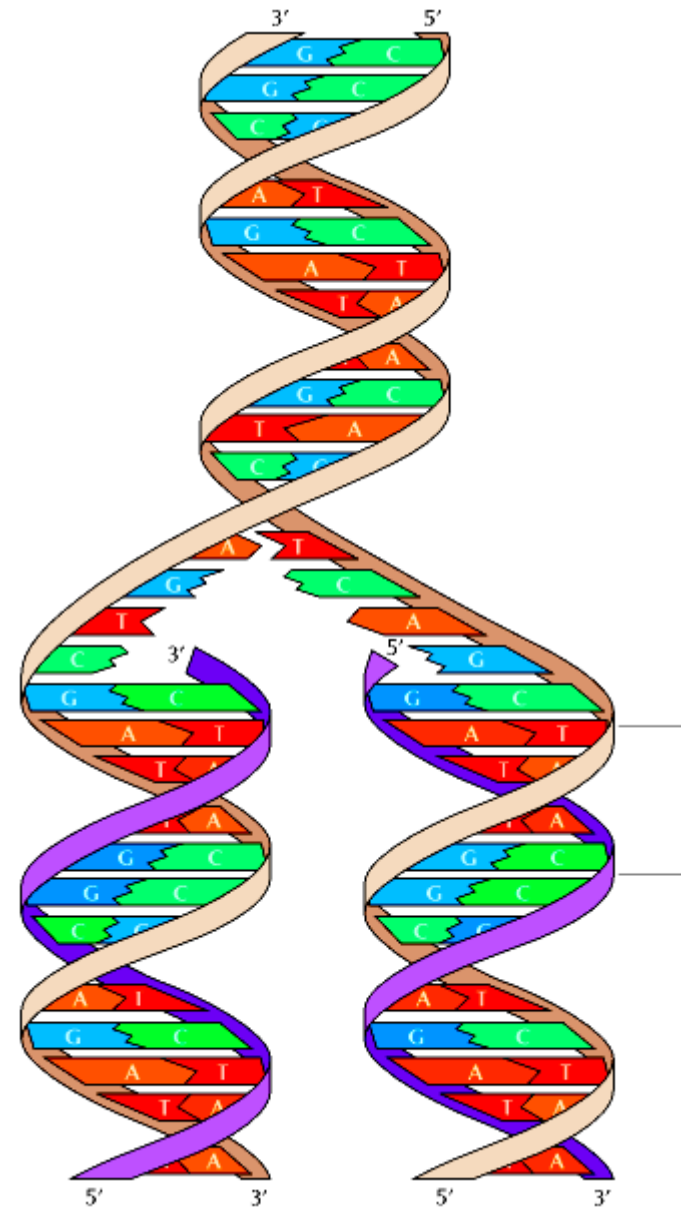
Siti di legame per la proteina DnaA



OriC, l'origine di replicazione di *E. coli*, ha una lunghezza di 245 pb. Contiene 3 sequenze uguali di 13 nucleotidi allineati in tandem e 4 siti di legame per la proteina iniziatrice (DnaA)

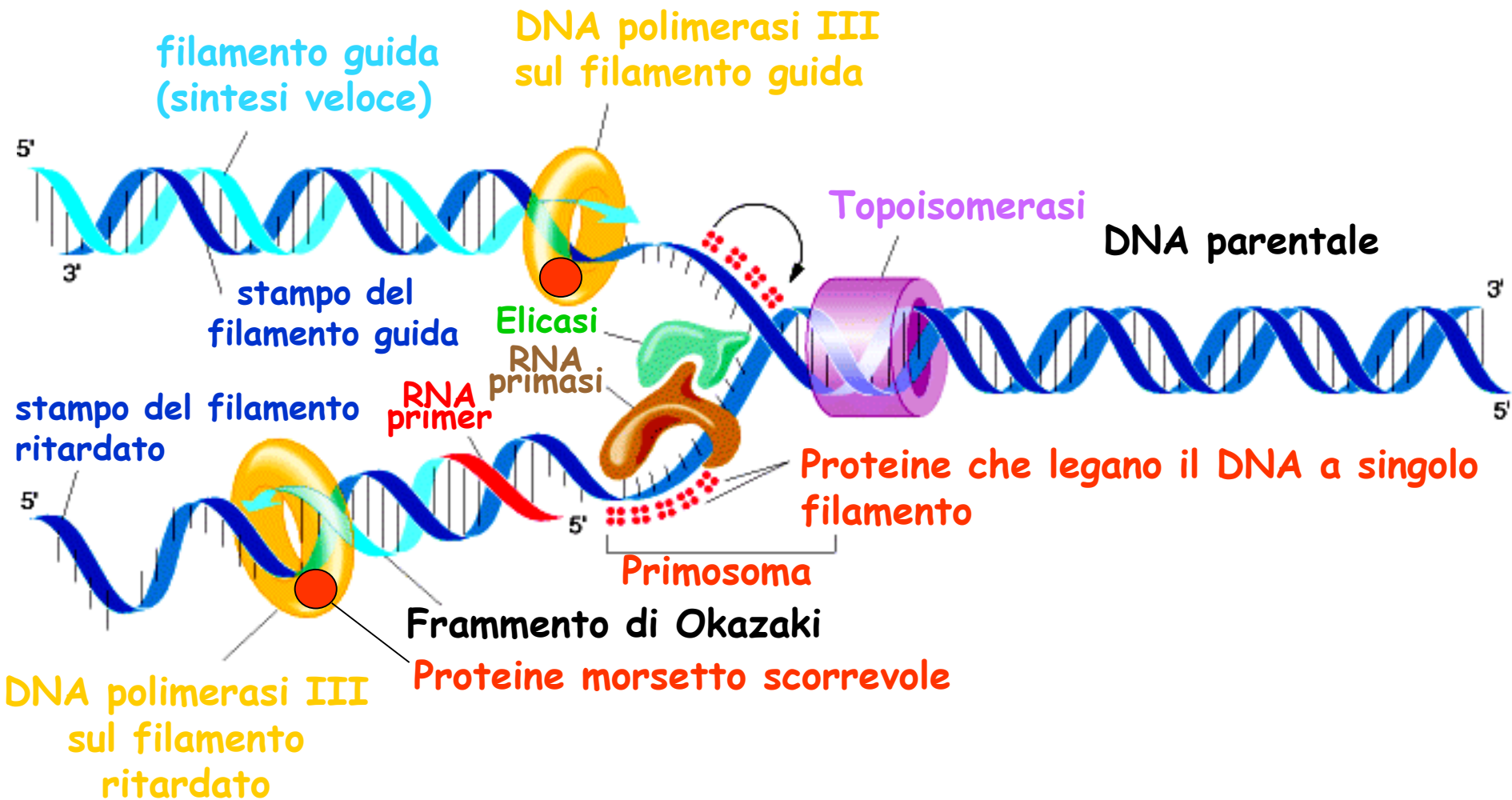
La replicazione del DNA

1. Introduzione
2. Modelli ed esperimenti
3. Replicazione nei procarioti
- 4. Complesso enzimatico**
5. Svolgimento del DNA
6. Primasi e innesco
7. Replicazione negli eucarioti
8. Telomerasi
9. Riparazione



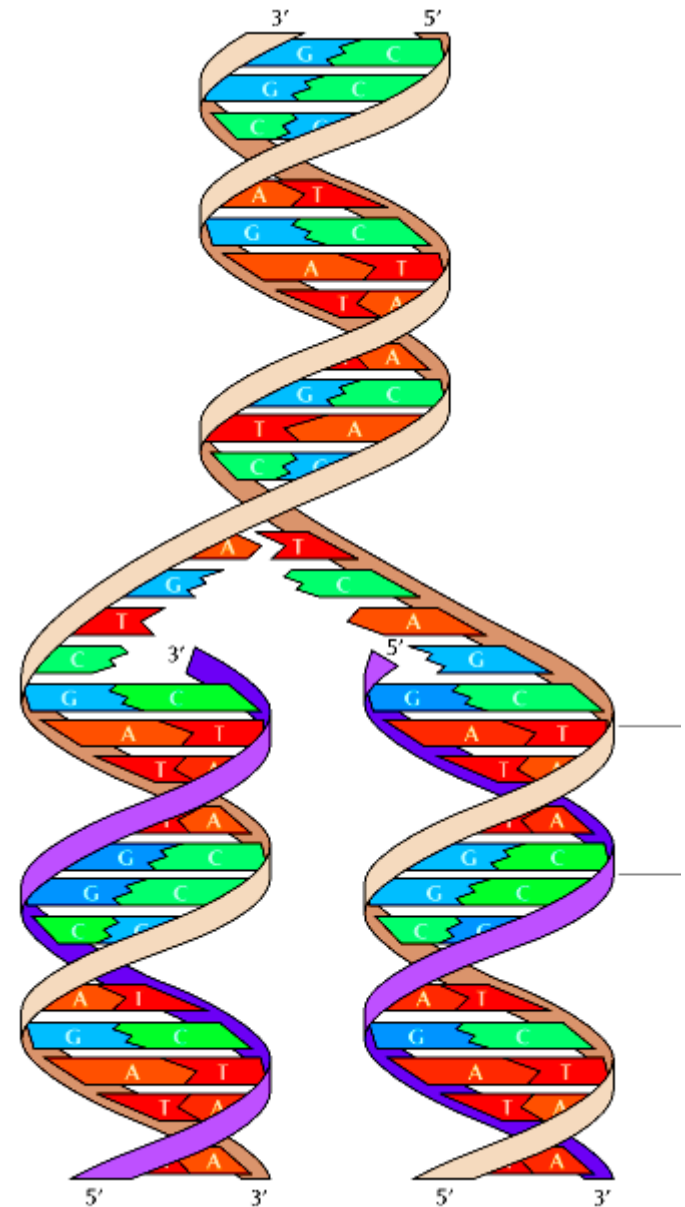
Complesso multienzimatico

Nella replicazione del DNA intervengono tutta una serie di proteine che sono aggregate in un grande **complesso multienzimatico** che si sposta in blocco lungo il DNA, in modo da sintetizzare la nuova molecola su ciascuno dei filamenti originali con una azione coordinata

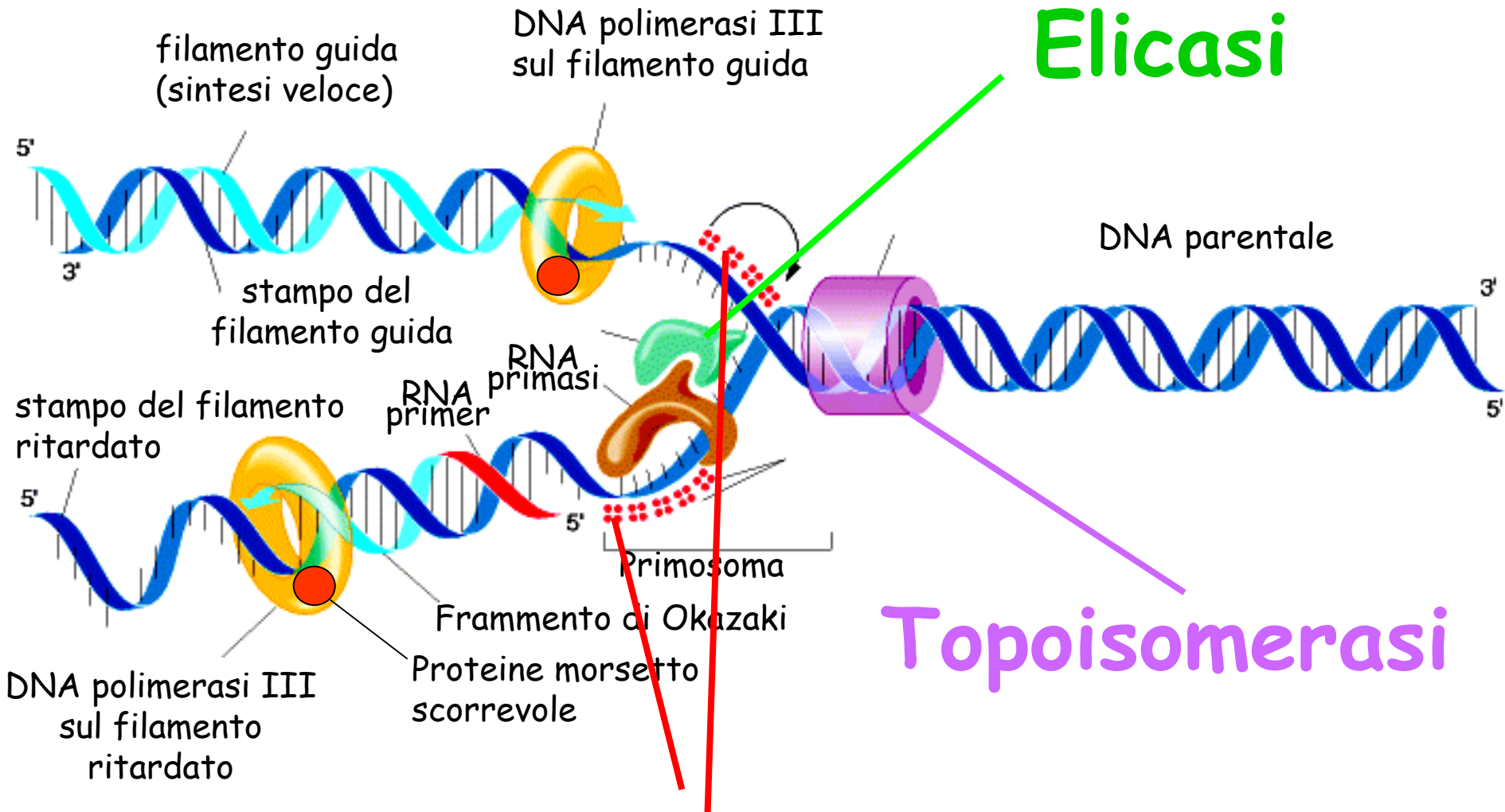


La replicazione del DNA

1. Introduzione
2. Modelli ed esperimenti
3. Replicazione nei procarioti
4. Complesso enzimatico
- 5. Svolgimento del DNA**
6. Forcella replicativa
7. Primasi e innesco
8. Replicazione negli eucarioti
9. Telomerasi
10. Riparazione



Meccanismo di replicazione del DNA



Proteine che legano il DNA a singolo filamento

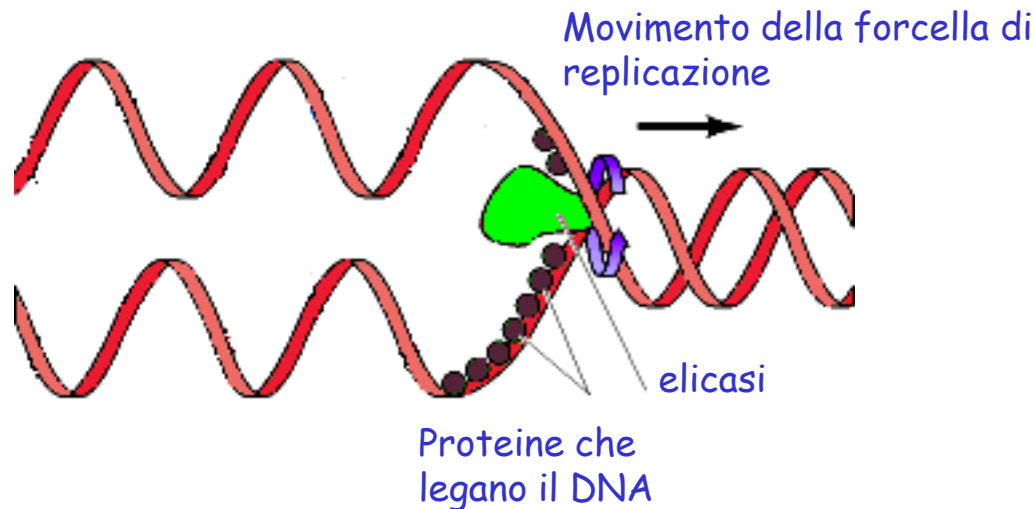
Svolgimento del DNA: le elicasi

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.

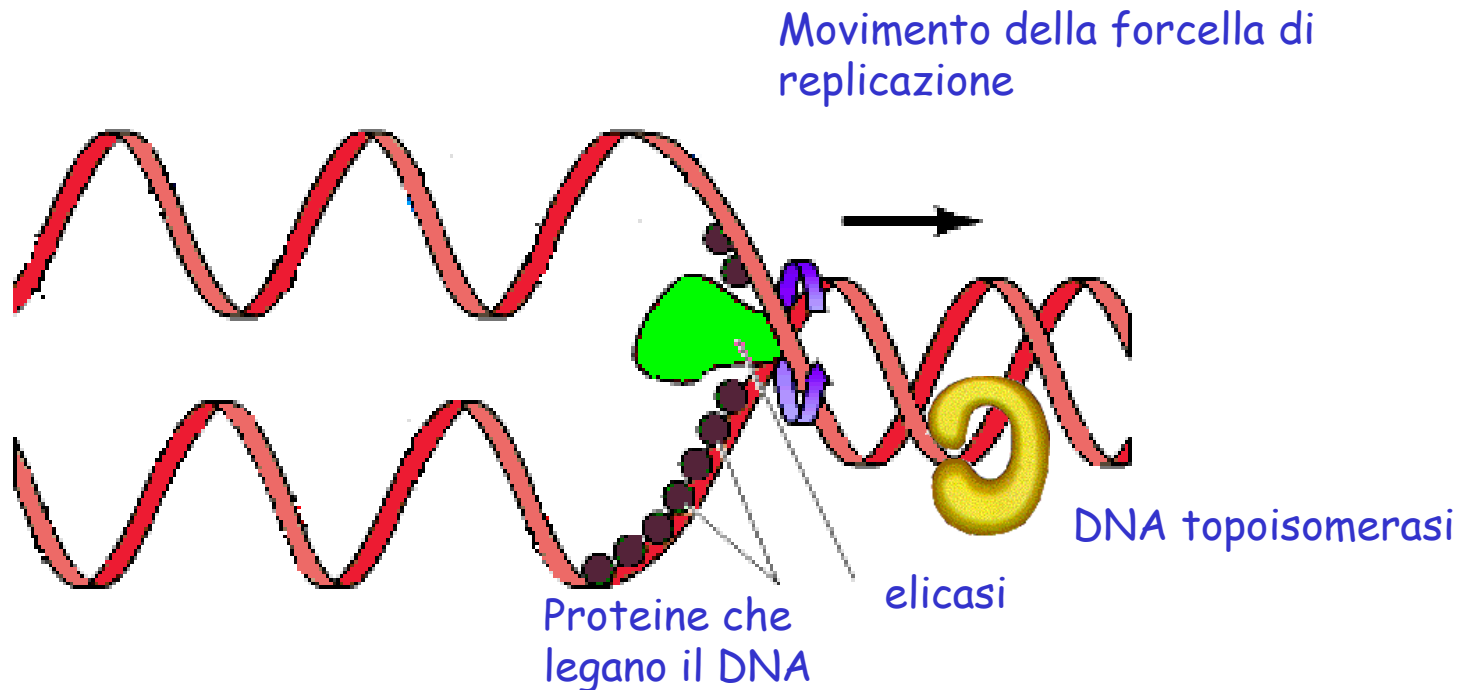


I filamenti nucleotidici separati vengono stabilizzati dalle **proteine che legano il DNA a singolo filamento**

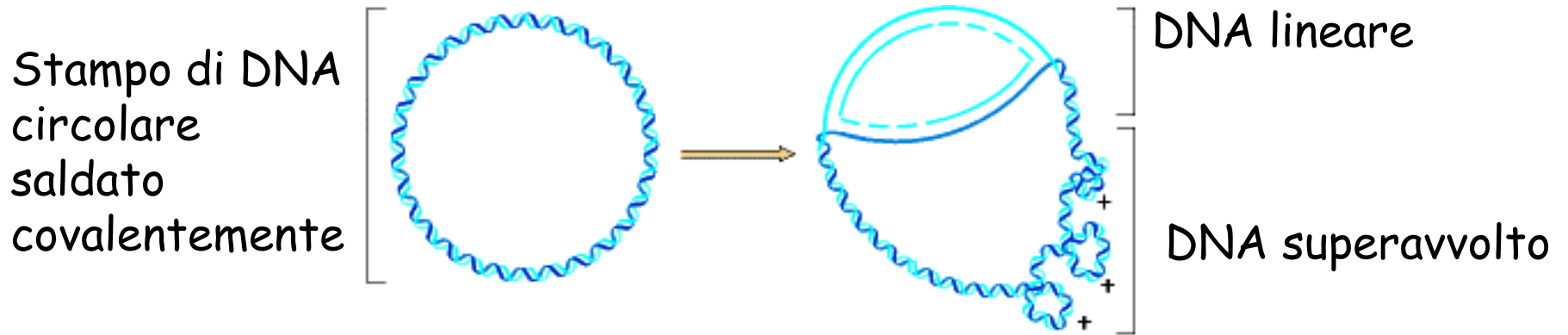
Svolgimento del DNA: le topoisomerasi

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

Questo problema è risolto dalle **topoisomerasi**, enzimi che catalizzano la rottura e la riunione reversibili dei filamenti di DNA



Le TOPOISOMERASI: DNA girasi



Esistono 2 tipi di topoisomerasi:

Topoisomerasi di tipo I:

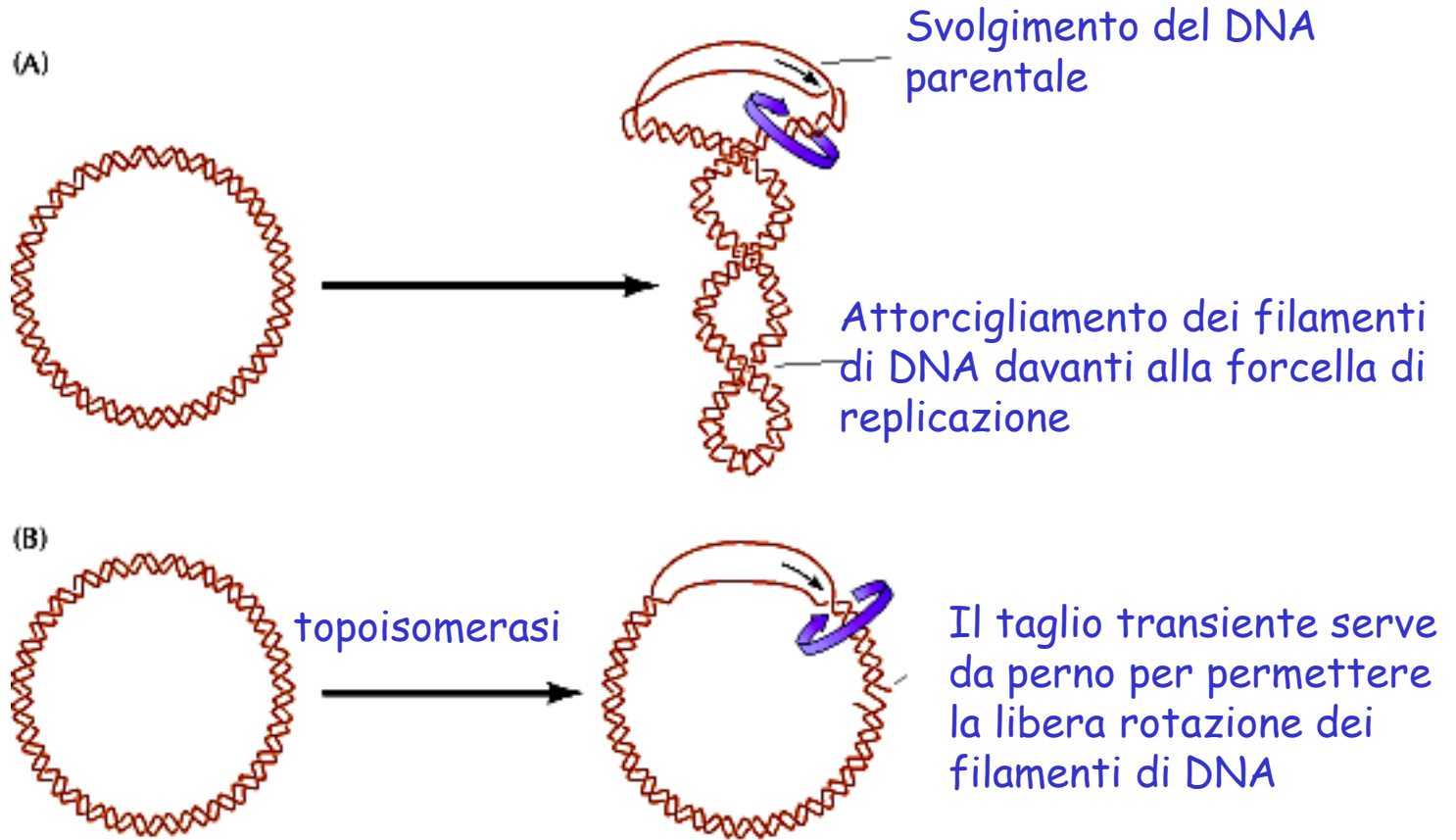
tagliano
solo un filamento di DNA

Topoisomerasi di tipo II:

tagliano simultaneamente
entrambi i filamenti di DNA

Svolgimento del DNA: le topoisomerasi

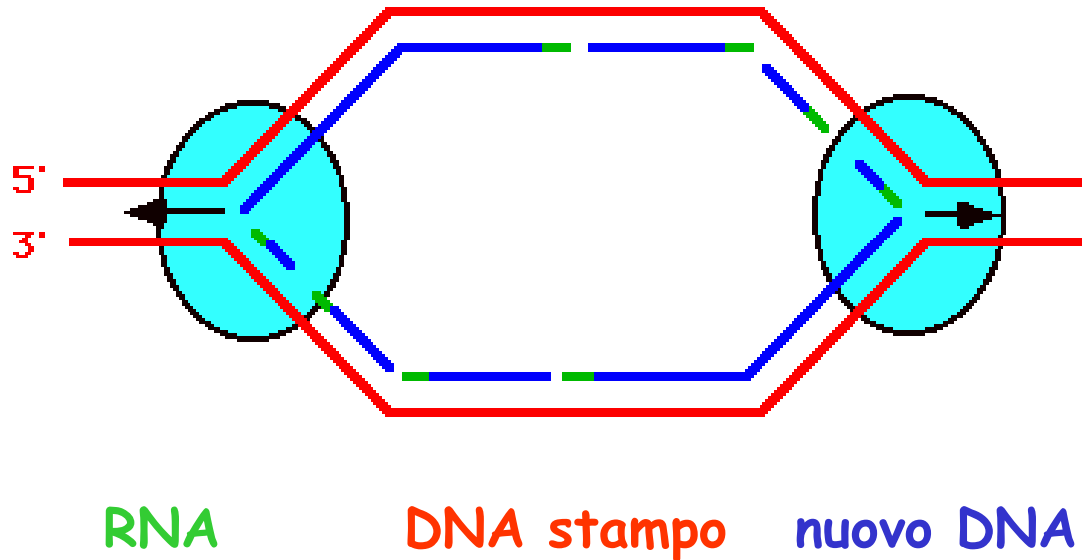
I tagli introdotti dalle topoisomerasi servono da **perni** che permettono ai 2 filamenti del DNA stampo di **ruotare liberamente** l'uno intorno all'altro in modo tale che la replicazione proceda **senza arrotolare** il DNA davanti alla forcella



Le topoisomerasi II sono necessarie anche per dipanare molecole di DNA circolare **appena replicate** che si intrecciano

Forcella di replicazione

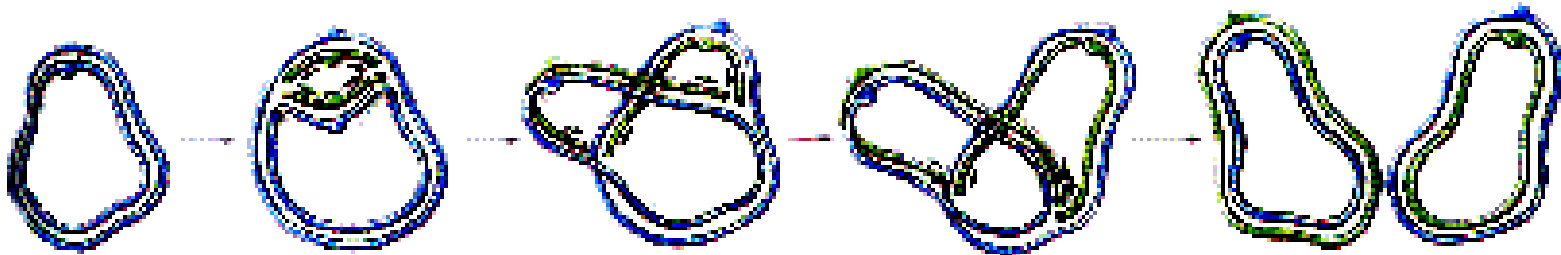
Replicazione Bidirezionale



Sul DNA che si replica si distinguono delle **biforcazioni a Y** dette **forcelle di replicazione**

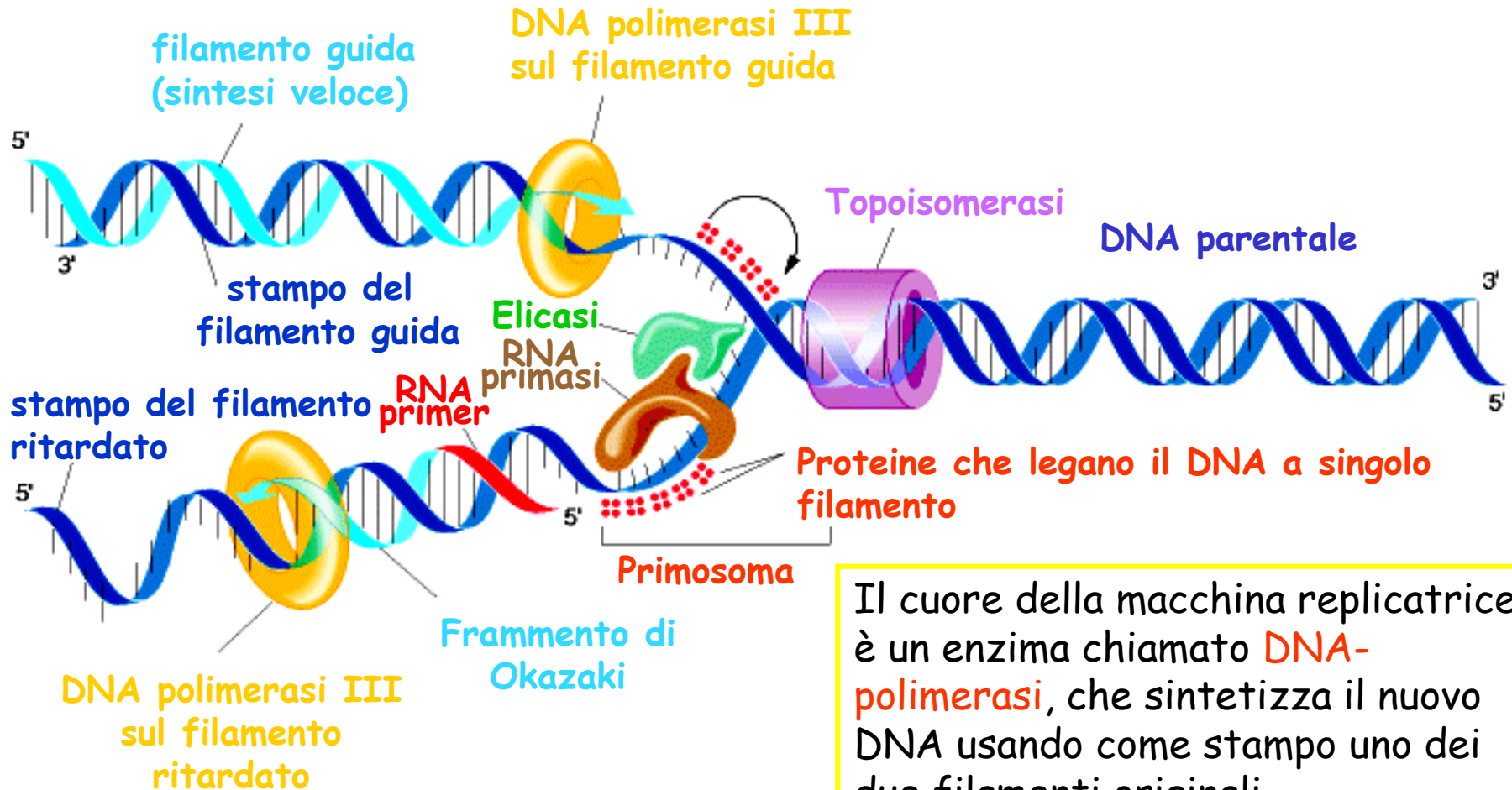
In questi punti la macchina replicatrice si sta muovendo lungo il DNA, aprendo i due filamenti della doppia elica e utilizzando ciascun filamento parentale come stampo per formare un nuovo filamento figlio

Replicazione bidirezionale: ad ogni origine di replicazione si formano due forcelle replicative che scorrono in direzioni opposte rispetto all'origine aprendo man mano il DNA



Meccanismo di replicazione del DNA

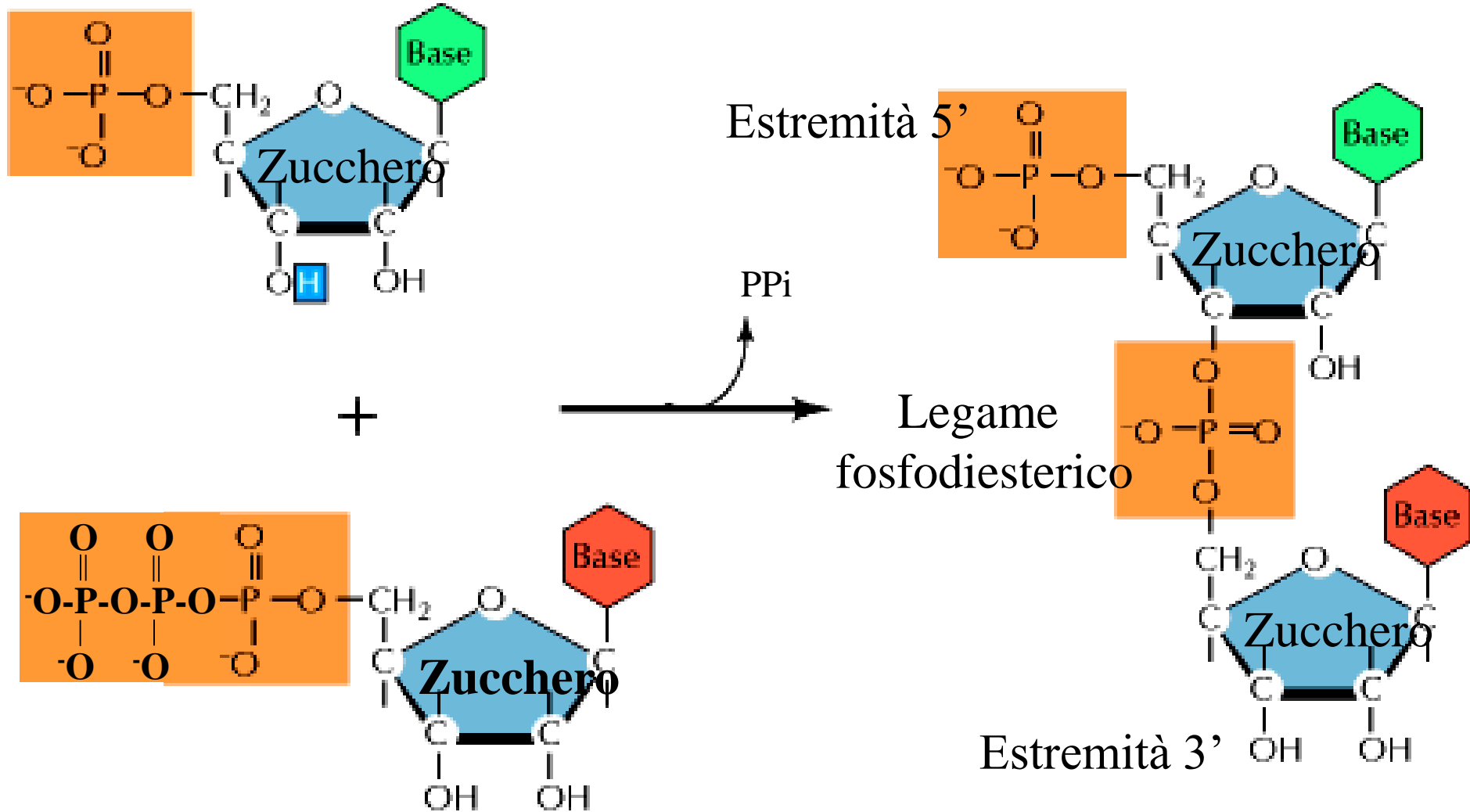
Questo compito titanico viene espletato da un aggregato di proteine che insieme formano una **macchina replicatrice**



Il cuore della macchina replicatrice è un enzima chiamato **DNA-polimerasi**, che sintetizza il nuovo DNA usando come stampo uno dei due filamenti originali

Una volta legata a una origine di replicazione la proteina iniziatrice comincia ad aprire la doppia elica, attirando un altro gruppo di proteine che costituiscono il **complesso enzimatico** deputato alla replicazione del DNA

Reazione catalizzata dalla polimerasi



Reazione di allungamento della catena di DNA catalizzata dalla polimerasi

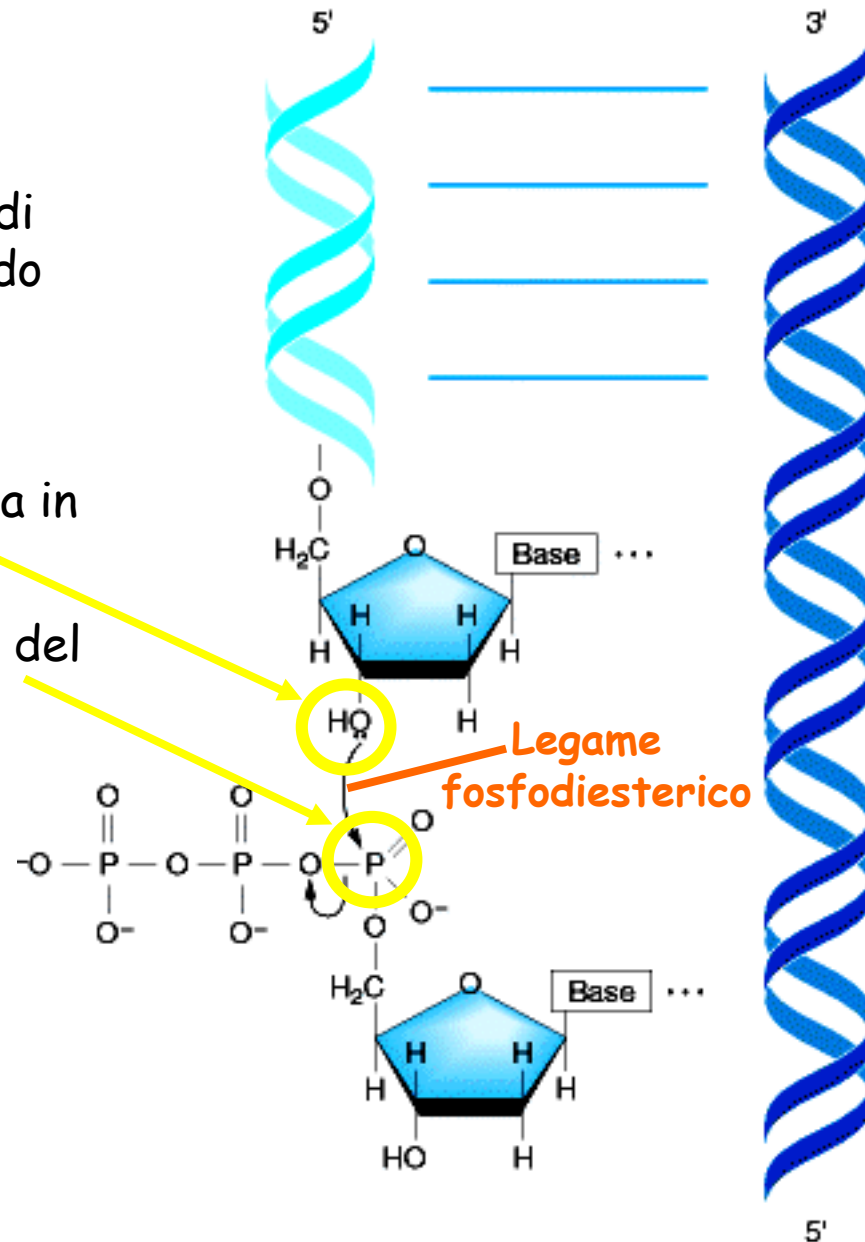
La DNA polimerasi catalizza l'aggiunta di nucleotidi

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

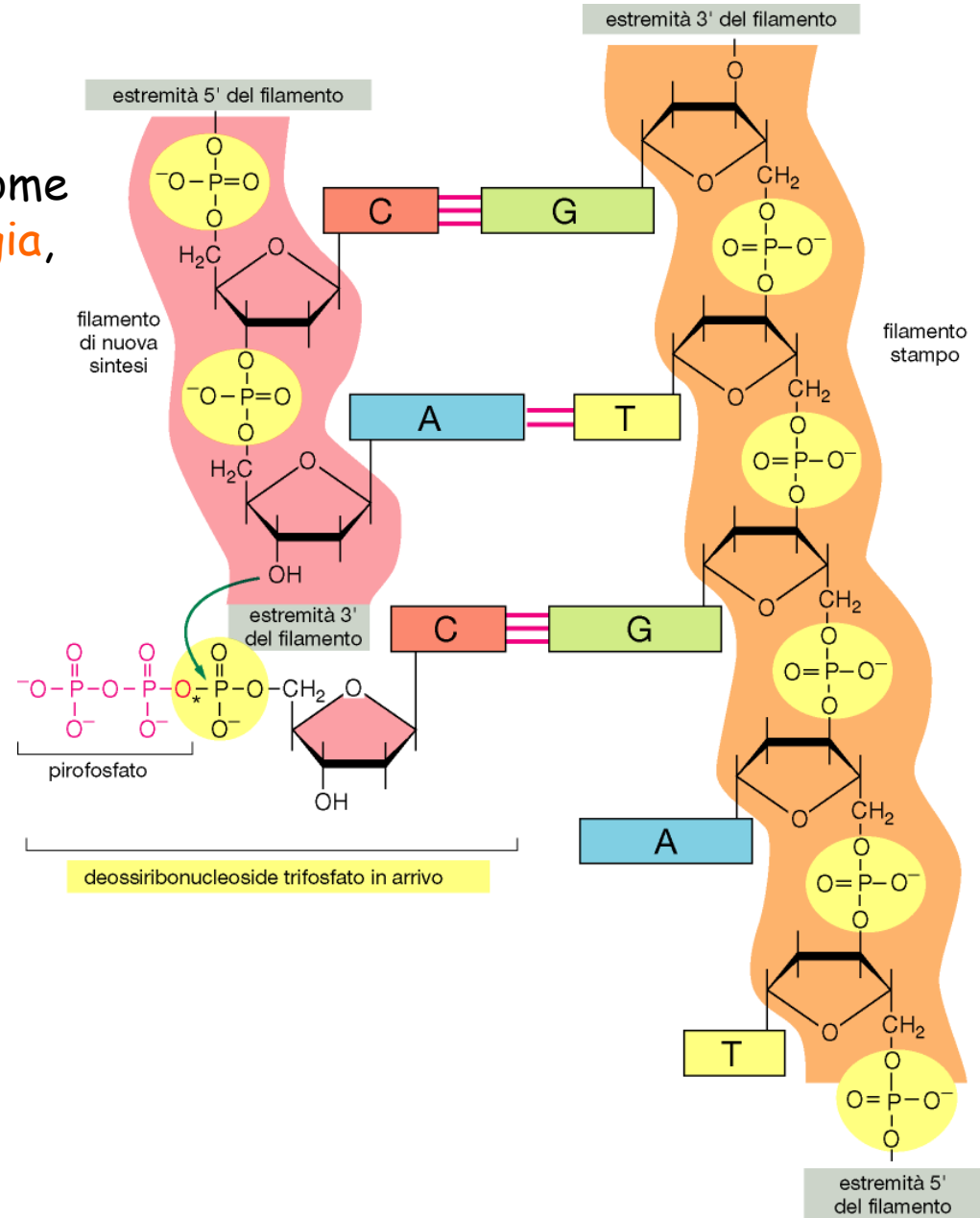
il gruppo fosfato legato al C5' del nucleotide aggiuntivo



