



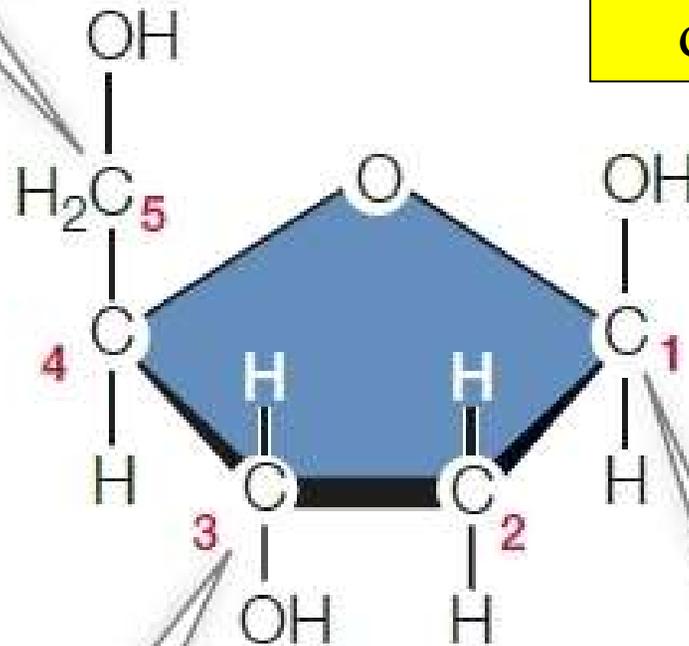
DNA e replicazione del DNA-2

Principi di Biologia e Genetica
Scienze Motorie
a.a 2021-22
Dott. ssa Mazzoni Elisa, PhD



Struttura del DNA

Il gruppo fosfato si lega al carbonio 5 .



Il gruppo fosfato del nucleotide successivo si lega al carbonio 3 .

La base azotata si lega al carbonio 1 .