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

Reazione di allungamento della catena di DNA catalizzata dalla polimerasi

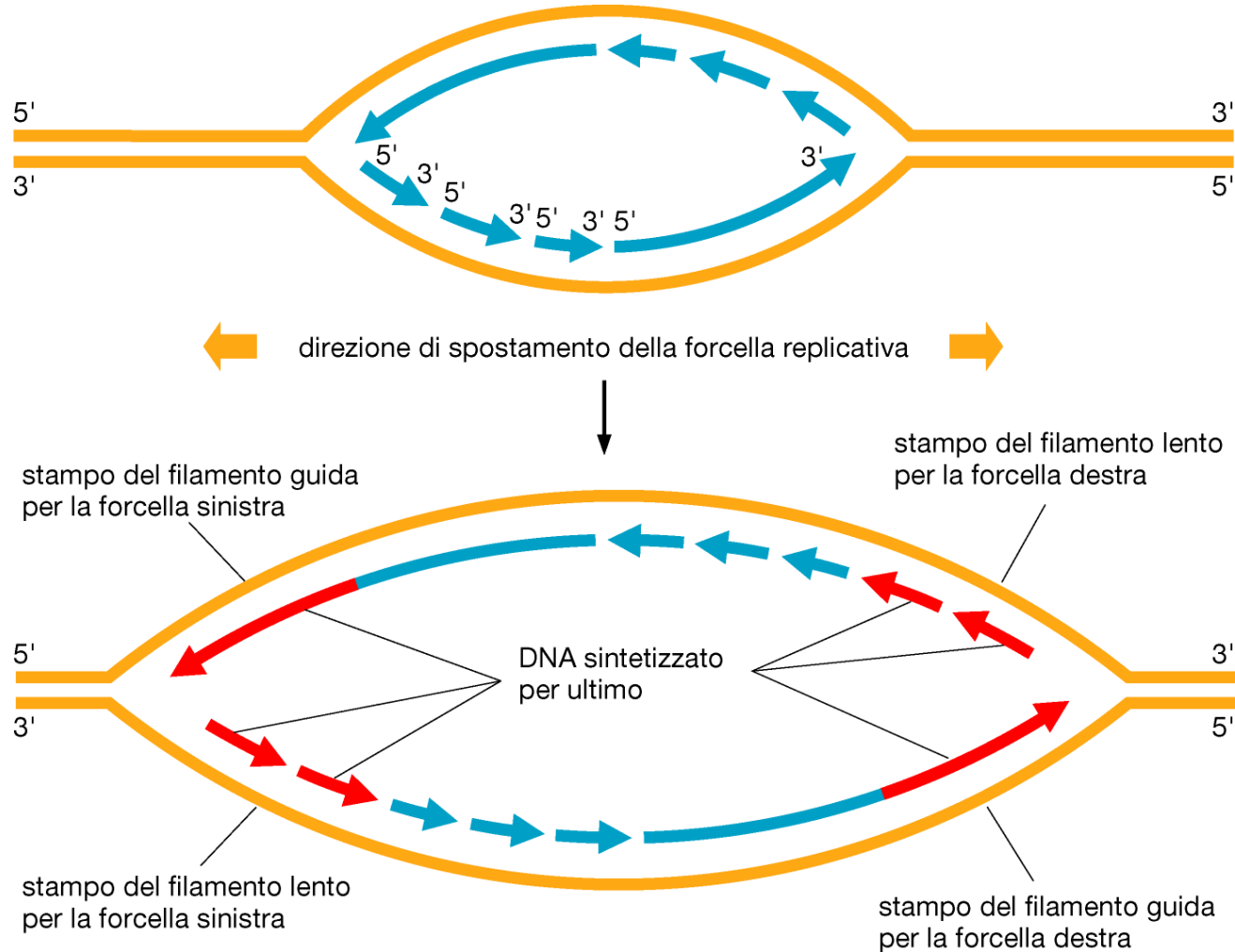
I nucleotidi entrano inizialmente come **nucleotidi trifosfati ricchi di energia**, apportando in questo modo l'energia necessaria per la polimerizzazione. Infatti l'**idrolisi** di un legame fosfoanidride nel nucleoside trifosfato, con liberazione del pirofosfato Ppi, rende disponibile l'energia e la DNA polimerasi vi accoppia la **condensazione**, legando il monomero nucleotidico alla catena in crescita. Il pirofosfato viene idrolizzato ulteriormente a fosfato inorganico Pi, il che rende la reazione del tutto irreversibile



La forcella replicativa è asimmetrica

Il meccanismo di polimerizzazione $5' \rightarrow 3'$ pone un problema alla forcella replicativa.

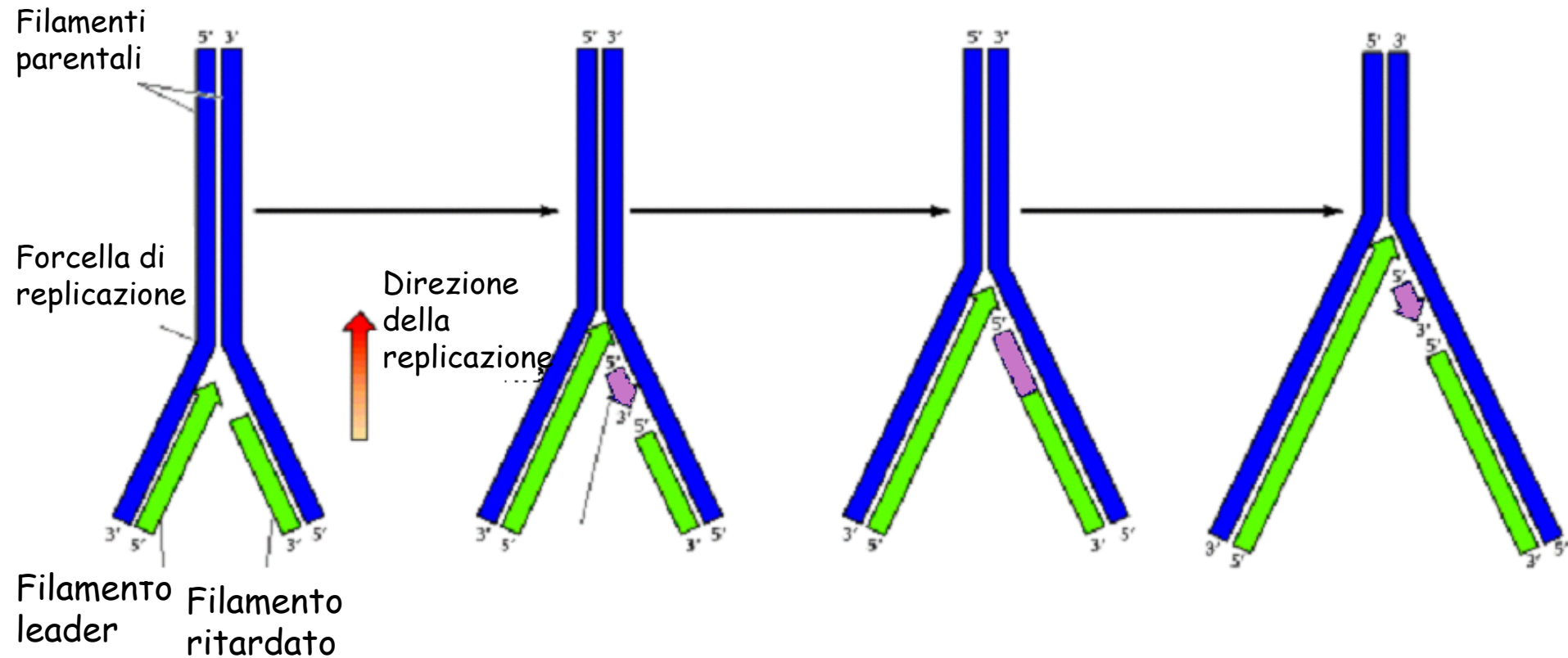
Abbiamo visto che l'ossatura Z-P di ogni filamento ha una sua **direzionalità**, dovuta al modo in cui ogni residuo di zucchero si lega al successivo, e che nella doppia elica i due filamenti decorrono con **polarità opposte**



Di conseguenza alla forcella replicativa un filamento viene sintetizzato su uno stampo che va da $3'$ a $5'$, mentre l'altro filamento si forma su uno stampo che va in verso opposto, da $5'$ a $3'$. Per questo la forcella non è simmetrica

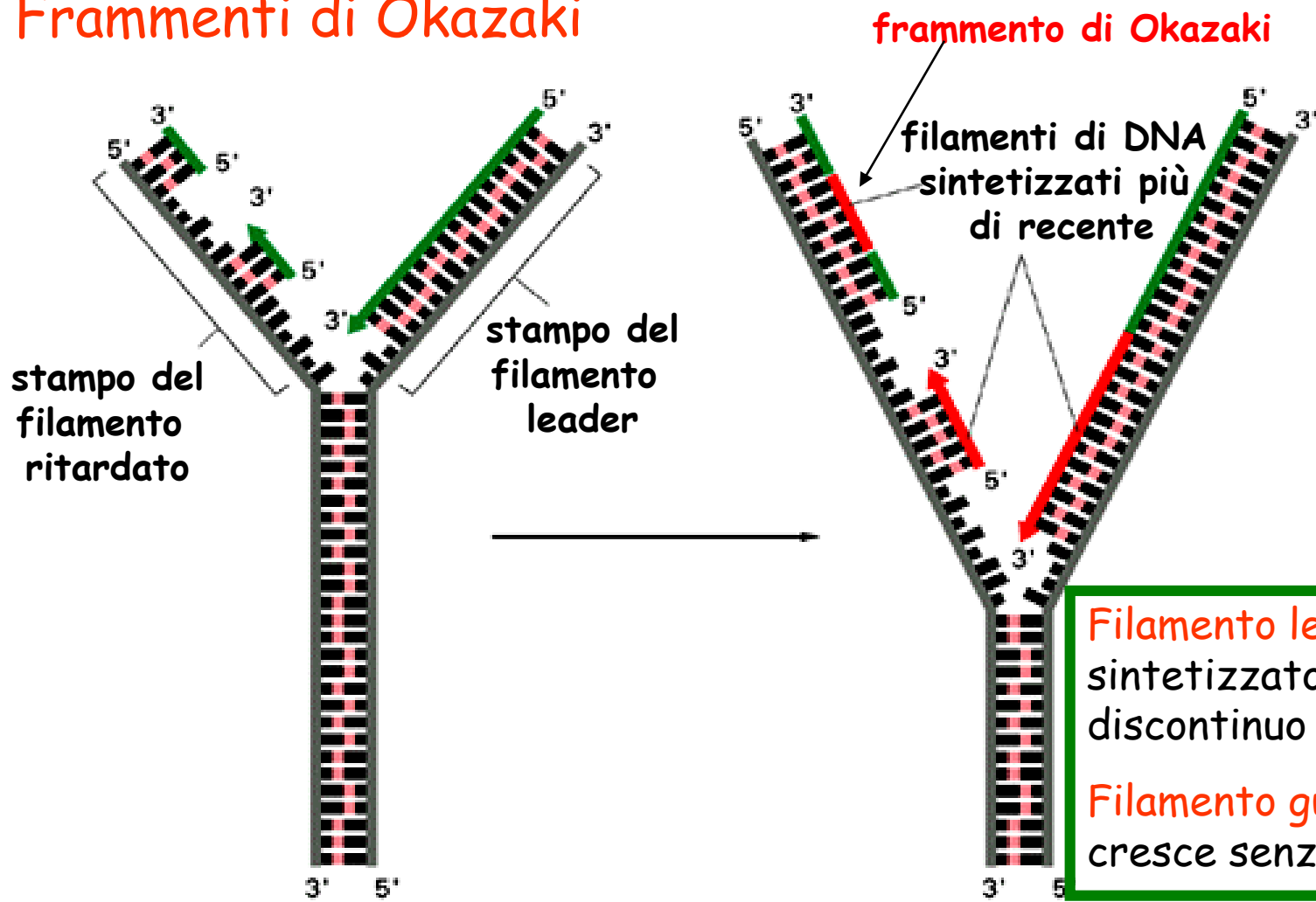
La forcella replicativa è asimmetrica

Ma un filamento di DNA può essere sintetizzato **sempre e solo** in direzione **5'-3'** e mai da 3' a 5'. Il nucleotide aggiuntivo può essere aggiunto **solamente all'estremità 3'**, mai all'estremità 5'!



Questo risulta semplice per uno dei due filamenti, ma l'altro sembra debba crescere nella direzione opposta!

Frammenti di Okazaki



In realtà 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

La forcella replicativa è asimmetrica

L'apparato replicativo si muove sempre e solo nella direzione di apertura della forcella.

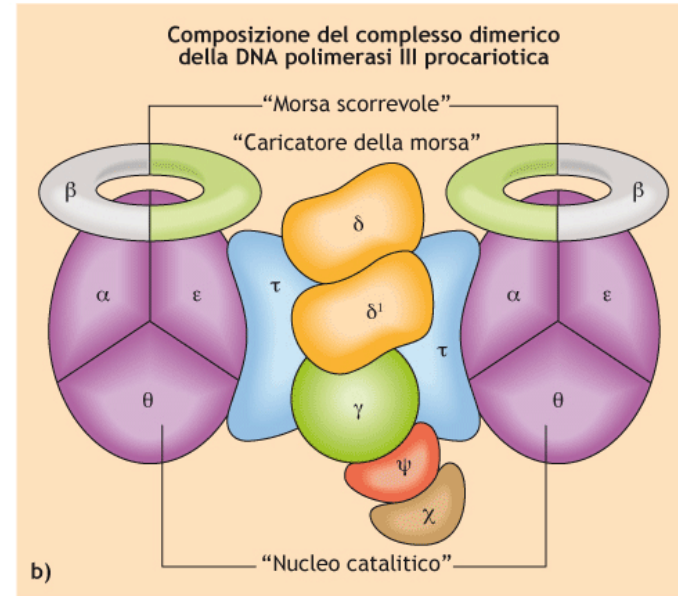
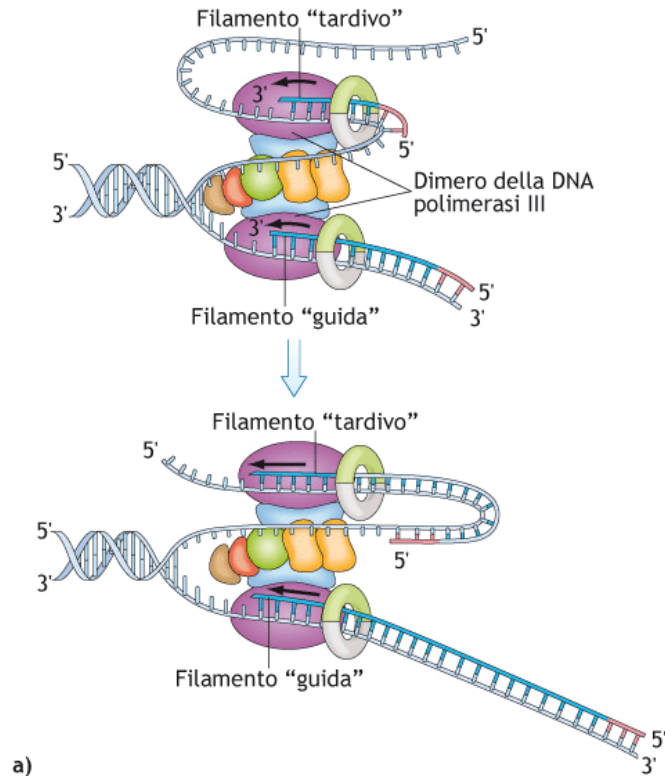


Figura 4.12 (a) Dimerizzazione della DNA polimerasi III procariontica. Nei procarionti la DNA polimerasi III agisce come dimerico e, attraverso un ripiegamento del filamento che funge da stampo per la sintesi del filamento "tardivo", i due filamenti neosintetizzati vengono polimerizzati nella stessa direzione. **(b)** Il complesso così organizzato sintetizza contemporaneamente il filamento guida e quello tardivo.

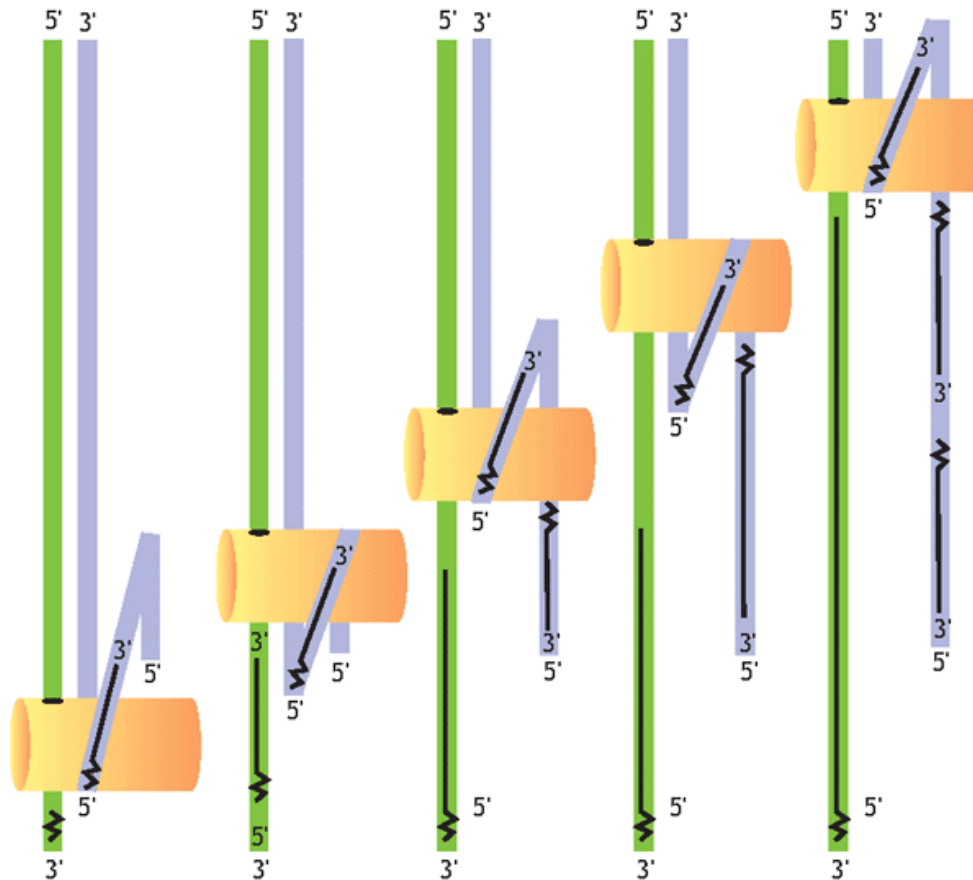


G. De Leo, S. Fasano, E. Ginelli
Biologia e Genetica III Ed.
Edises

Si ipotizza che il **filamento ritardato formi un ansa**, in questo modo la DNA polimerasi III si muove nella stessa direzione e polimerizza i nuovi filamenti su entrambi gli stampi in direzione 5'P-3'OH

La forcella replicativa è asimmetrica

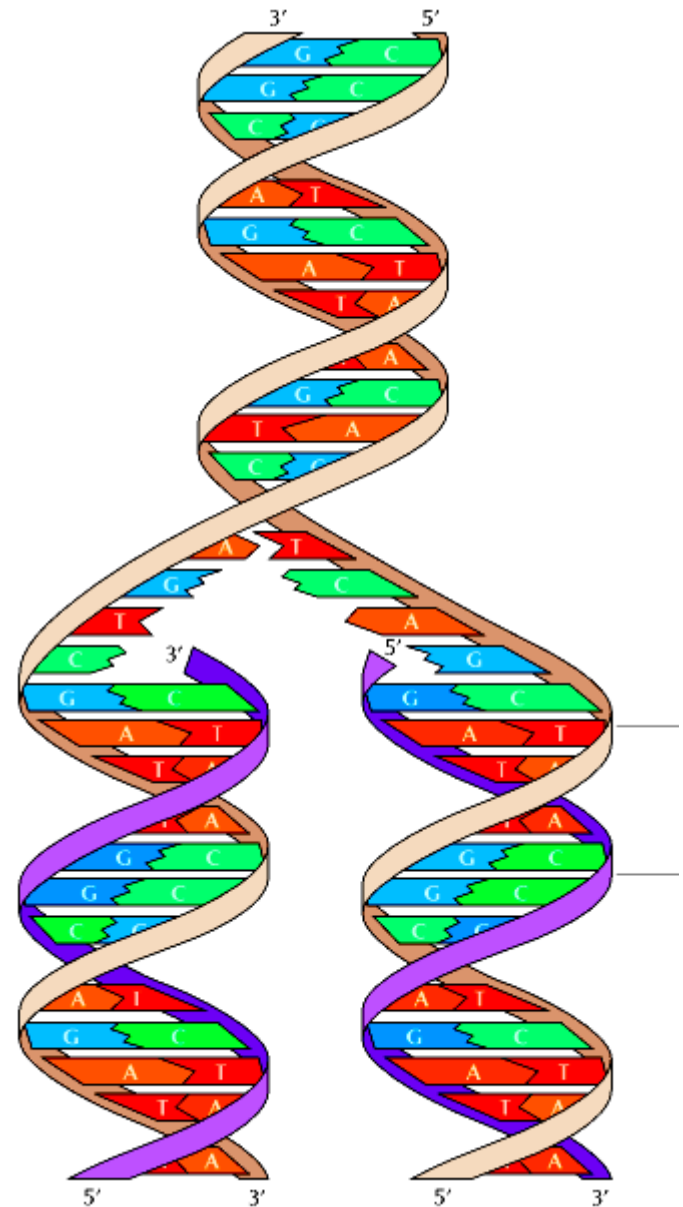
L'apparato replicativo si muove sempre e solo nella direzione di apertura della forcella.



Si ipotizza che il **filamento ritardato formi un ansa**, in questo modo la DNA polimerasi III si muove nella stessa direzione e polimerizza i nuovi filamenti su entrambi gli stampi in direzione 5'P-3'OH

La replicazione del DNA

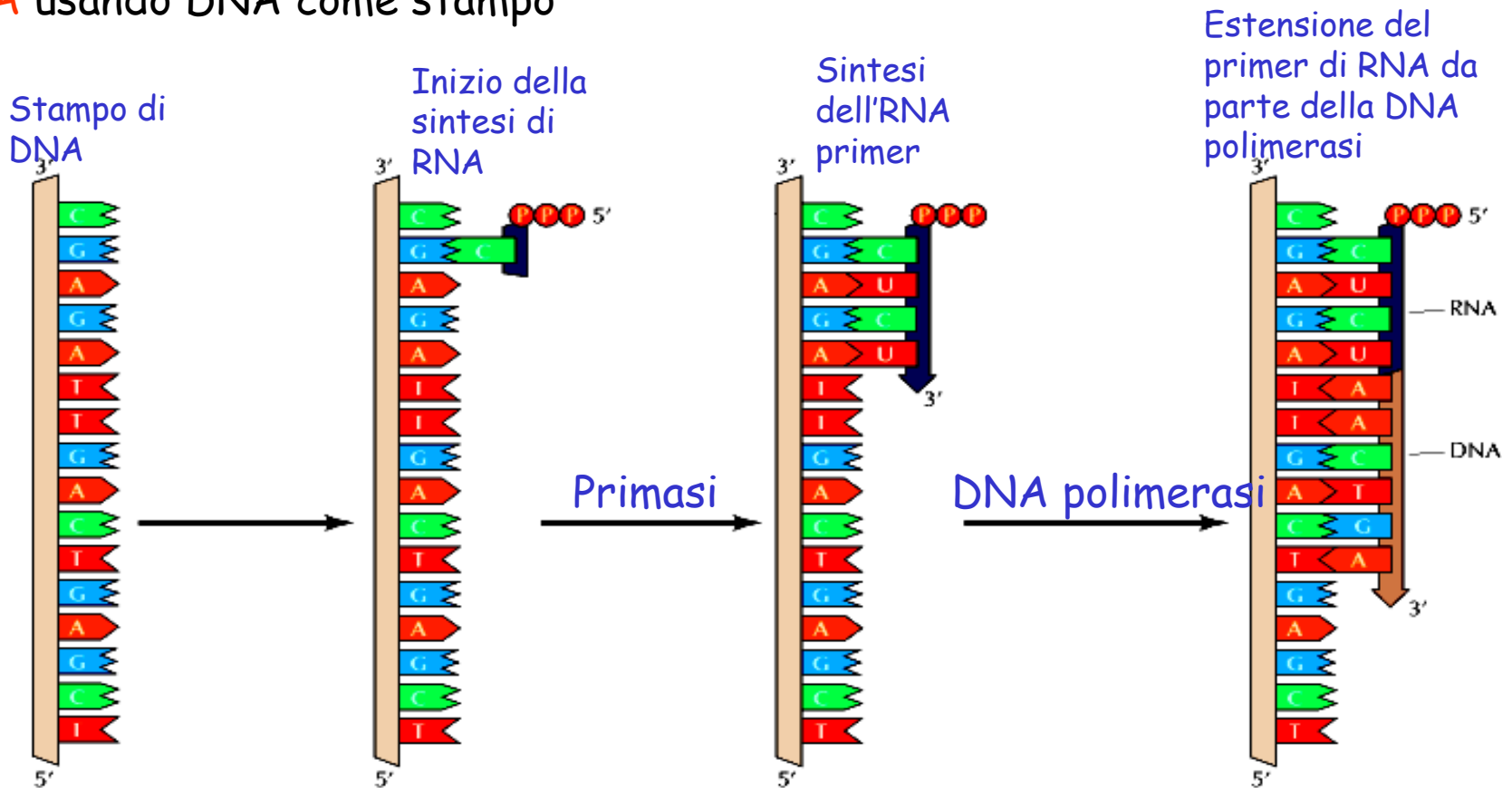
1. Introduzione
2. Modelli ed esperimenti
3. Replicazione nei procarioti
4. Complesso enzimatico
5. Svolgimento del DNA
6. Forcella replicativa
- 7. Primasi e innesco**
8. Replicazione negli eucarioti
9. Telomerasi
10. Riparazione



La DNA primasi

La DNA polimerasi procede sommando nucleotidi solo ad altri nucleotidi già appaiati in un doppio filamento ed è **incapace di dare inizio** a un filamento di DNA totalmente nuovo

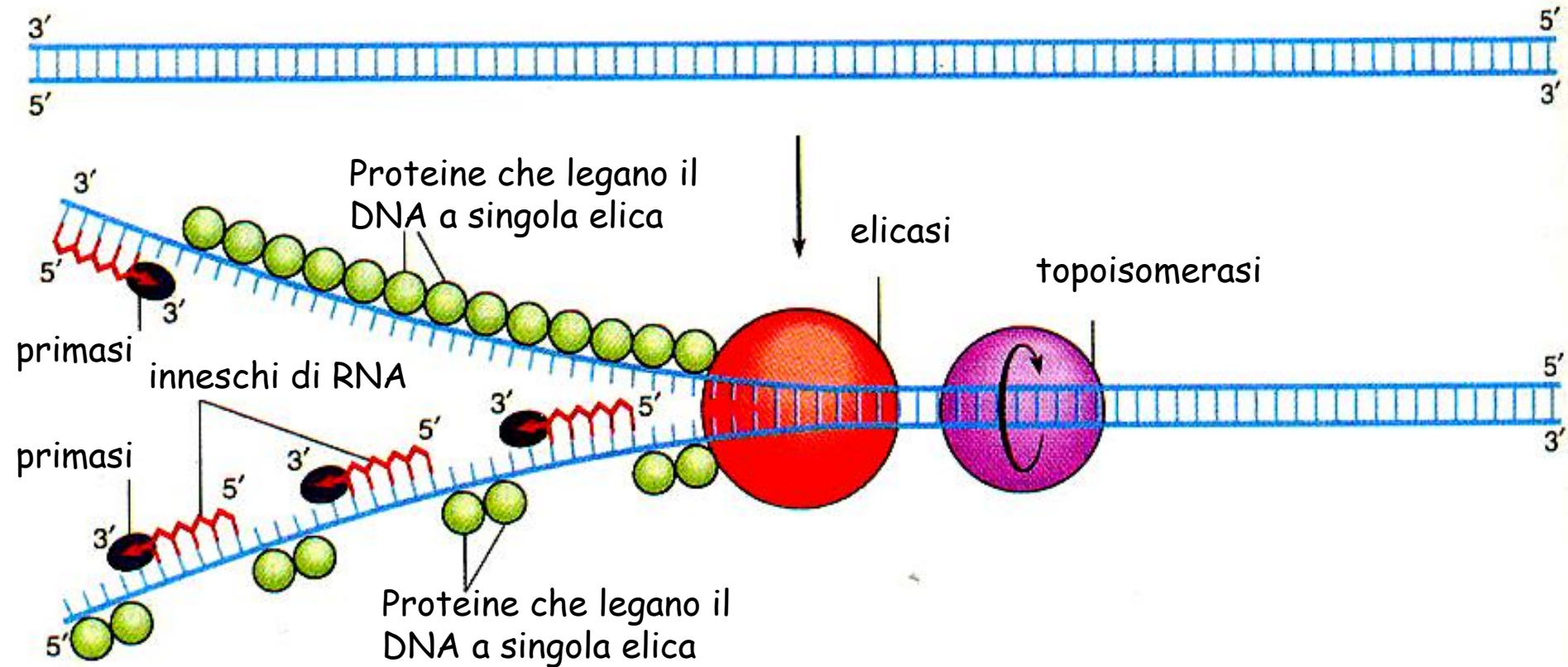
Per questo interviene un altro enzima chiamato **PRIMASI** che è in grado di dare inizio ad una catena polinucleotidica nuova. La Primasi sintetizza brevi tratti (10 nt) di **RNA** usando DNA come stampo



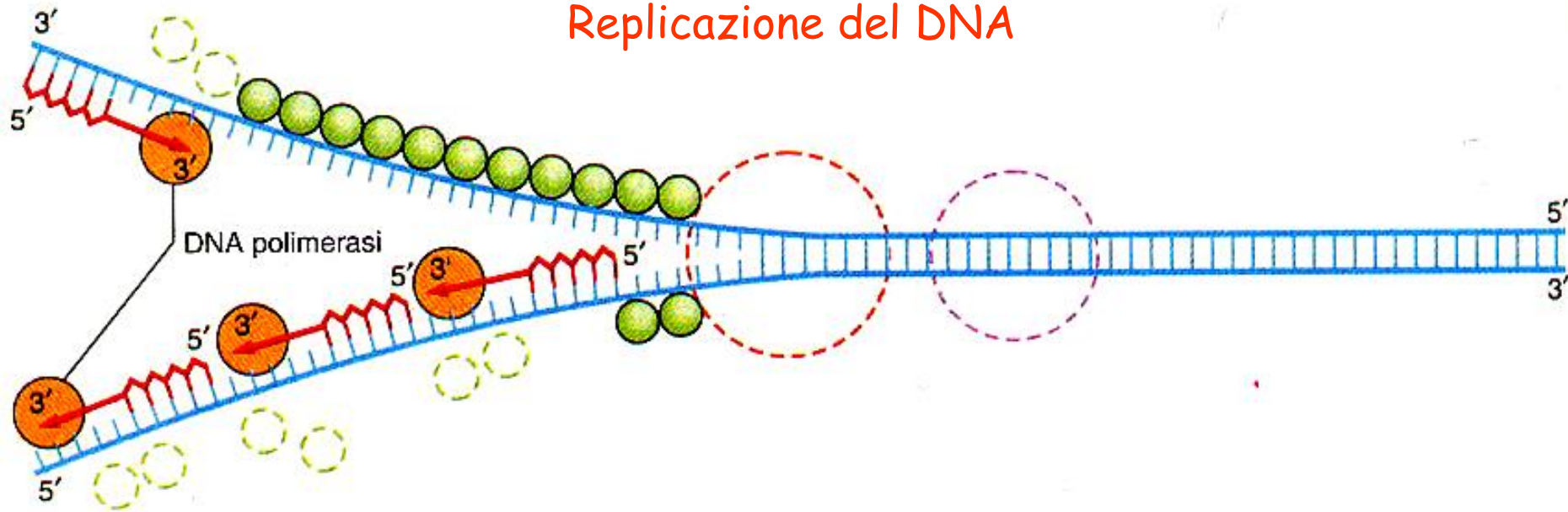
Tali tratti di RNA fanno da **innesco o primer** per la sintesi del DNA

Replicazione del DNA

La DNA primasi



Replicazione del DNA



Filamento guida: l'innesco serve solo per cominciare la sintesi all'origine di replicazione

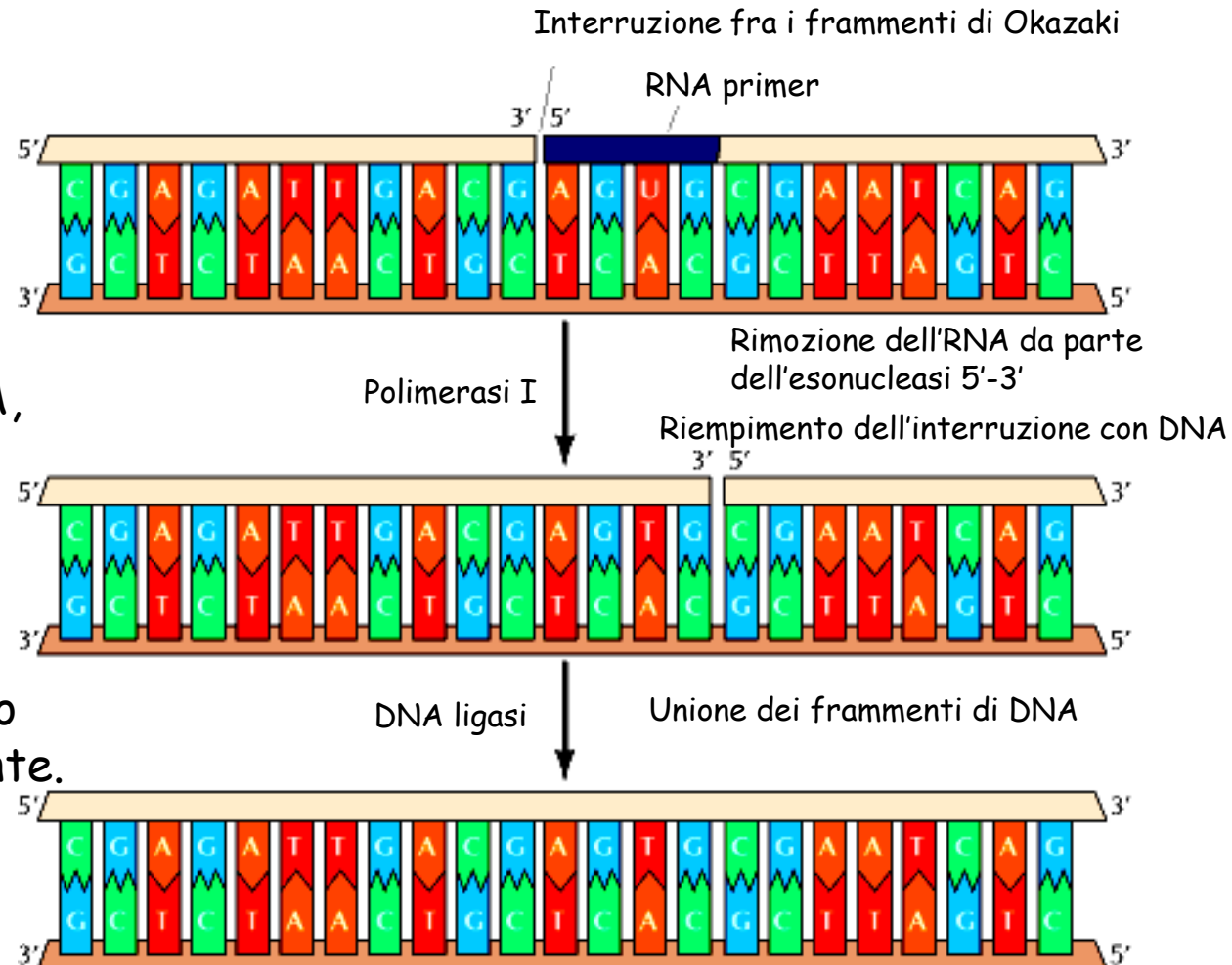
Filamento lento: la sintesi di DNA è discontinua perciò sono continuamente necessari nuovi inneschi

Quando alla forcella replicativa si espone un nuovo tratto di basi libere, vengono sintetizzati **nuovi inneschi** a RNA disseminati lungo il filamento lento; la **DNA polimerasi** aggiunge un deossiribonucleotide all'estemità 3' di questo innesco, dando inizio a un filamento di DNA e **allungandolo finchè non si imbatte nell'innesco a RNA successivo**

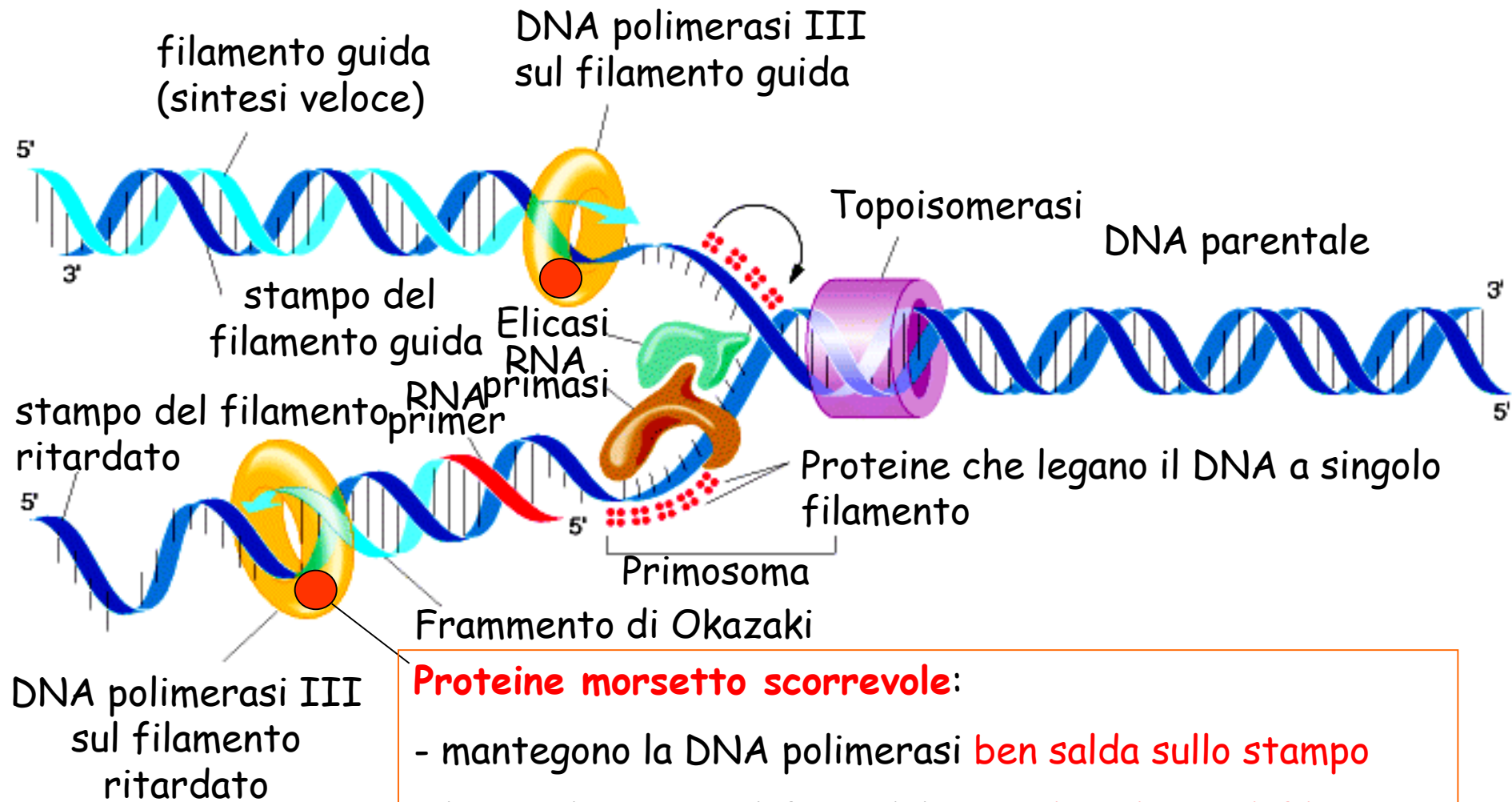
Rimozione del primer e unione dei frammenti di Okazaki

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



Complesso multienzimatico: proteine a morsetto scorrevole



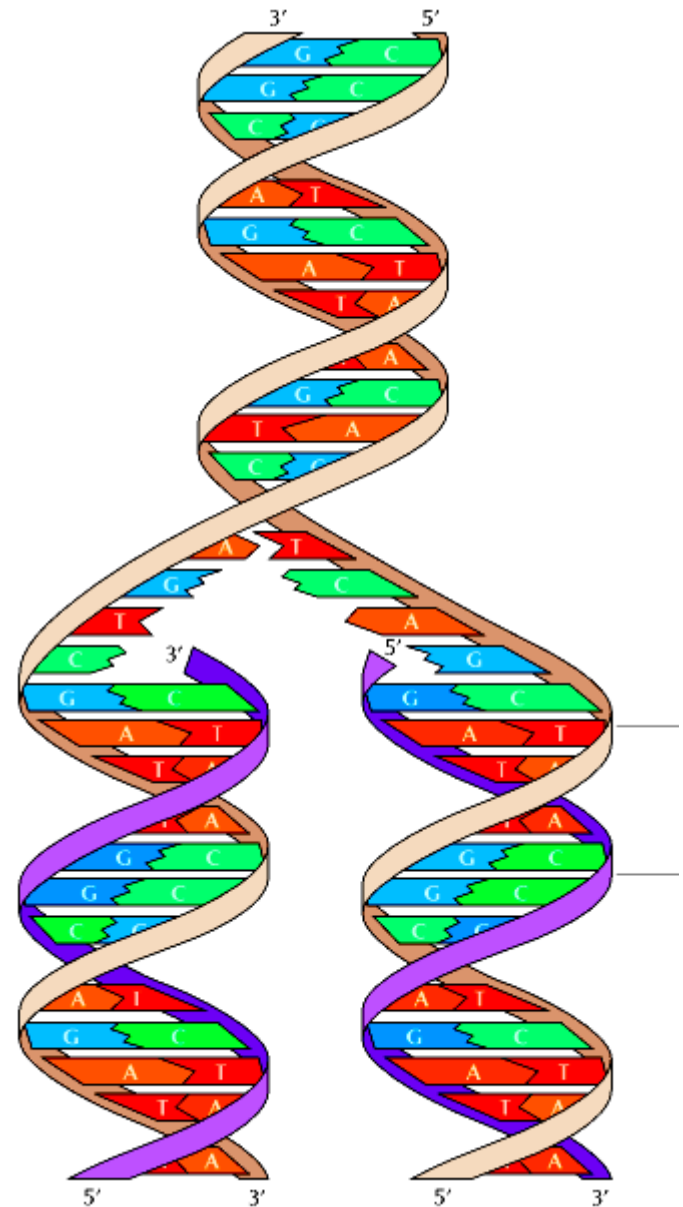
Proteine morsetto scorrevole:

- mantengono la DNA polimerasi **ben salda sullo stampo**
- legano la DNA pol facendola **scivolare lungo il filamento stampo** man mano che sintetizza il DNA

Sul filamento lento il morsetto scorrevole **sgancia** la DNA polimerasi dal filamento ogni volta che completa un frammento di Okazaki.