Struttura del DNA

Subunità nucleotidiche

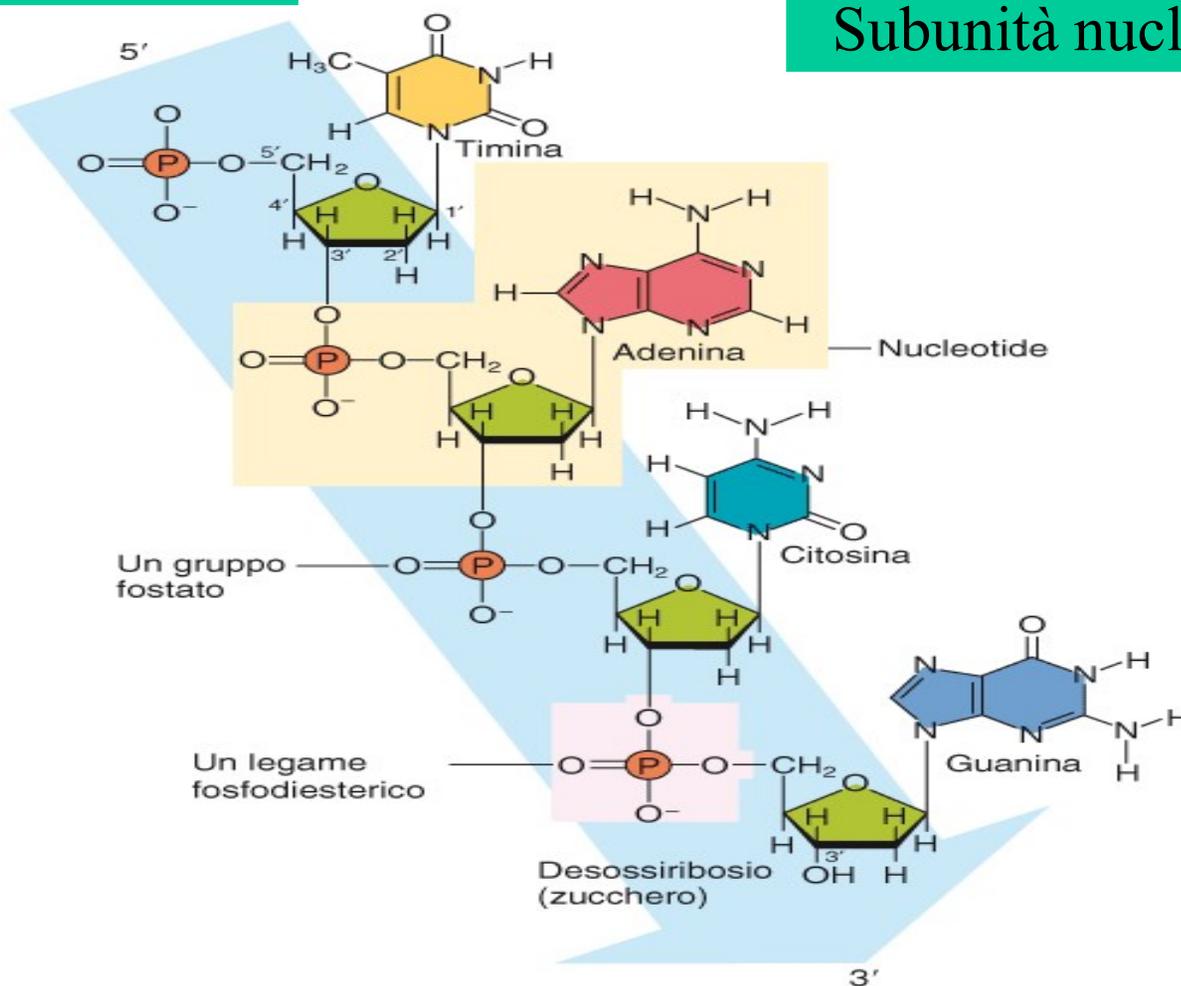


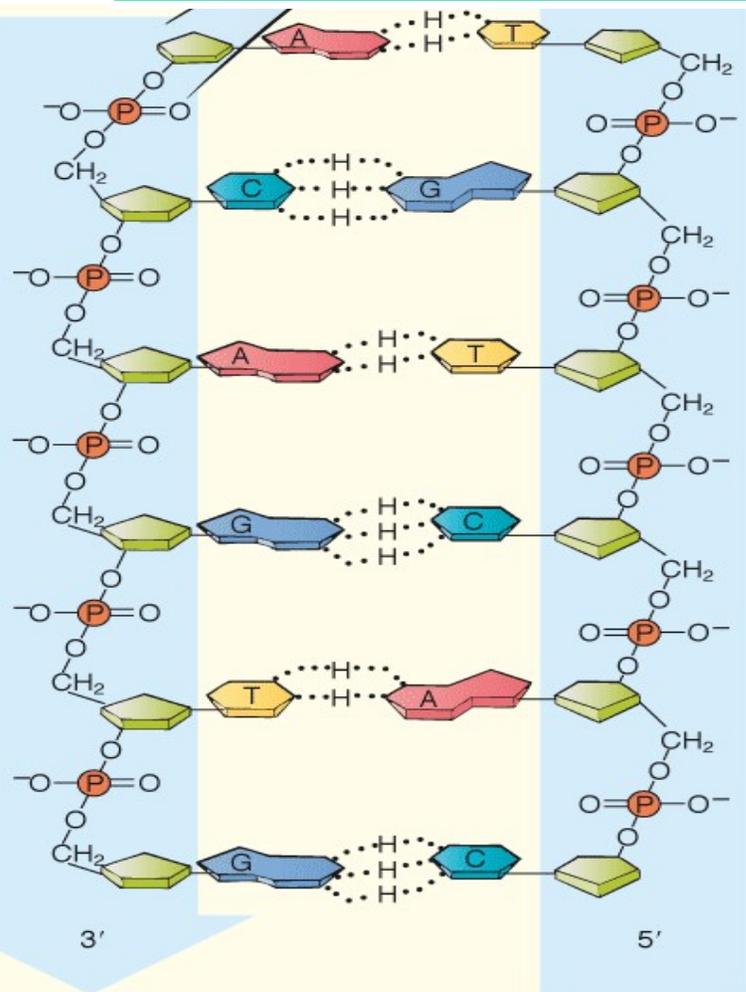
FIGURA 12-4 Le subunità nucleotidiche del DNA

Un singolo filamento di DNA consiste di uno scheletro (*sovraimpresso 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.