La replicazione del DNA

1. Introduzione
2. Modelli ed esperimenti
3. Replicazione nei procarioti
4. Complesso enzimatico
5. Svolgimento del DNA
6. Forcella replicativa
7. Primasi e innesco
8. Replicazione negli eucarioti
9. Telomerasi
10. Riparazione



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

La replicazione del DNA: DNA polimerasi

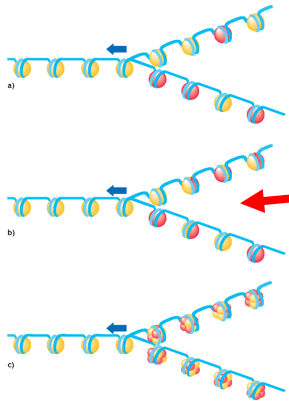
ATTIVITÀ DELLE DNA POLIMERASI	PROCARIOTI	EUCARIOTI
DNA polimerasi principale (sia filamento lento che guida)	La DNA-pol III	La DNA-pol δ
L'esonucleasi che rimuove gli inneschi ad RNA	La DNA-pol I	Esonucleasi indipendenti dalle polimerasi
La polimerasi riparativa che sostituisce l'innesco a RNA con DNA	La DNA-pol I	La DNA-pol δ
Si trova in un complesso con la primasi e con essa sintetizza i primer		La DNA-pol α

Tutte le DNA polimerasi hanno 2 proprietà fondamentali:

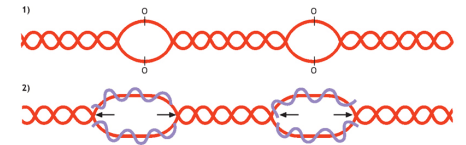
1. Sintetizzano DNA soltanto in direzione 5'-3', aggiungendo dNTP al gruppo 3'OH libero di una catena in crescita
2. Necessitano di un primer e non sono in grado di iniziare una nuova catena utilizzando solamente il filamento stampo

Replicazione negli eucarioti

I principi generali che sono alla base del processo di duplicazione del DNA sono rispettati anche per la cellula eucariotica, ma nascono alcune problematiche da risolvere:



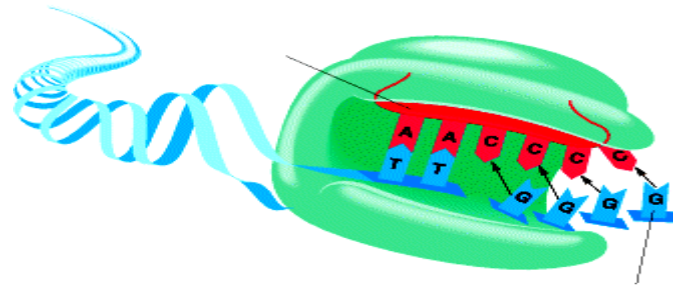
1. Dimensione dei cromosomi



2. Presenza dei nucleosomi

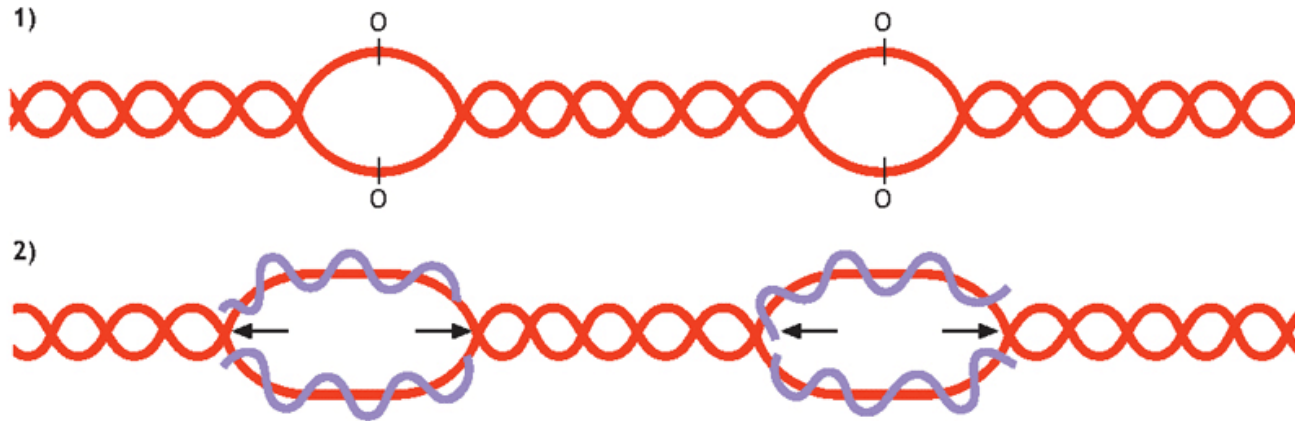


3. Telomeri



1. Dimensione dei cromosomi

I cromosomi presentano una lunghezza ragguardevole:



Cromosoma di E.coli: 2×10^6 bp

Cromosoma 1 umano: $2,5 \times 10^9$ bp

Velocità di duplicazione negli eucarioti è 10 volte inferiore che nei procarioti

Fase S: 6-8 ore

Stratagemma: l'apertura della doppia elica avviene in più punti detti **REPLICONI**, lungo il cromosoma

In ciascun replicone le forcelle di replicazione procedono allontanandosi in direzione opposta l'una dall'altra; in tal modo ogni forcella incontrerà le forcelle adiacenti

SSB: proteine che legano il ssDNA

1°Primer a RNA

Direzione forcella

Primasi/polimerasi α

2°Primer

PCNA

RF-C

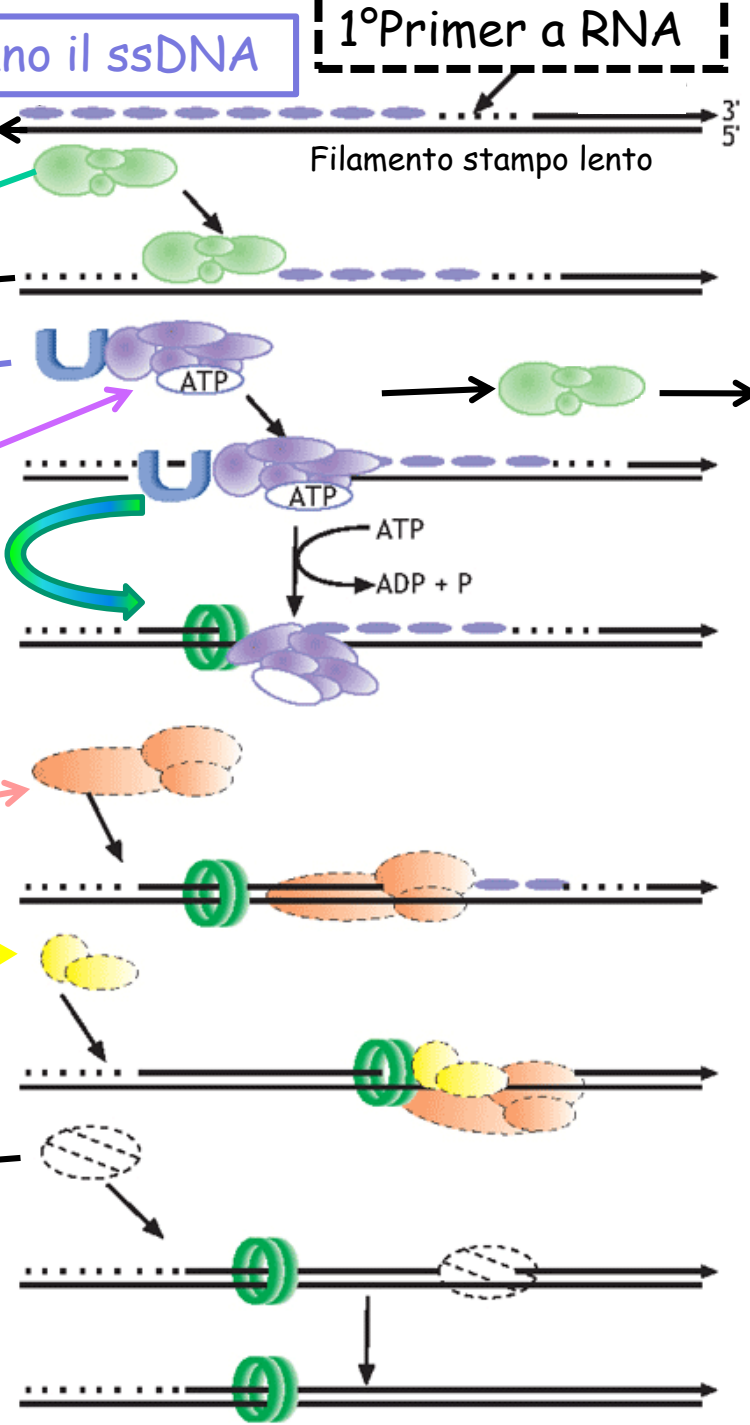
Il PCNA si assembla attorno al primer

Polimerasi δ

Fen-1
RNAasi H

DNA ligasi

4. Ligasi: salda tutti i frammenti di Okazaki



1. Inizio della replicazione: complesso primasi/polimerasi α : polimerizza l'innesco ed un piccolo tratto di DNA

2. lo sloggingamento del complesso primasi/polimerasi α e il legame con la polimerasi δ sono favoriti da: RF-C: fattore di replicazione C + PCNA: antigene nucleare di proliferazione cellulare: in un processo ATP-dipendente

3. RNAasi H: rimuove gli inneschi; FEN-1: flap endonuclease: coopera grazie alla sua attività esonucleasica 5'P-3'OH

1. Inizio della replicazione: il complesso primasi/polimerasi α : polimerizza l'innesco ed un piccolo tratto di DNA

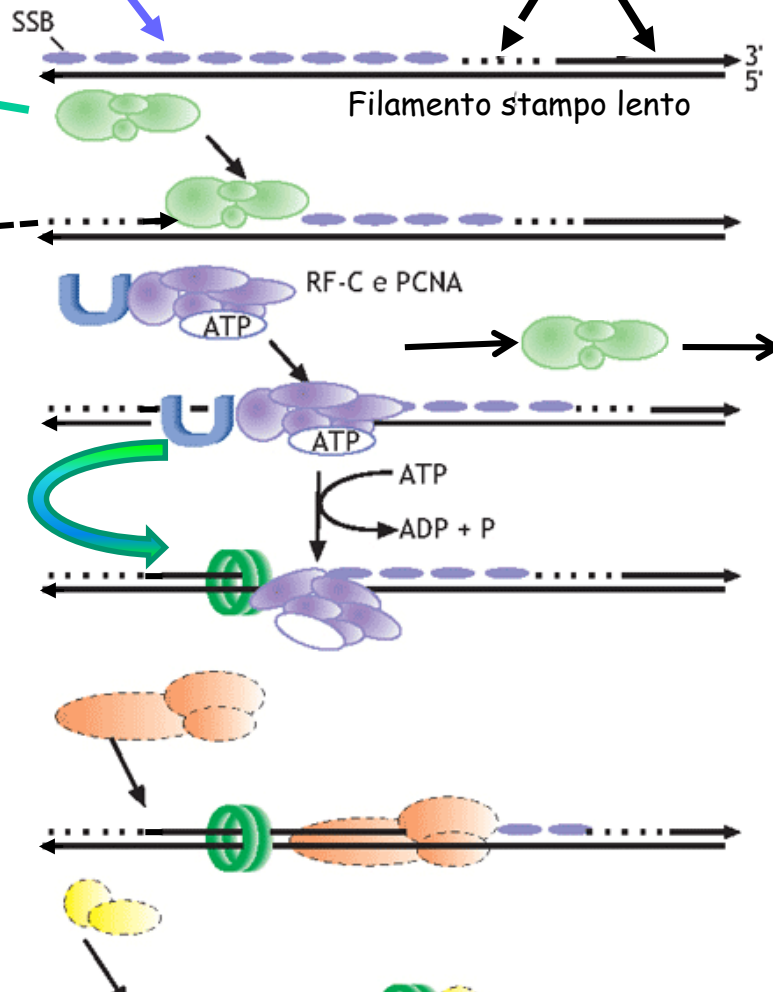
SSB: proteine che legano il ssDNA

Primasi/
polimerasi α

Primer precedente e frammento di Okazaki precedente

Direzione forcella

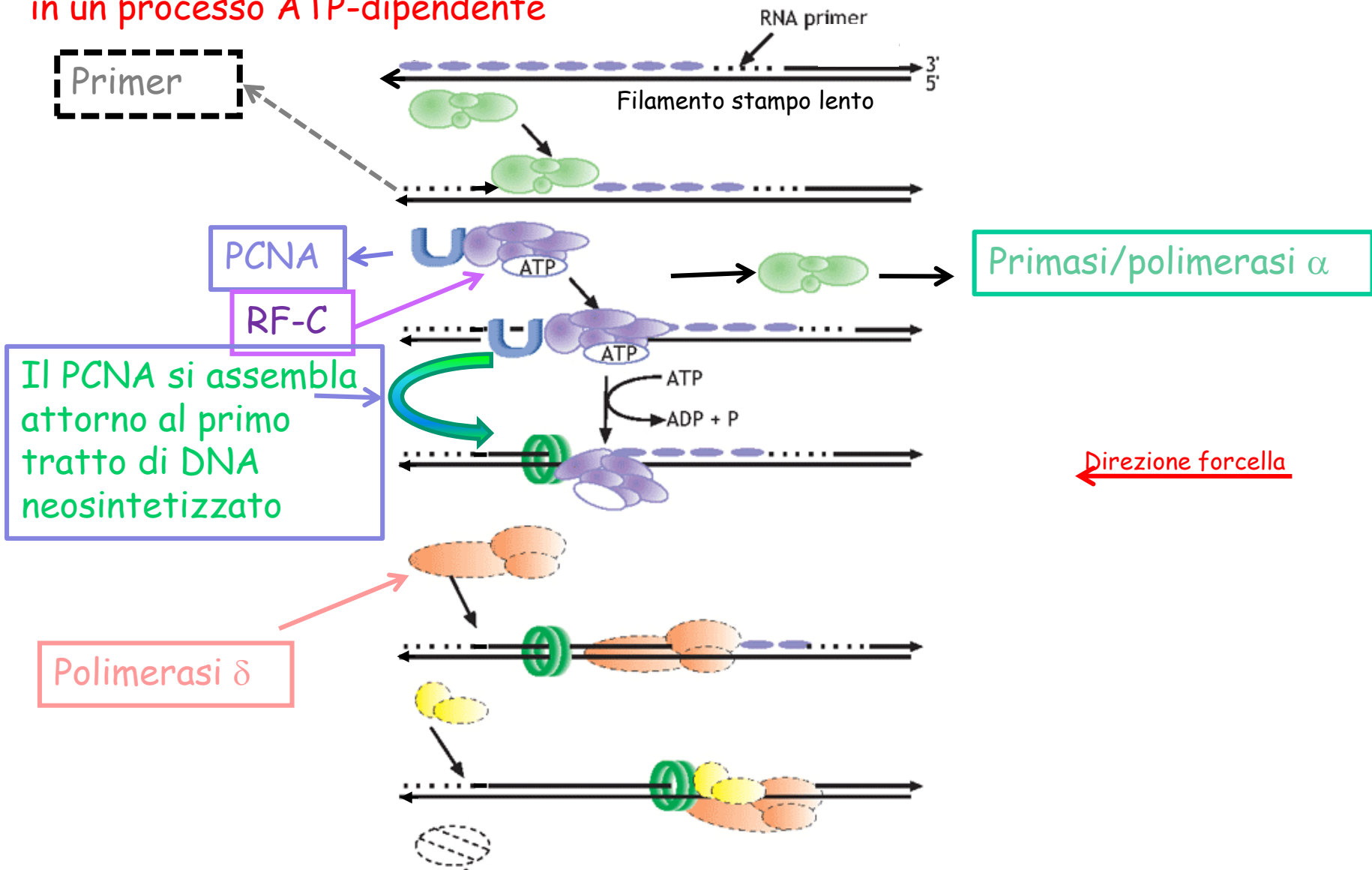
Primer

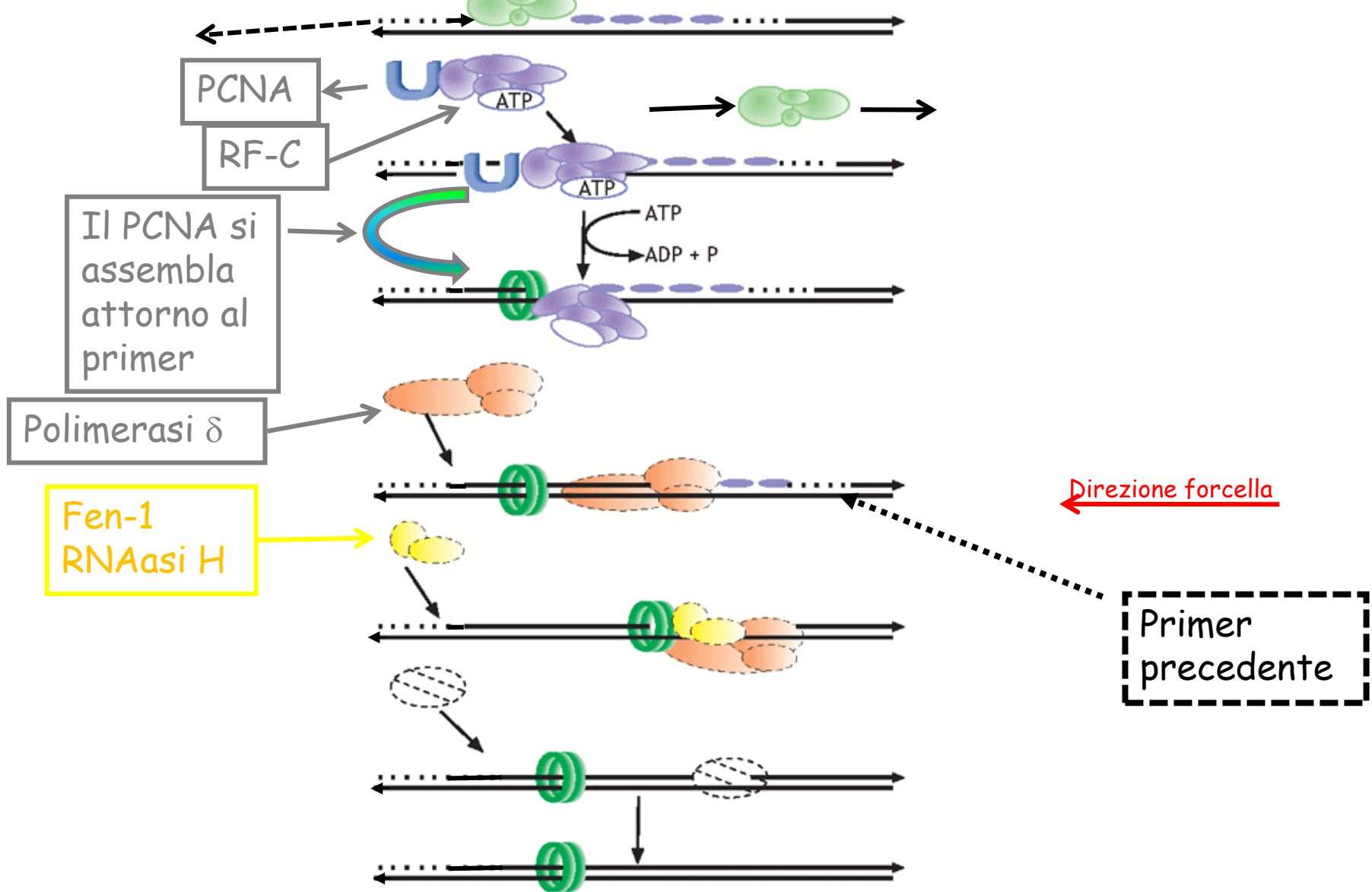


2. Lo sloggingamento del complesso primasi/polimerasi α e il legame con la polimerasi δ sono favoriti da:

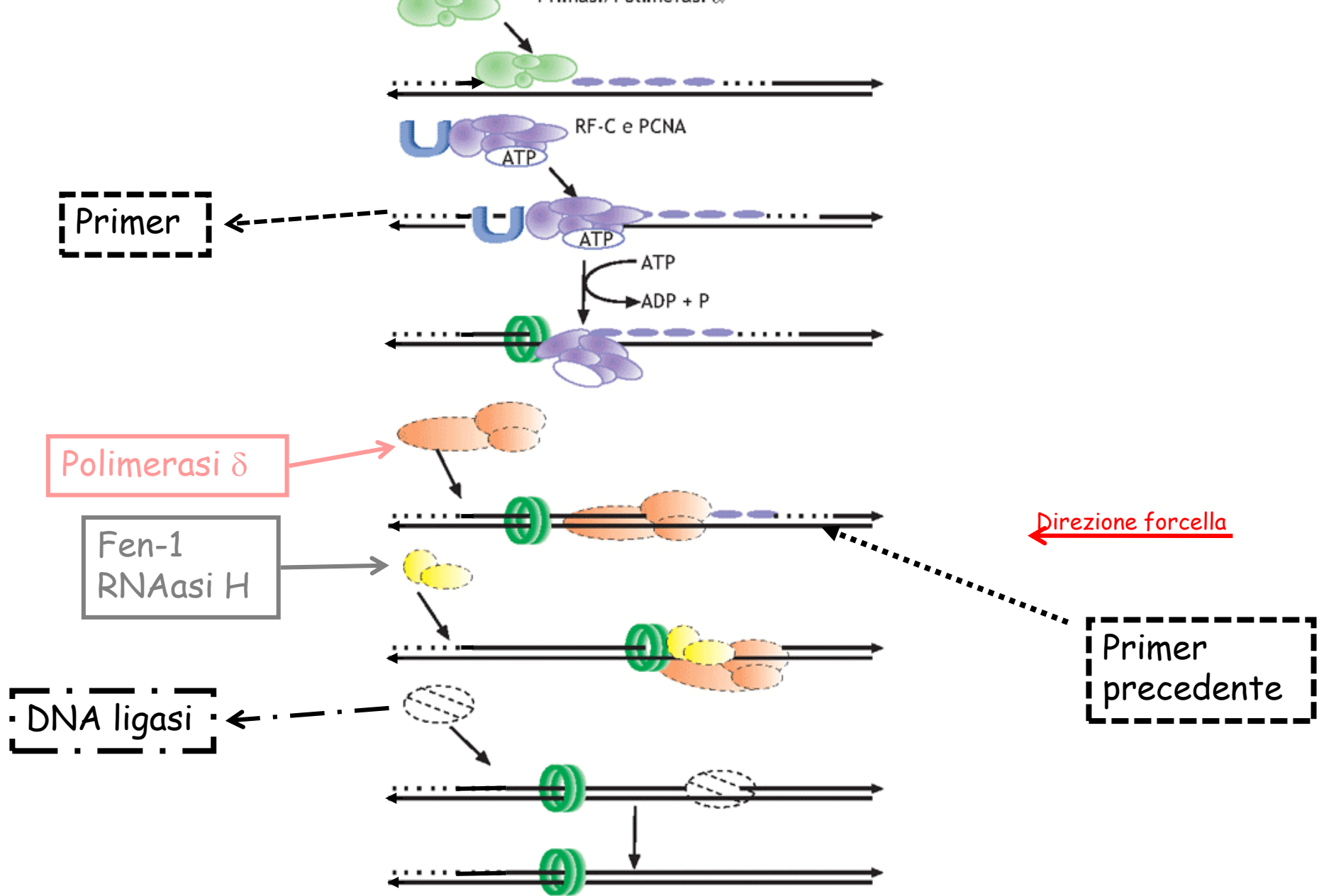
RF-C: fattore di replicazione C +

PCNA: antigene nucleare di proliferazione cellulare:
in un processo ATP-dipendente