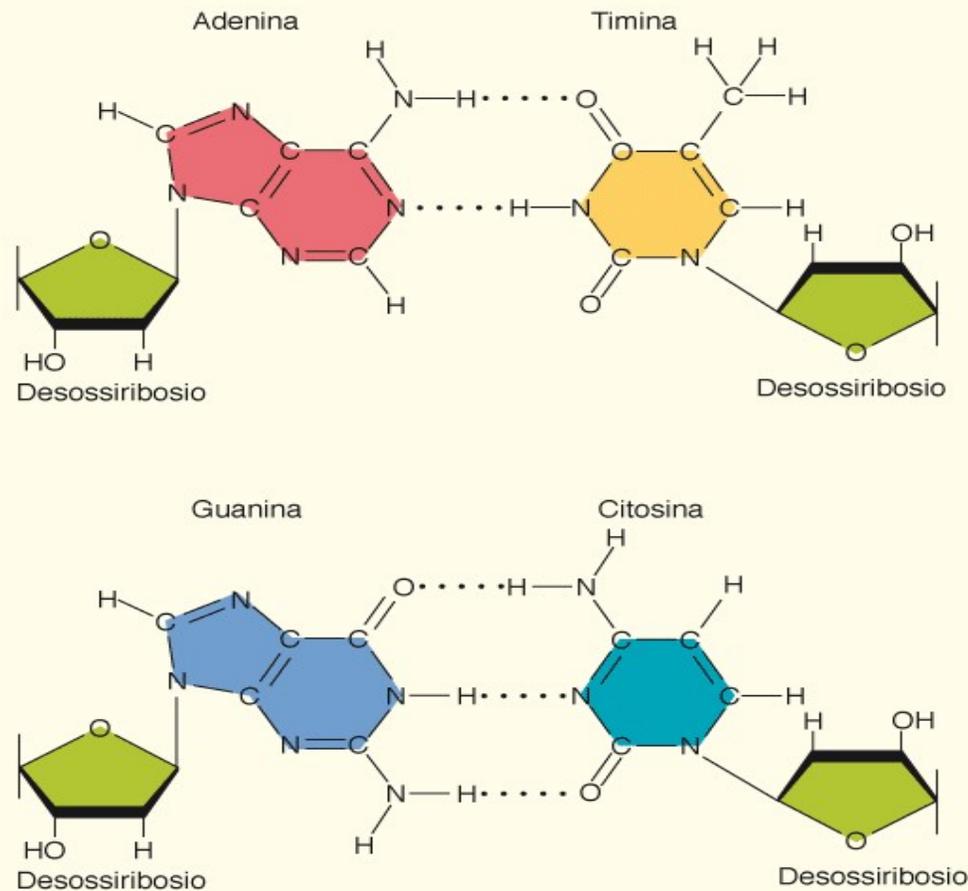


Struttura del DNA

LEGAMI TRA Subunità nucleotidiche



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

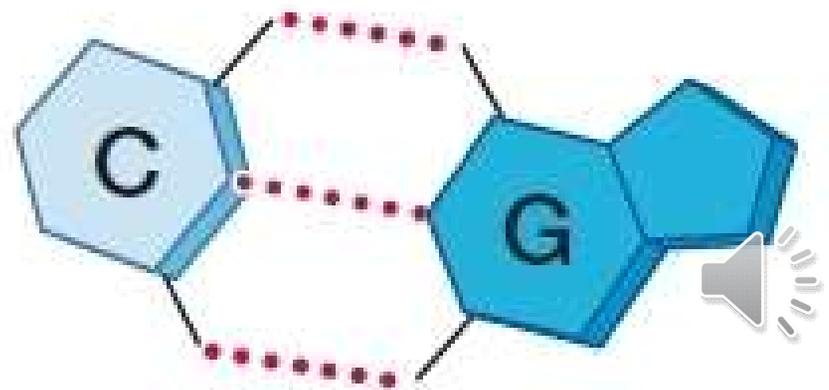
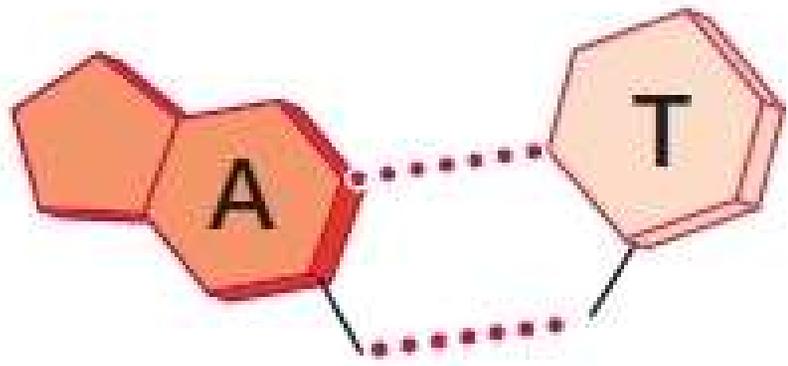
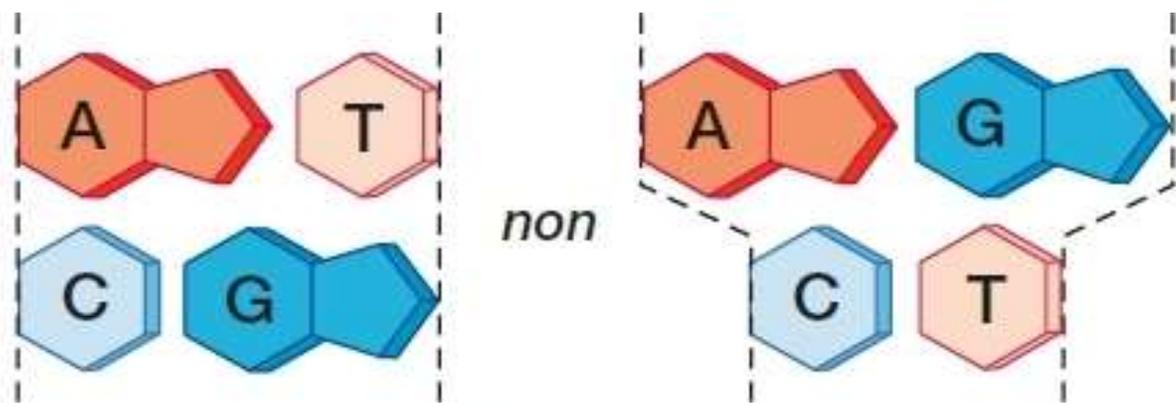
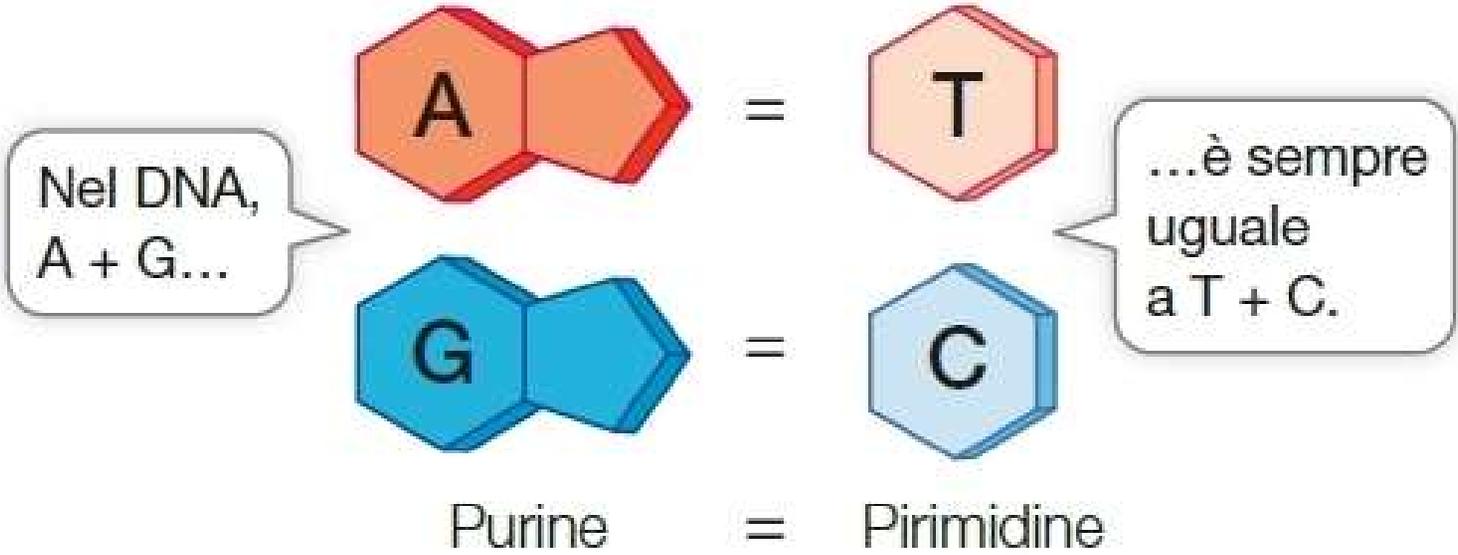


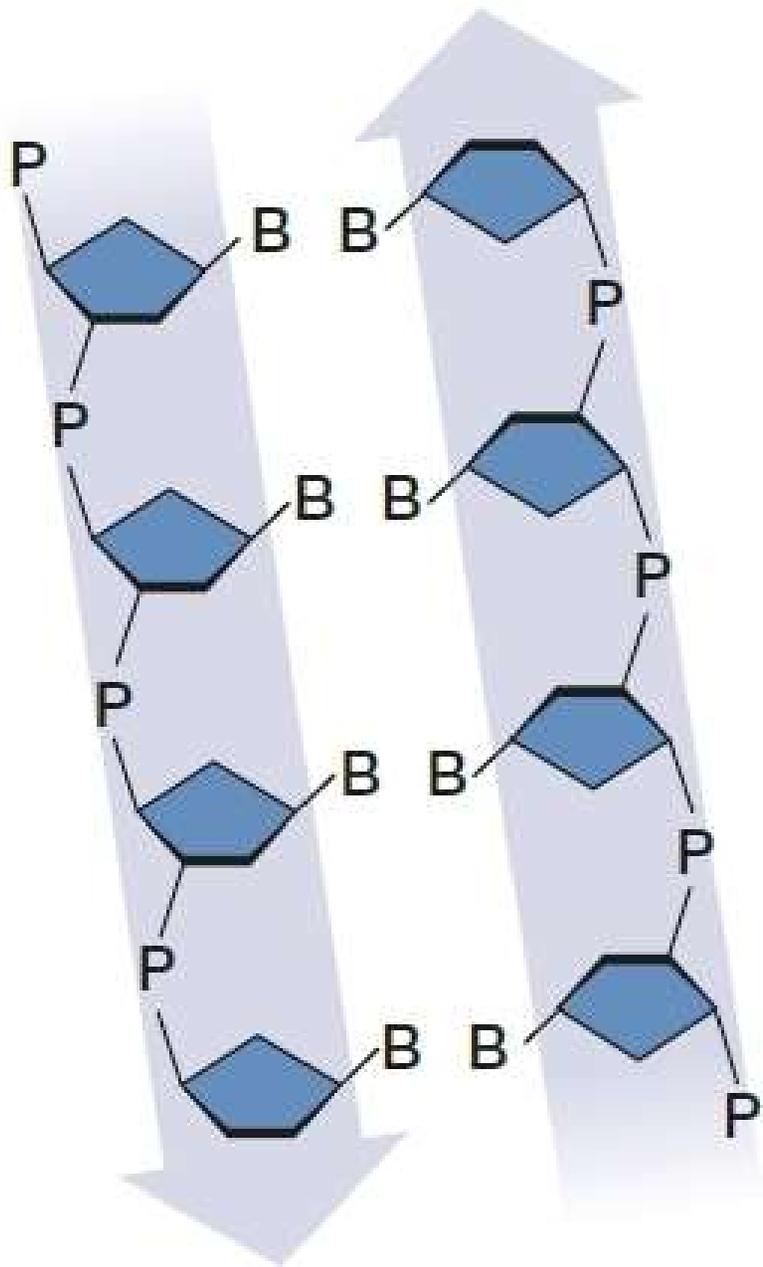
(b) Rappresentazione dei legami a idrogeno fra le coppie di basi adenina (A) e timina (T) (*in alto*) e tra guanina (G) e citosina (C) (*in basso*). La coppia A-T è unita da due legami a idrogeno; la coppia G-C da tre.