3. RNAasi H: rimuove gli inneschi;
 FEN-1: flap endonuclease: coopera grazie alla sua attività esonucleasica
 5'P-3'OH



4. Ligasi: salda tutti i frammenti di Okazaki

2. Presenza dei nucleosomi

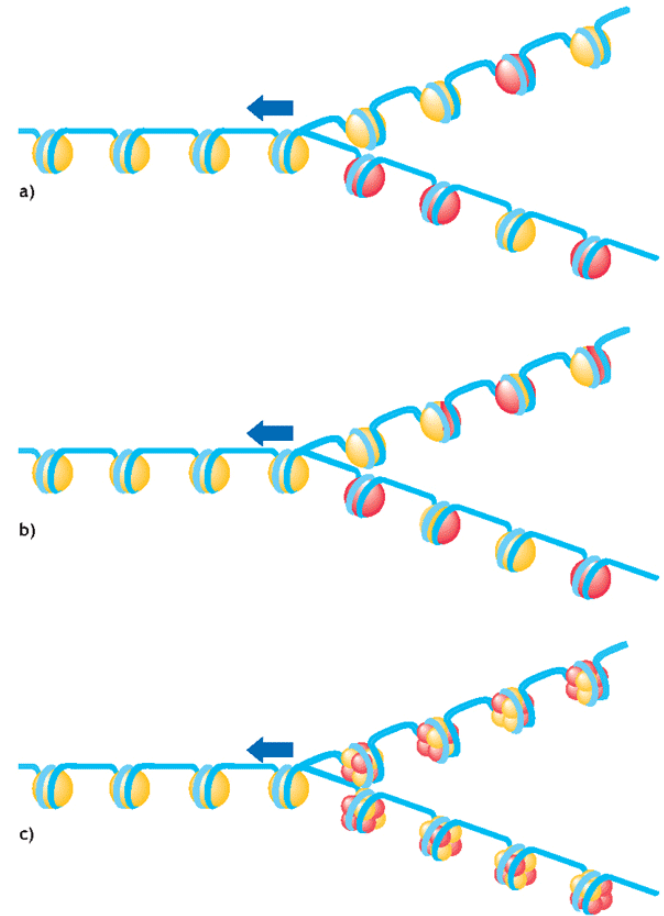
Durante la replicazione possiamo considerare gli istoni come divisi in 2 categorie: quelli che costituivano i vecchi ottameri ed istoni di nuova sintesi.

3 ipotesi per la ripartizione degli istoni:

1. conservativo: gli ottameri vecchi conservano la loro identità, così ottameri nuovi e vecchi si distribuiscono in modo casuale fra i due doppi filamenti (più accreditata)

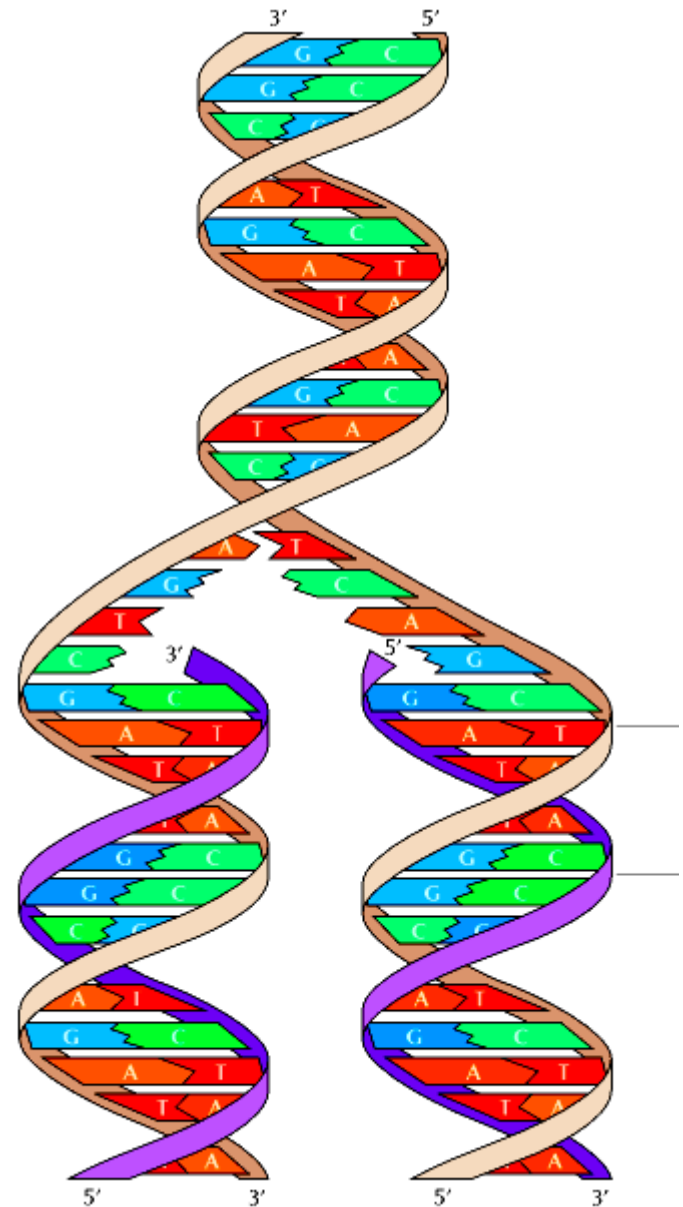
2. semiconservativo: ogni ottamero è costituito da un tetramero vecchio e da uno nuovo

3. dispersivo: gli ottameri sono costituiti da istoni vecchi e nuovi a caso



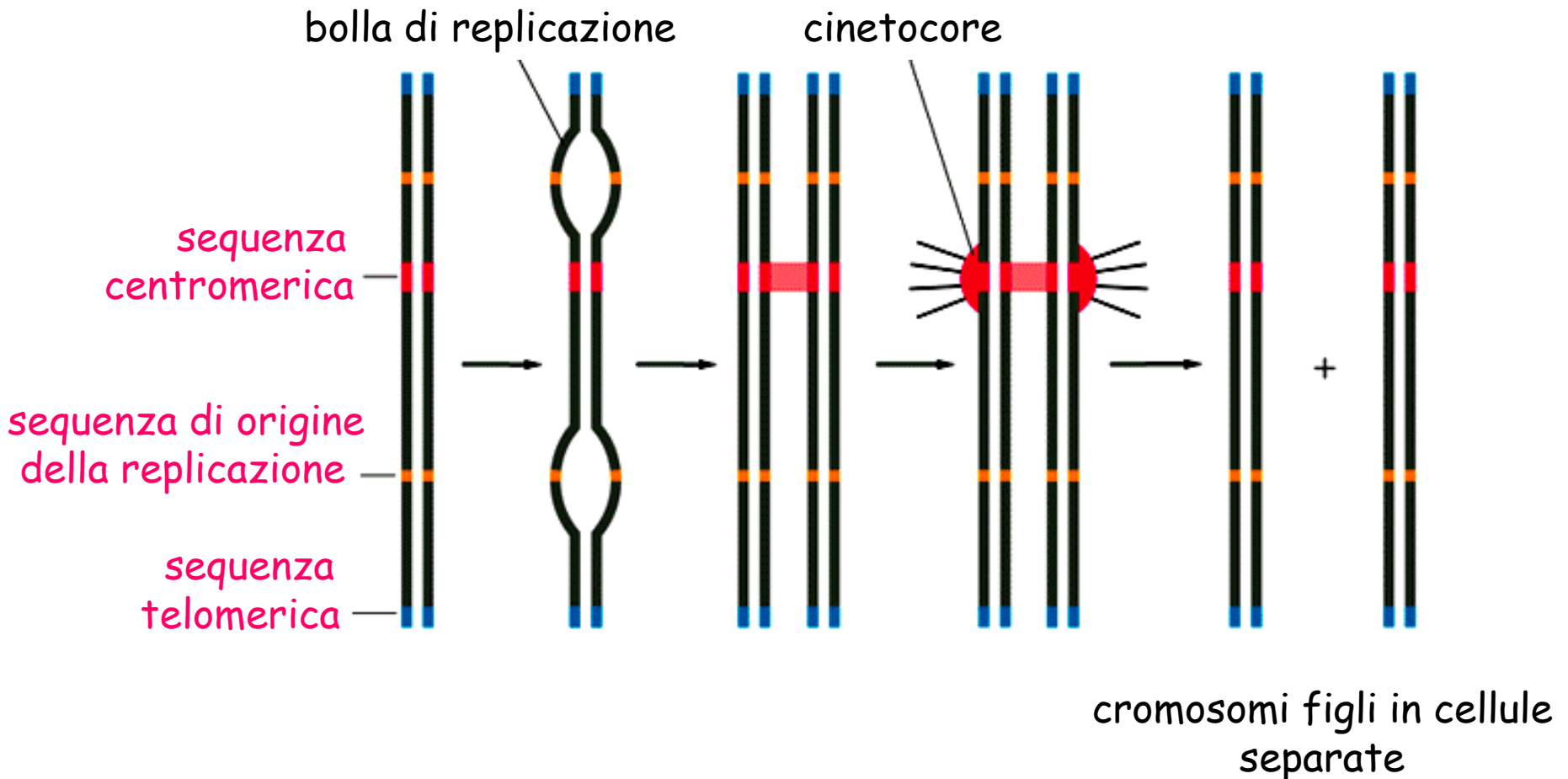
La replicazione del DNA

1. Introduzione
2. Modelli ed esperimenti
3. Replicazione nei procarioti
4. Complesso enzimatico
5. Svolgimento del DNA
6. Forcella replicativa
7. Primasi e innesco
8. Replicazione negli eucarioti
9. Telomerasi
10. Riparazione



Il problema della replicazione alla fine dei cromosomi: i TELOMERI

Sono sequenze di DNA alle estremità dei cromosomi e consistono di sequenze ripetute di DNA a semplice sequenza. Nell'uomo la sequenza ripetuta è **AGGGTT**.



Il problema della replicazione alla fine dei cromosomi

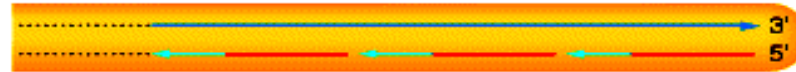
Fine del cromosoma

1° filamento
2° filamento



Replicazione

1° filamento



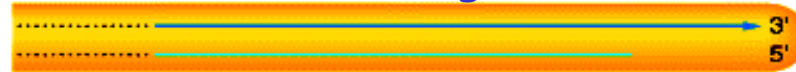
e

2° filamento



Rimozione dell'RNA primer e
ligazione dei frammenti

La rimozione del primer
accorcia la parte
terminale del cromosoma



— RNA primer
— DNA neosintetizzato

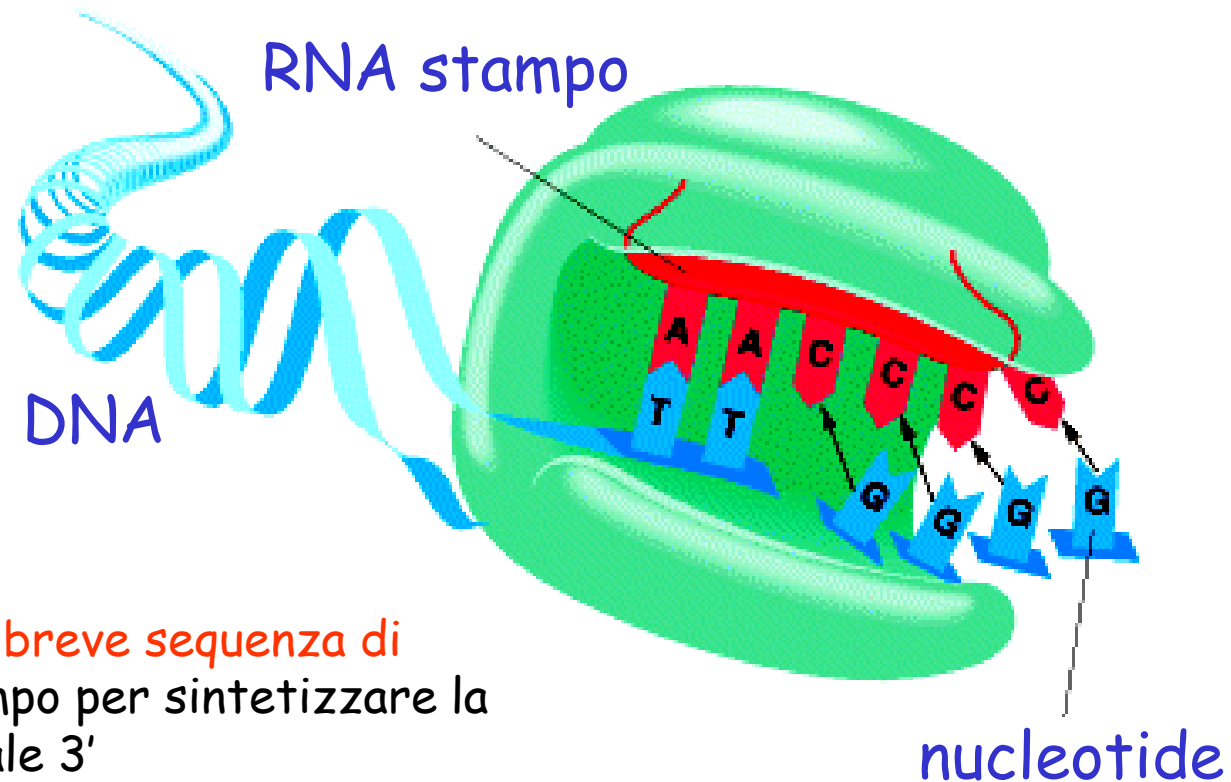
Quando la forcella replicativa raggiunge l'estremità del cromosoma la macchina replicatrice incontra una difficoltà nella sintesi del filamento lento: **non c'è posto per collocare l'innescò** a RNA necessario x iniziare l'ultimo frammento di Okazaki, proprio in cima alla molecola lineare di DNA. Ogni volta che una molecola di DNA si replica potrebbe andarne perduto un pezzetto dall'estremità.

Il problema della replicazione alla fine dei cromosomi

La telomerasi

Nei procarioti il problema non esiste perchè la molecola di DNA è circolare.

Negli eucarioti il problema si risolve grazie a speciali **sequenze terminali**, incorporate nei telomeri. Queste sequenze ripetitive telomeriche richiamano al cromosoma un enzima chiamato **telomerasi**, che 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



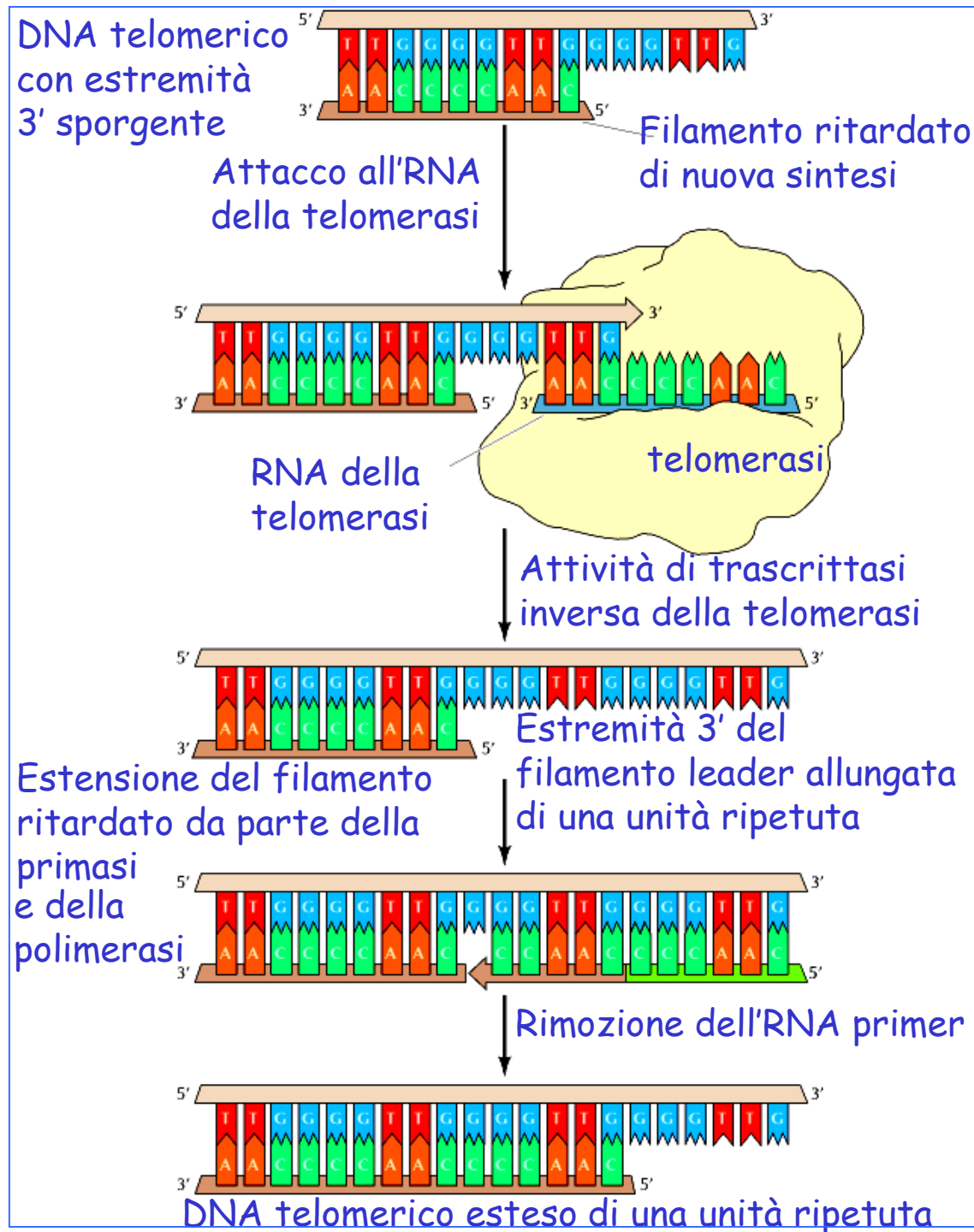
La **Telomerasi** contiene una **breve sequenza di RNA** che utilizza come stampo per sintetizzare la sequenza di DNA al terminale 3'

Azione della telomerasi

La telomerasi è una **trascrittasi inversa**: sintetizza DNA da uno stampo a RNA.

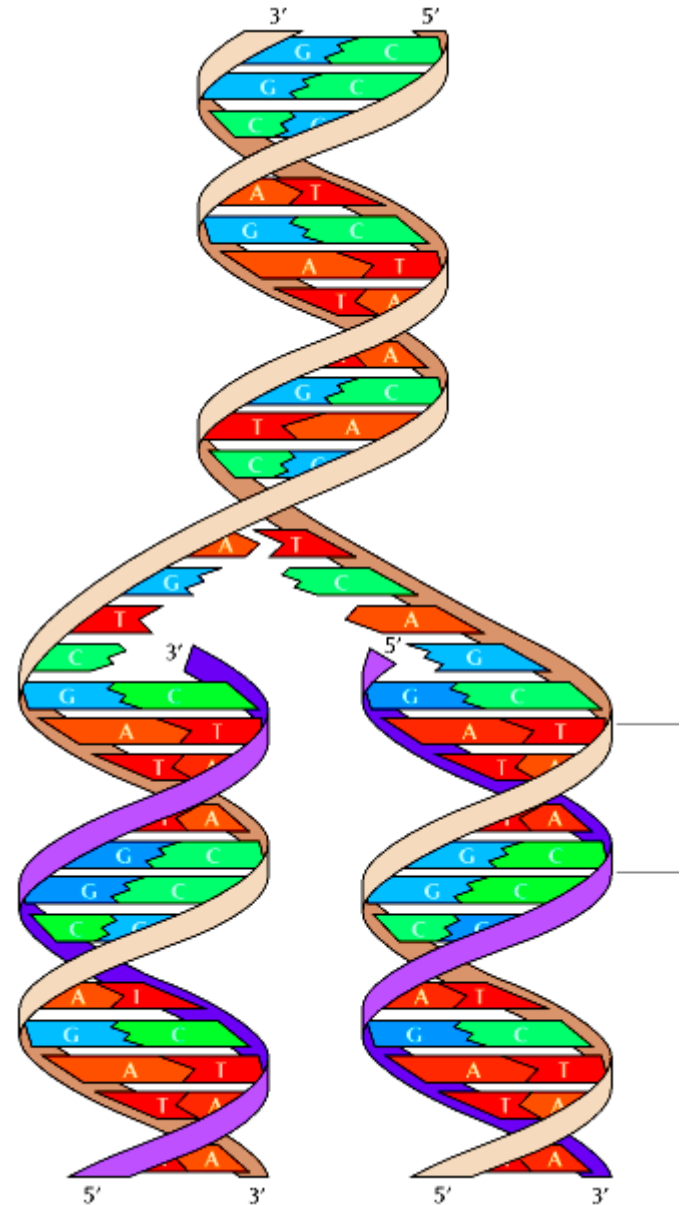
La telomerasi porta il **proprio RNA stampo**, complementare alle **sequenze ripetute del telomero**, come parte del complesso enzimatico.

L'uso di questo RNA come stampo permette alla telomerasi di **generare copie multiple delle sequenze telomeriche ripetute** mantenendo così i **telomeri** in assenza di uno stampo convenzionale di DNA che ne diriga la sintesi



La replicazione del DNA

1. Introduzione
2. Modelli ed esperimenti
3. Replicazione nei procarioti
4. Complesso enzimatico
5. Svolgimento del DNA
6. Forcella replicativa
7. Primasi e innesco
8. Replicazione negli eucarioti
9. Telomerasi
10. Riparazione

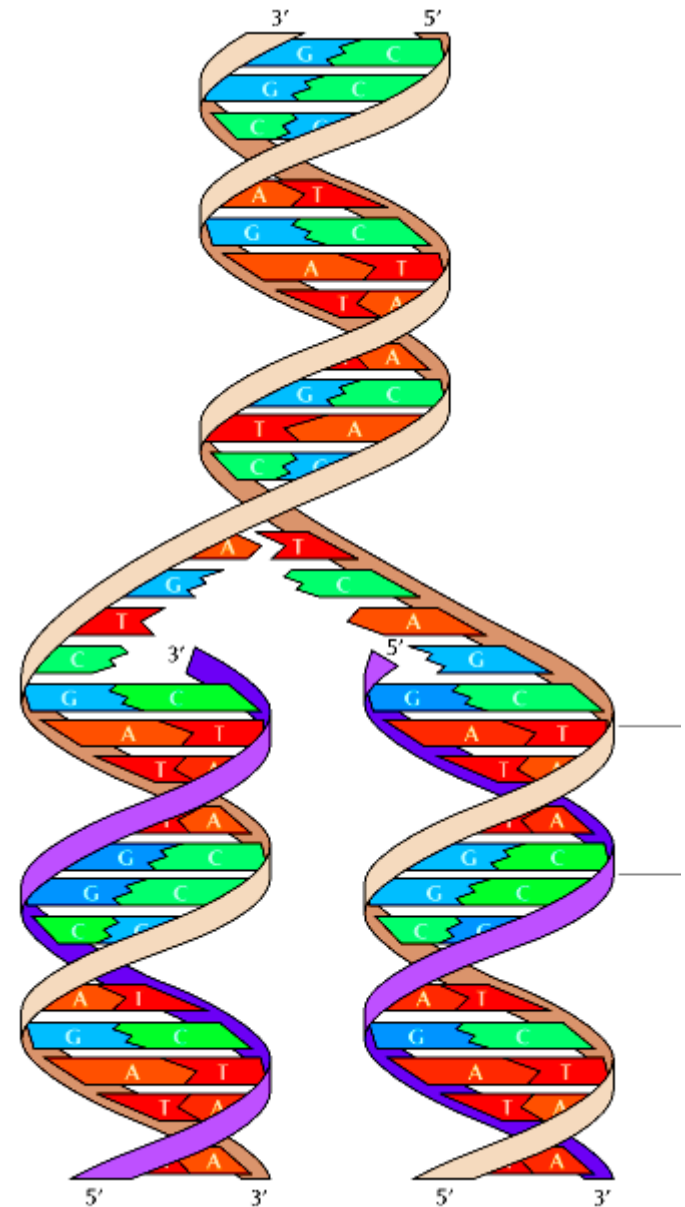


1. Introduzione
2. Modelli ed esperimenti
3. Replicazione nei procarioti
4. Complesso enzimatico
5. Svolgimento del DNA
6. Forcella replicativa
7. Primasi e innesco
8. Replicazione negli eucarioti
9. Telomerasi

10. Riparazione:

- a) Autocorrezione della DNA polimerasi
- b) Danneggiamento spontaneo del DNA
 - i. Deaminazione
 - ii. Depurinazione
 - iii. Dimeri di timina
- c) Riparazione per escissione
 - i. Di una base
 - ii. Di un oligonucleotide

La replicazione del DNA



Autocorrezione della DNA polimerasi

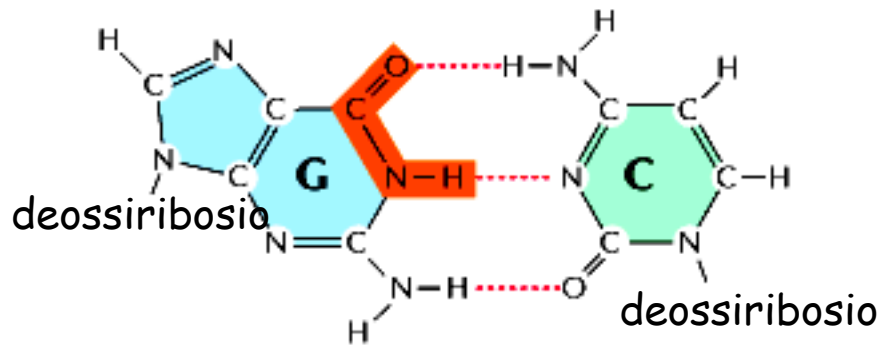
L'accuratezza della replicazione è critica per la riproduzione delle cellule e la frequenza di errori durante la replicazione corrisponde a 1 sola base sbagliata ogni 10^9-10^{10} nt.

La **DNA-pol discrimina attivamente** contro l'incorporazione di una base sbagliata, presumibilmente adattandosi alla conformazione della base corretta

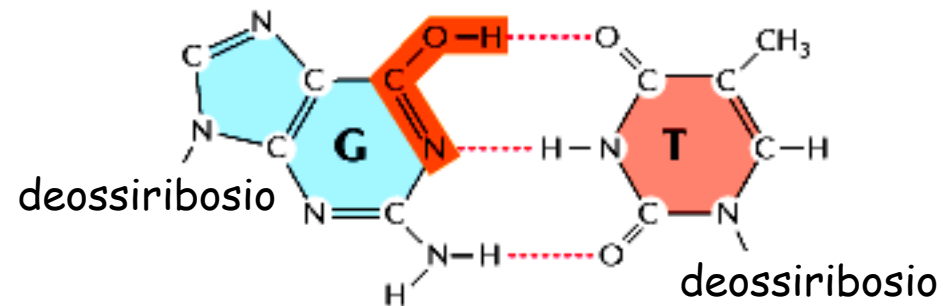
Una base sbagliata potrebbe essere una delle **forme tautomeriche rare** della basi che formano legami idrogeno con il partner sbagliato:

Per es. la forma tautomerica rara di *G* appaia con *T* invece che con *C*

Appaiamento G-C normale



La forma tautomerica rara di *G* si accoppia con *T*



Autocorrezione della DNA polimerasi

Attività della DNA pol:

1. Attività polimerasica 5'-3'
2. Attività esonucleasica 5'-3' : opera nella direzione della sintesi del DNA e aiuta a **rimuovere i primer** di RNA dai frammenti di Okazaki
3. Attività esonucleasica 3'-5' : opera nella direzione opposta alla sintesi del DNA e partecipa alla **correzione del DNA appena sintetizzato**

Correzione da parte della DNA polimerasi

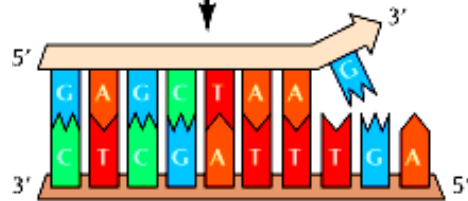
Attività esonucleasica
3' → 5' della
polimerasi



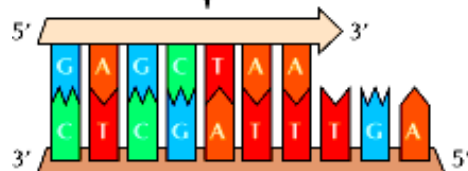
Incorporazione di una forma tautomerica rara di G invece di A



Il passaggio di nuovo alla forma normale di G rompe l'appaiamento della base con T



La polimerasi elimina la G male appaiata tramite l'esonucleasi 3' → 5'



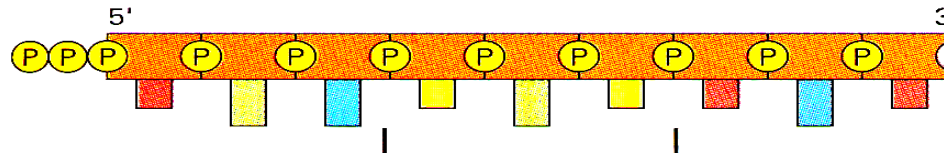
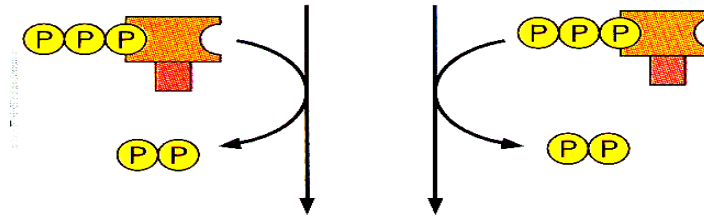
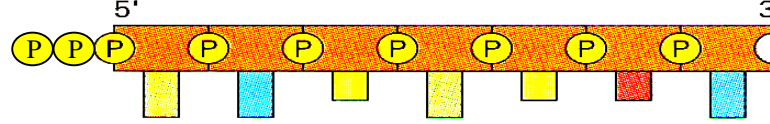
La sintesi procede con l'incorporazione della base corretta (A)



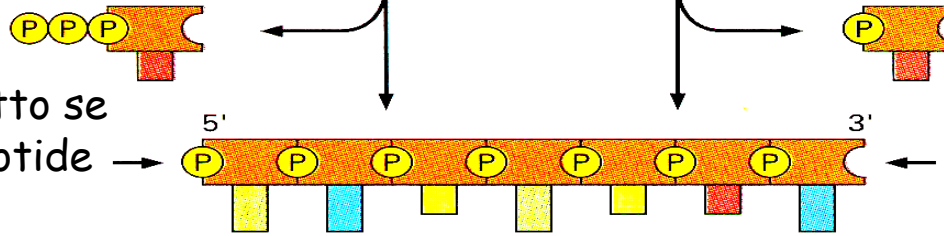
Come si spiega la direzionalità 5'→3' della DNA polimerasi

CRESCITA IPOTETICA DI FILAMENTO 3'→5'

CRESCITA EFFETTIVA DI FILAMENTO 5'→3'



AUTOCORREZIONE



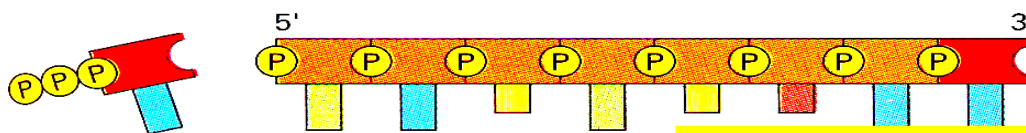
Terminale 5' prodotto se si rimuove un nucleotide per autocorrezione

Terminale 3' prodotto se si rimuove un nucleotide per autocorrezione

Deossinucleotide trifosfato corretto in arrivo



Deossinucleotide trifosfato corretto in arrivo



LA REAZIONE NON PROCEDE, MANCANDO UN LEGAME AD ALTA ENERGIA DA IDROLIZZARE

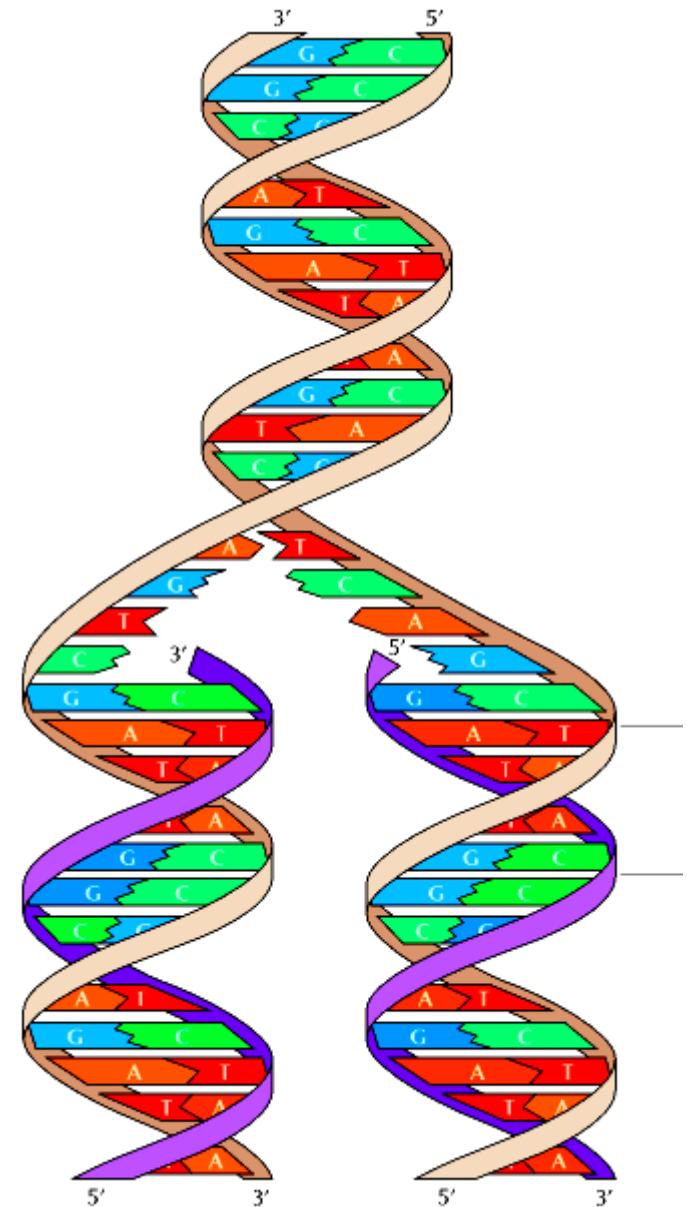
VIENE IDROLIZZATO UN LEGAME AD ALTA ENERGIA, IL CHE RENDE ENERGETICAMENTE POSSIBILE LA REAZIONE

1. Introduzione
2. Modelli ed esperimenti
3. Replicazione nei procarioti
4. Primasi e innesco
5. Svolgimento del DNA
6. Complesso enzimatico
7. Replicazione negli eucarioti
8. Telomerasi

9. Riparazione:

- a) Autocorrezione della DNA polimerasi
- b) Danneggiamento spontaneo del DNA
 - i. Deaminazione
 - ii. Depurinazione
 - iii. Dimeri di timina
- c) Riparazione per escissione
 - i. Di una base
 - ii. Di un oligonucleotide

La replicazione del DNA

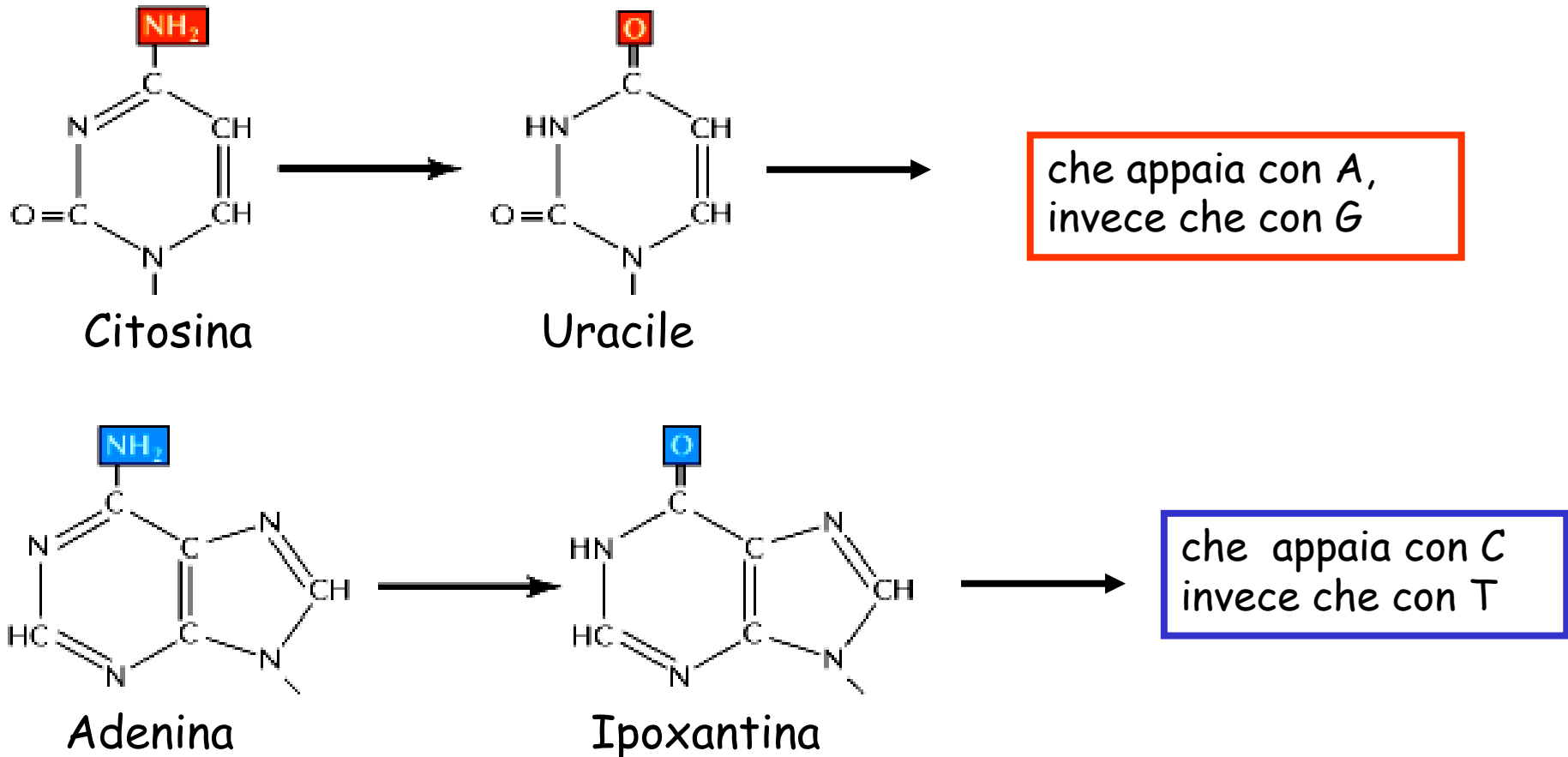


Riparazione del DNA

Il meccanismo correttore di appaiamento elimina gli errori che si verificano durante la sintesi del DNA, ma esistono altre circostanze in cui il DNA possa essere danneggiato

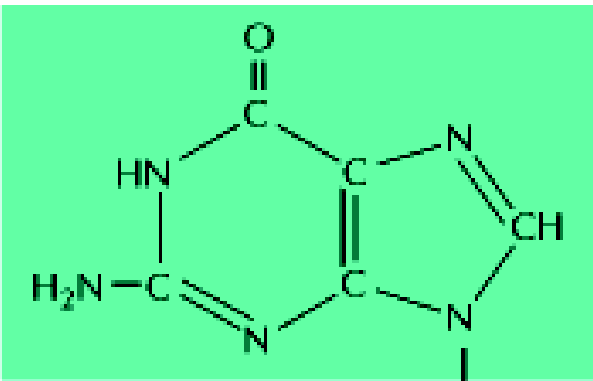
Per esempio il DNA può subire modificazioni chimiche:

DEAMINAZIONE: avviene per perdita spontanea di un gruppo amminico

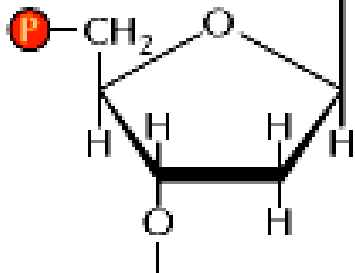


Riparazione del DNA

DEPURINAZIONE Reazione spontanea che può staccare dal DNA sia la Guanina che l'Adenina. È una perdita di basi puriniche dovuta al taglio del legame fra basi puriniche e il deossiribosio. Questo danno non interrompe l'ossatura fosfodiesterica, ma lascia un **sito apurinico (AP)** nel DNA.