FIGURA 12-9 Appaiamento delle basi e legami a idrogeno

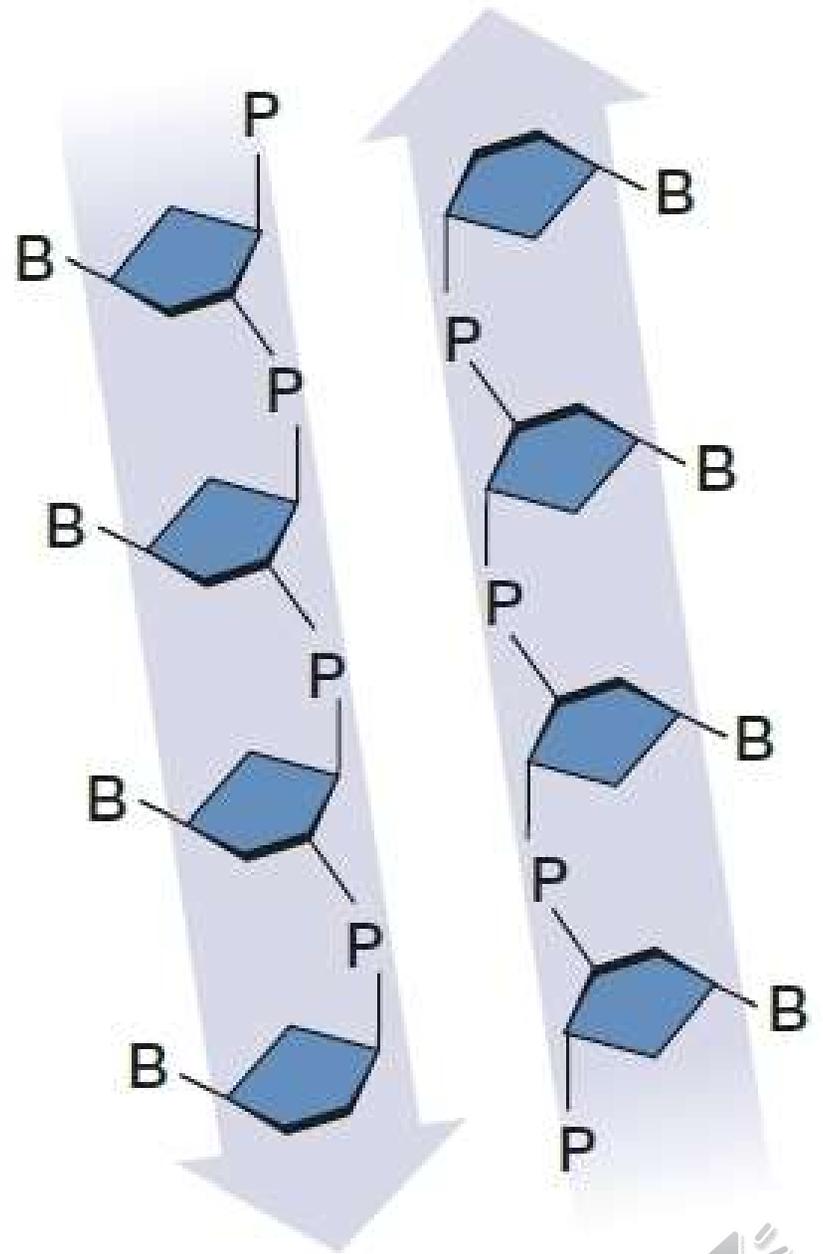
I due filamenti di una doppia elica di DNA sono tenuti insieme da legami a idrogeno tra le basi.







non



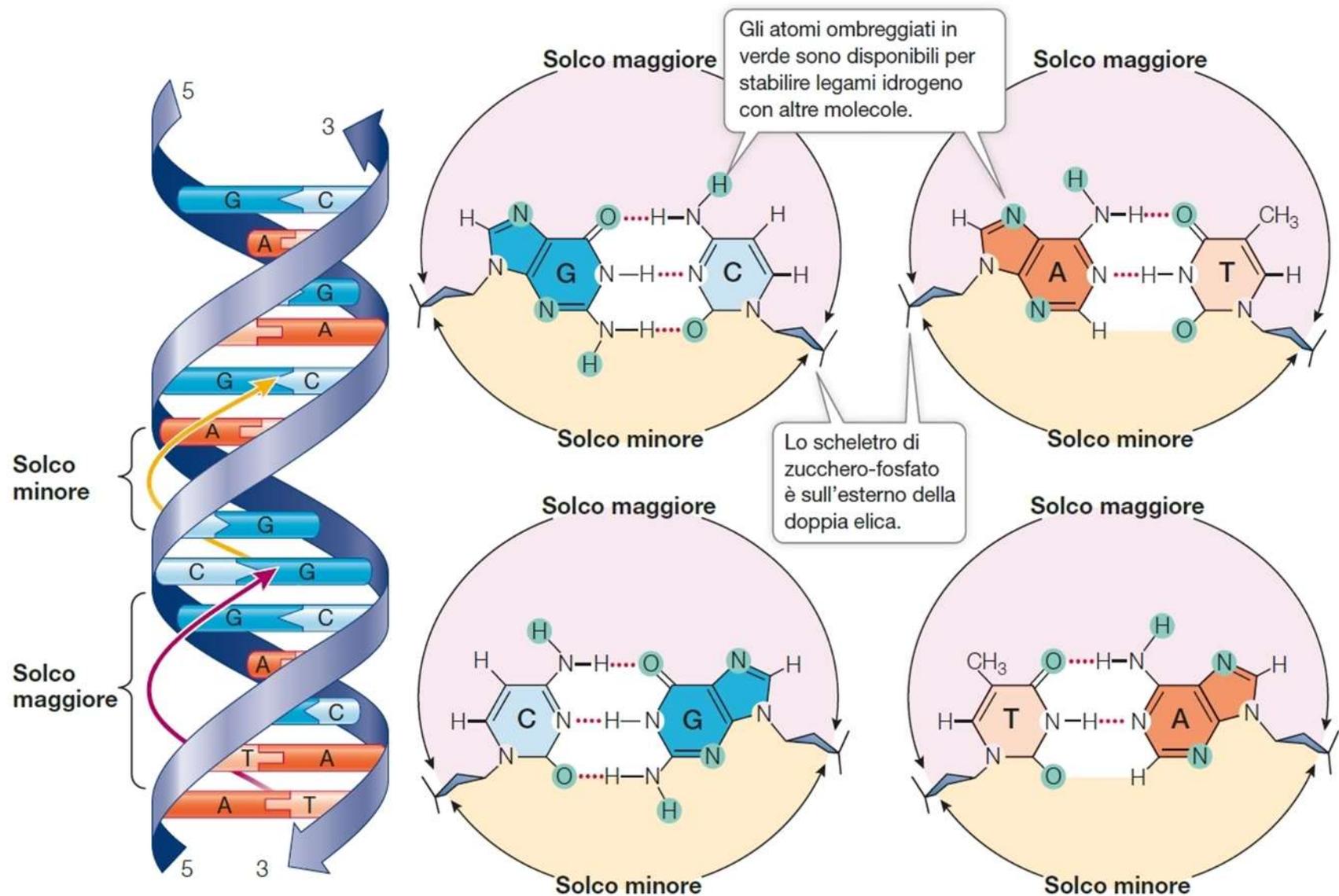
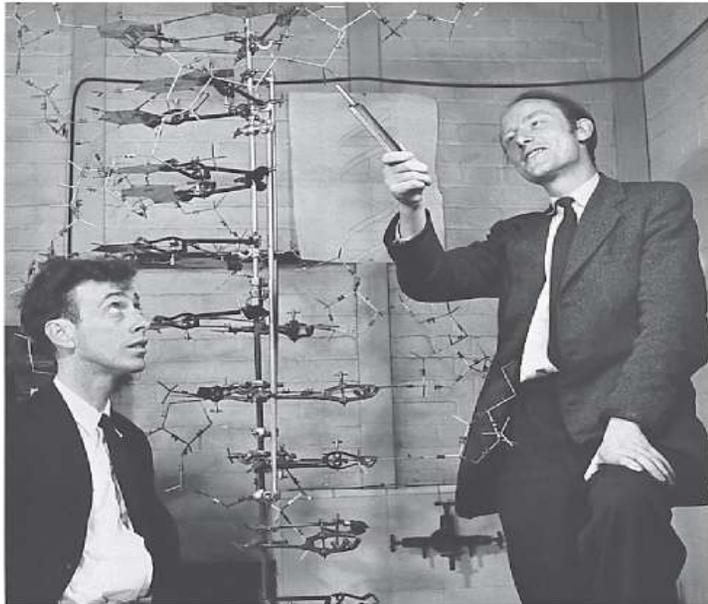


Figura 13.7 Le coppie di basi nel DNA possono interagire con altre molecole Questi diagrammi mostrano le quattro possibili configurazioni delle coppie di basi all'interno della doppia elica. Gli atomi evidenziati in verde sono disponibili per formare legami idrogeno con altre molecole, come le proteine.



A



B

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

5' 3'
 ↓ ↑
 3' 5'