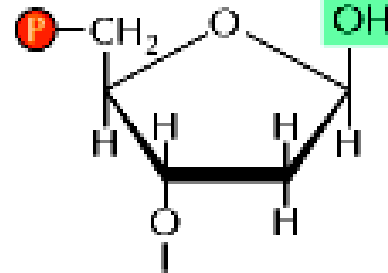


Catena di DNA



dGMP = deossiguanosina monofosfato

Catena di DNA



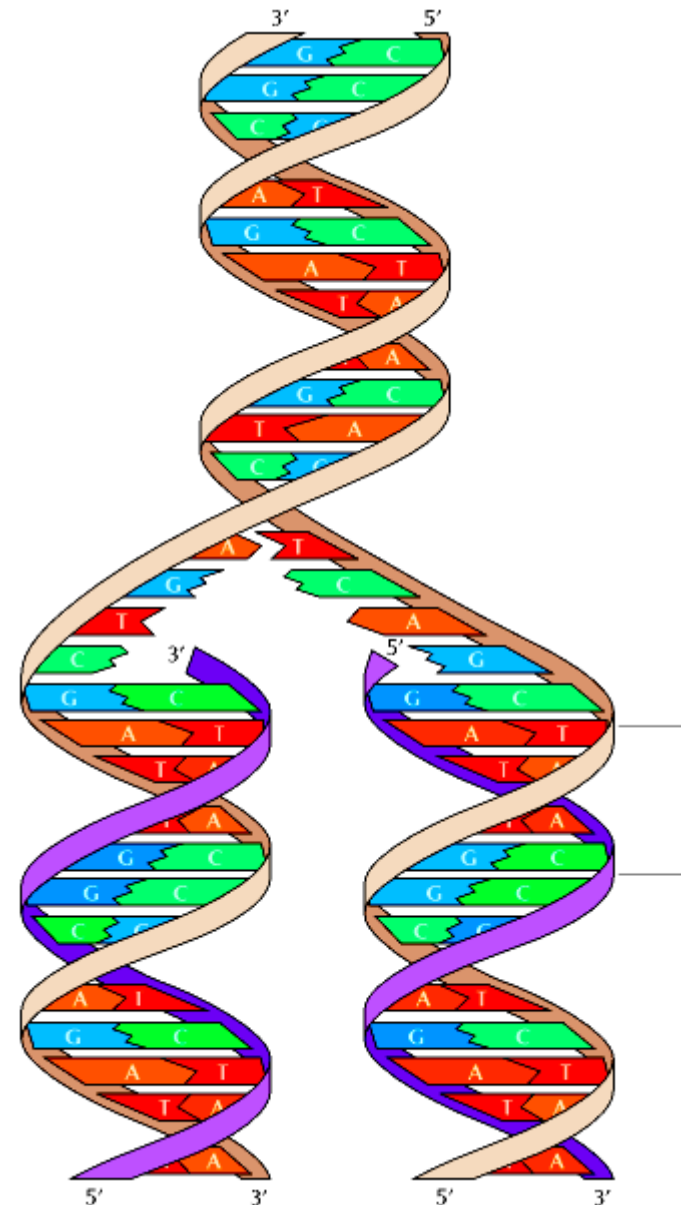
Sito AP

1. Introduzione
2. Modelli ed esperimenti
3. Replicazione nei procarioti
4. Primasi e innesco
5. Svolgimento del DNA
6. Complesso enzimatico
7. Replicazione negli eucarioti
8. Telomerasi

9. Riparazione:

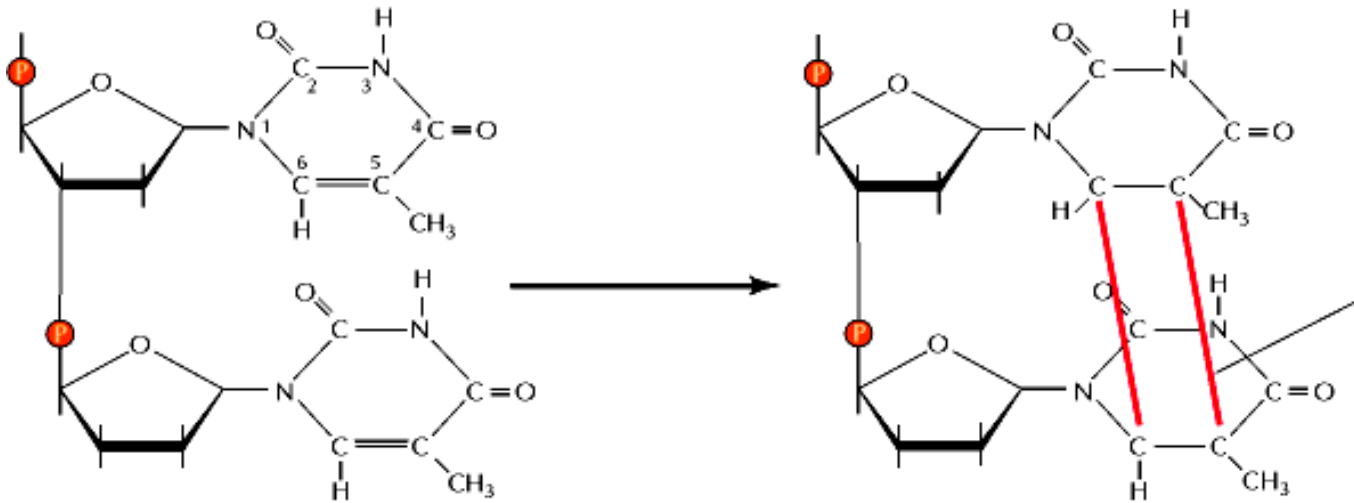
- a) Autocorrezione della DNA polimerasi
- b) Danneggiamento spontaneo del DNA
 - i. Deaminazione
 - ii. Depurinazione
 - iii. Dimeri di timina
- c) Riparazione per escissione
 - i. Di una base
 - ii. Di un oligonucleotide

La replicazione del DNA



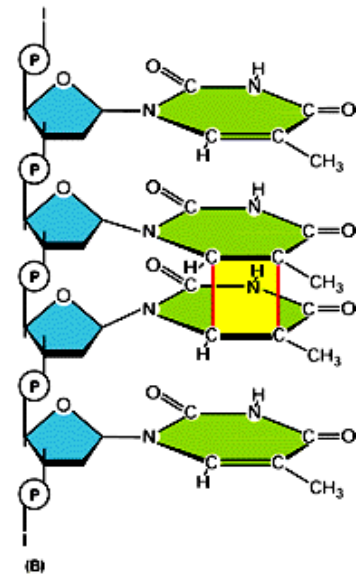
Riparazione del DNA

Dimero di timine: Danneggiamento del DNA indotto dalle radiazioni UV



Due **timine adiacenti** stabiliscono due **legami covalenti** e formano un dimero di timina.

La formazione di questi dimeri **distorce la struttura del DNA** e blocca **la trascrizione e la replicazione** oltre il sito del danno, così che la riparazione è strettamente correlata con la capacità delle cellule di **sopravvivere** all'irradiazione UV

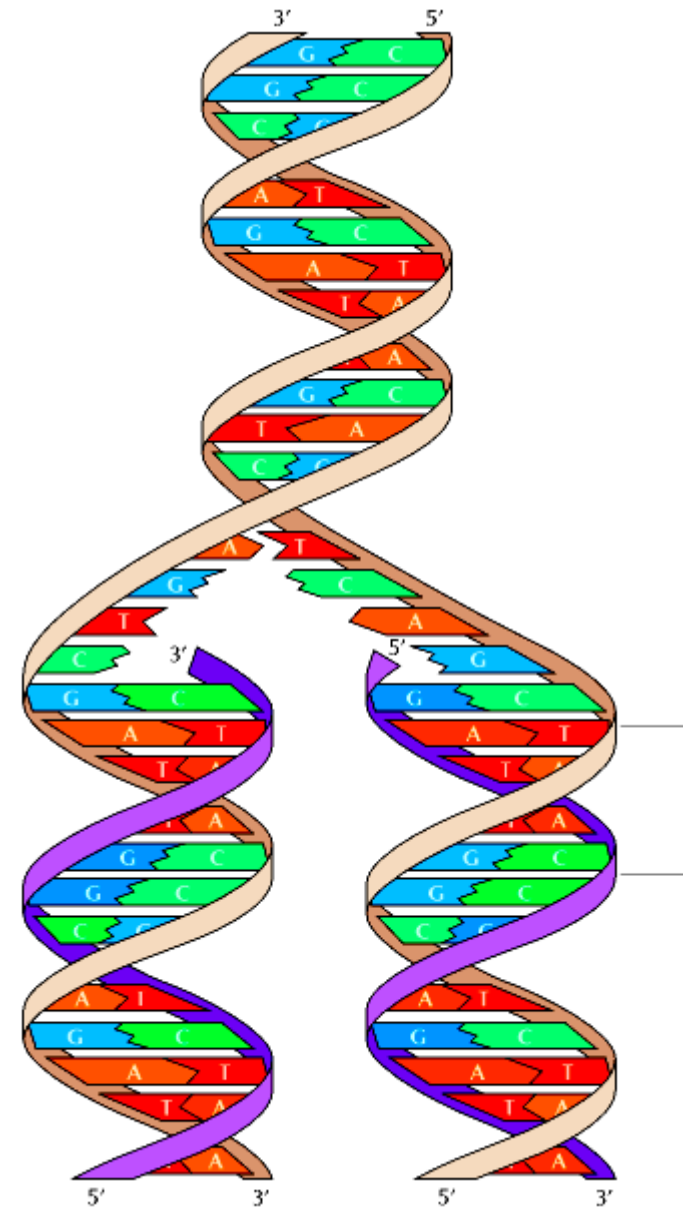


1. Introduzione
2. Modelli ed esperimenti
3. Replicazione nei procarioti
4. Primasi e innesco
5. Svolgimento del DNA
6. Complesso enzimatico
7. Replicazione negli eucarioti
8. Telomerasi

9. Riparazione:

- a) Autocorrezione della DNA polimerasi
- b) Danneggiamento spontaneo del DNA
 - i. Deaminazione
 - ii. Depurinazione
 - iii. Dimeri di timina
- c) Riparazione per escissione
 - i. Di una base
 - ii. Di un oligonucleotide

La replicazione del DNA



Riparazione del DNA

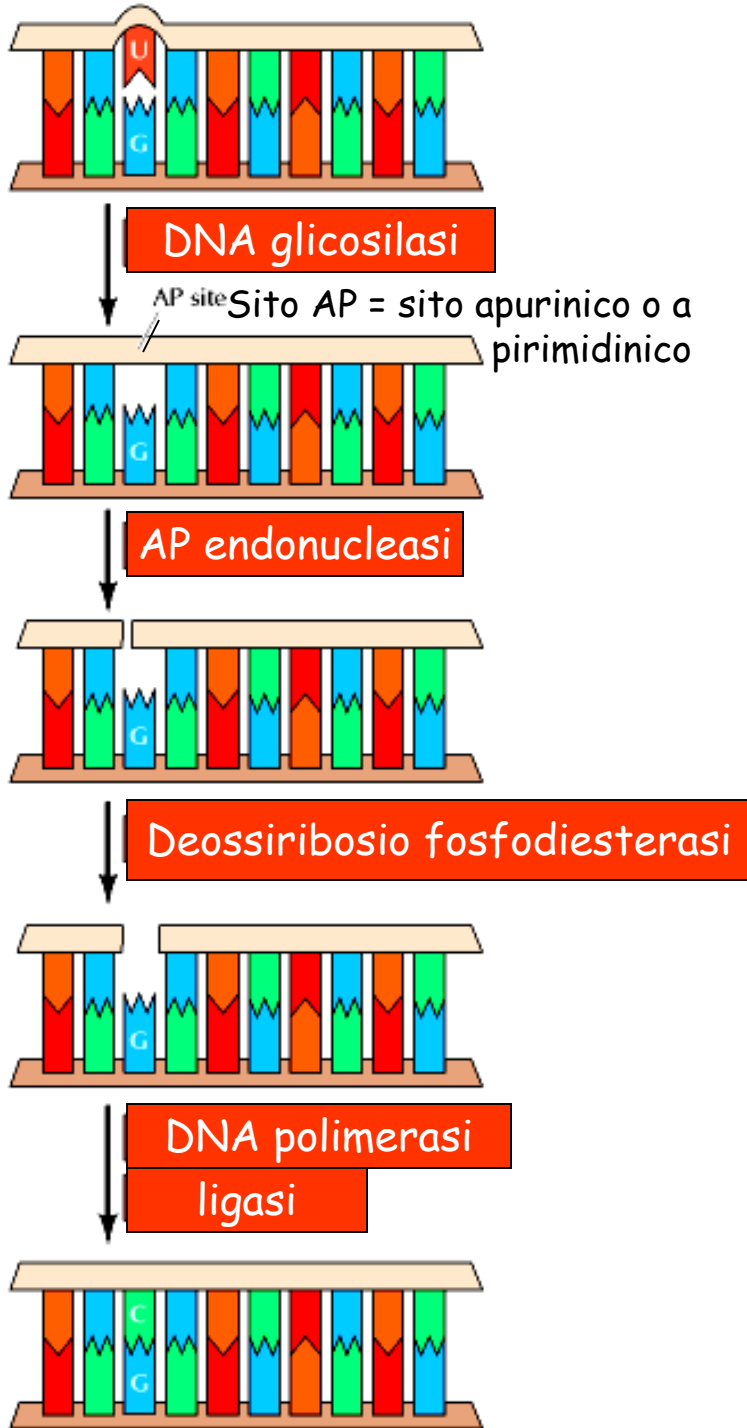
1) Per escissione della base

La base danneggiata viene riconosciuta e rimossa. L'escissione della base dal DNA è catalizzata dall'enzima **DNA glicosilasi**, un enzima che taglia il legame che unisce la base al deossiribosio dello scheletro di DNA. Questa reazione produce uracile libero e un **sito apirimidinico** o un **sito apurinico (AP)**

Questi siti sono riparati da una **AP endonucleasi** che taglia su di un lato del sito AP

Il deossiribosio rimanente viene quindi rimosso

L'interruzione di una base che ne deriva viene riempita dalla **DNA polimerasi** e dalla **ligasi**

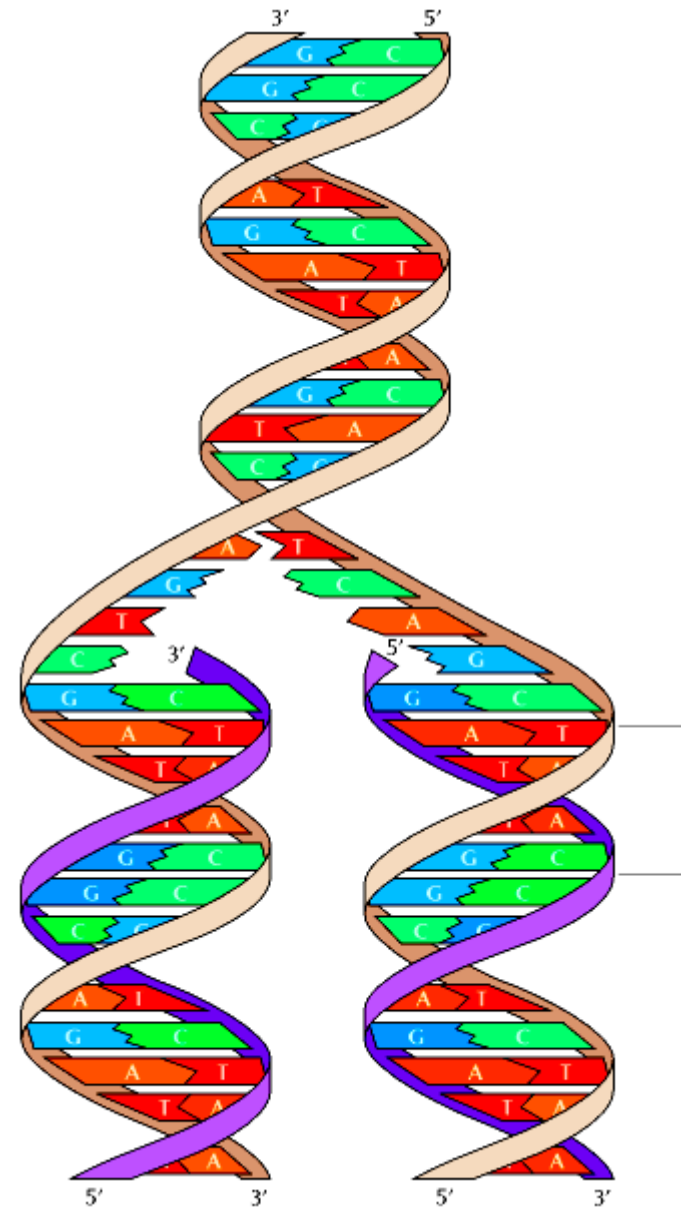


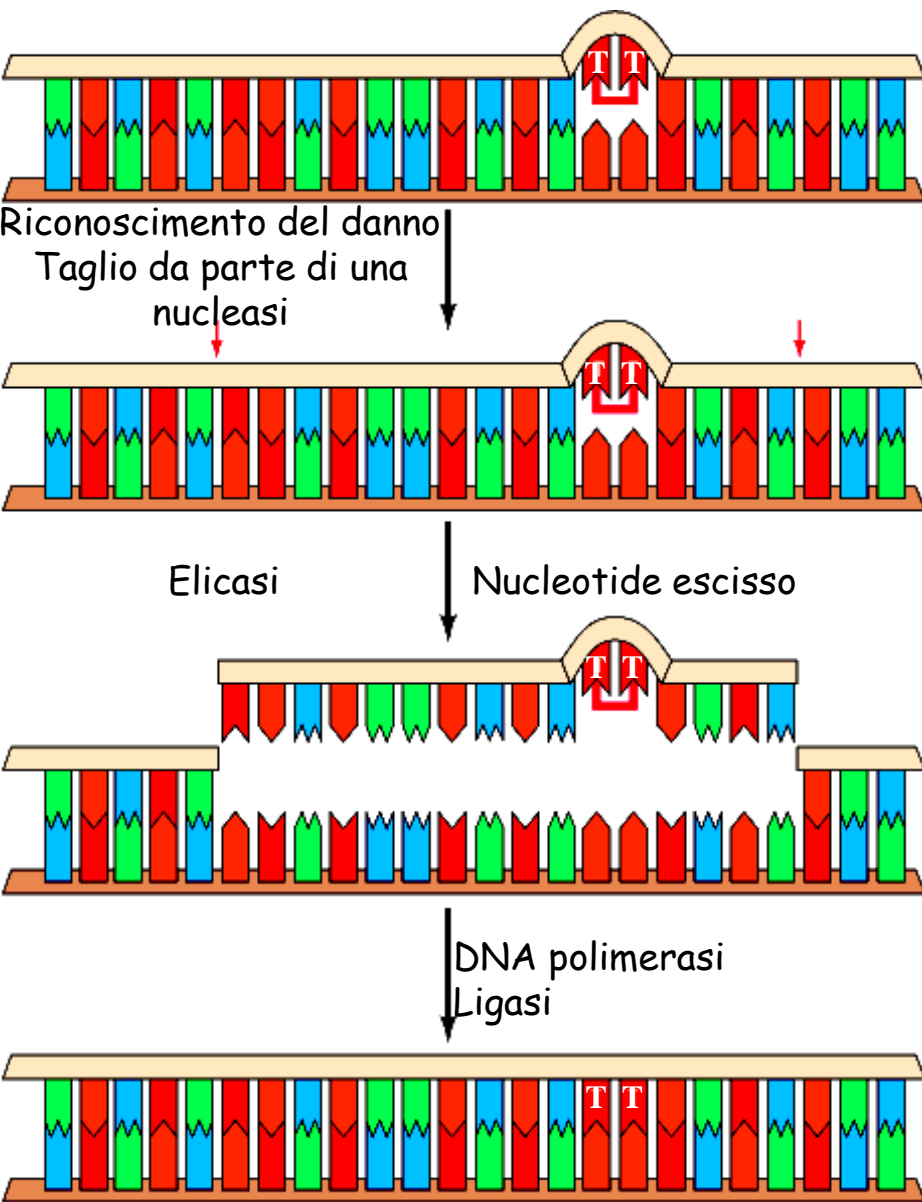
1. Introduzione
2. Modelli ed esperimenti
3. Replicazione nei procarioti
4. Primasi e innesco
5. Svolgimento del DNA
6. Complesso enzimatico
7. Replicazione negli eucarioti
8. Telomerasi

9. Riparazione:

- a) Autocorrezione della DNA polimerasi
- b) Danneggiamento spontaneo del DNA
 - i. Deaminazione
 - ii. Depurinazione
 - iii. Dimeri di timina
- c) Riparazione per escissione
 - i. Di una base
 - ii. Di un oligonucleotide

La replicazione del DNA





Escissione di nucleotidi

Le basi danneggiate vengono rimosse come parte di un oligonucleotide che contiene una lesione

In *E. coli* questa riparazione è catalizzata dai prodotti di 3 geni: *uvrA*, *B* e *C*

- *uvrA* riconosce DNA danneggiato
- recluta *uvrB* e *uvrC* sul sito della lesione
- *UvrB* e *uvrC* tagliano rispettivamente sui lati 3' e 5' del sito danneggiato, rimuovendo così un oligonucleotide che consiste di 12-13 basi
- Una *elicasi* rimuove l'oligonucleotide che contiene il danno
- L'interruzione del filamento viene riempita dalla *DNA polimerasi*
- e sigillata dalla *ligasi*

Il complesso *UvrABC* viene spesso chiamato *escinucleasi*