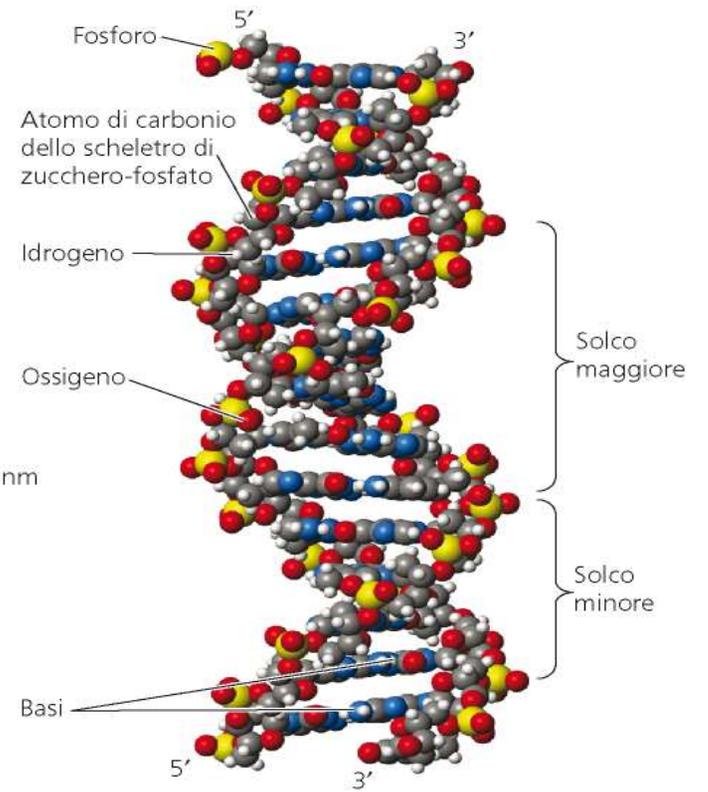
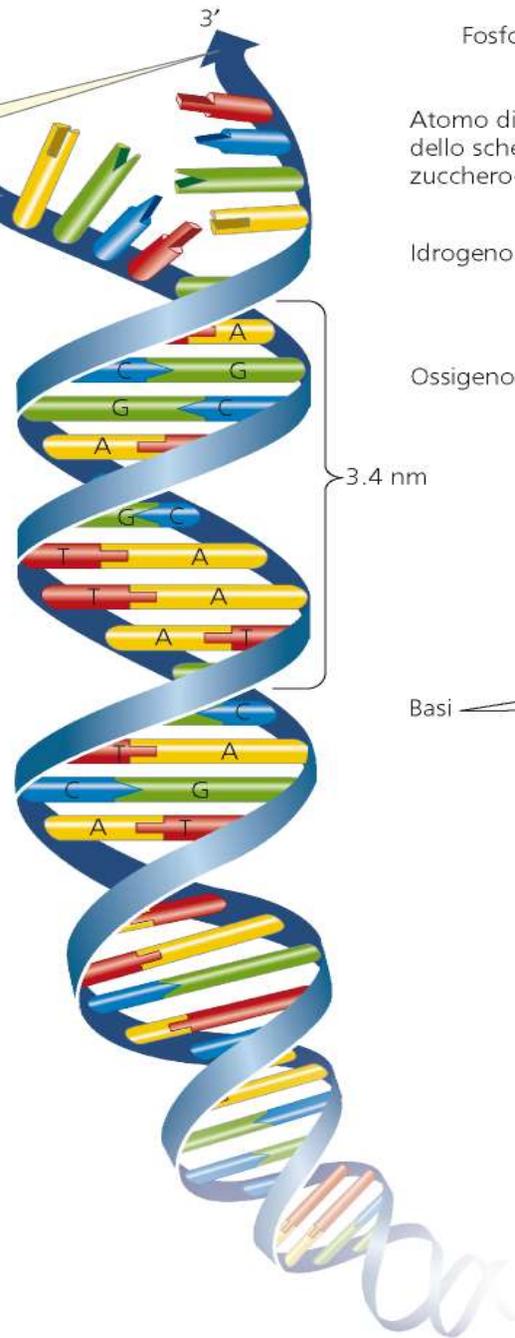


TABELLA 12-2**Composizione in basi del DNA estratto da diversi organismi**

	PERCENTUALI DELLE BASI NEL DNA				RAPPORTI	
FONTE DEL DNA	A	T	G	C	A/T	G/C
<i>E. coli</i>	26,1	23,9	24,9	25,1	1,09	0,99
Lievito	31,3	32,9	18,7	17,1	0,95	1,09
Spermatozoo di riccio di mare	32,5	31,8	17,5	18,2	1,02	0,96
Spermatozoo di aringa	27,8	27,5	22,2	22,6	1,01	0,98
Fegato umano	30,3	30,3	19,5	19,9	1,00	0,98
Granoturco (<i>Zea mays</i>)	25,6	25,3	24,5	24,6	1,01	1,00



La replicazione del DNA

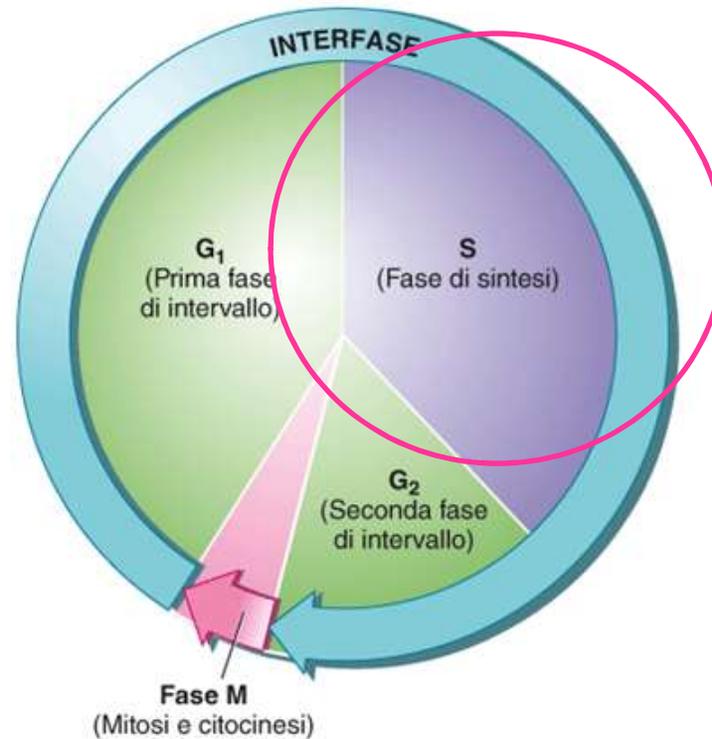
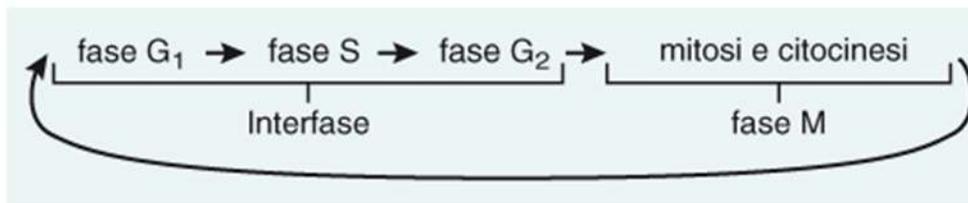
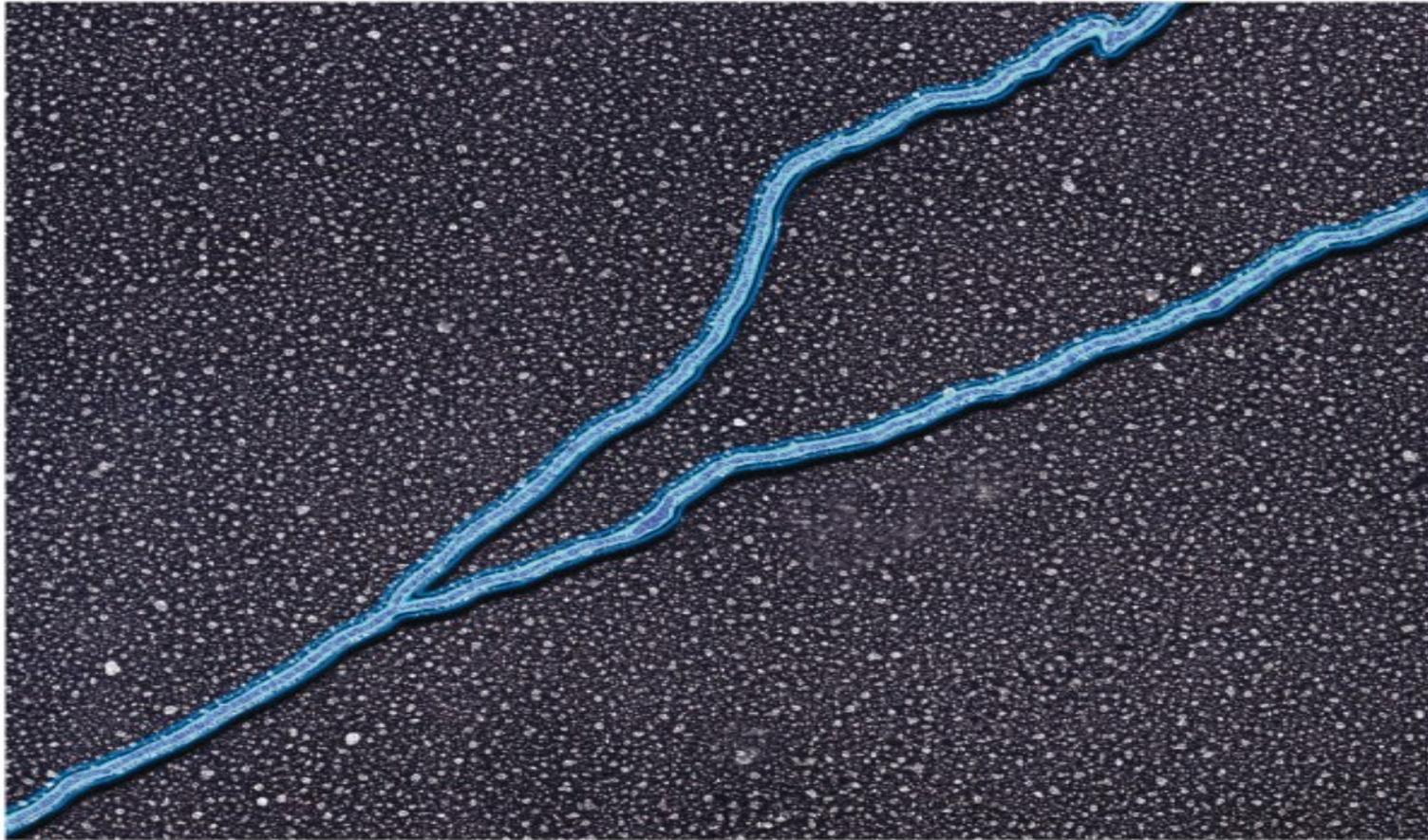


Figura 10-5 Il ciclo cellulare eucariotico

Il ciclo cellulare consiste nella successione degli eventi che caratterizzano la vita di una cellula, include l'interfase (G₁, S e G₂) la fase M (mitosi e citocinesi). La durata relativa di ciascuno stadio varia a seconda della specie, del tipo di cellula e delle condizioni di crescita. Se il ciclo cellulare avesse una durata di 12 ore, la fase G₁ durerebbe circa 5 ore, la fase S circa 4,5 ore, la fase G₂ circa 2 ore e la fase M circa 30 minuti.





Fotografia al microscopio elettronico del DNA in replicazione. Nel corso della replicazione, vengono sintetizzate due molecole di DNA dalla molecola parentale di origine. La replicazione sta avvenendo in corrispondenza della struttura a Y, che è chiamata *forca di replicazione*.



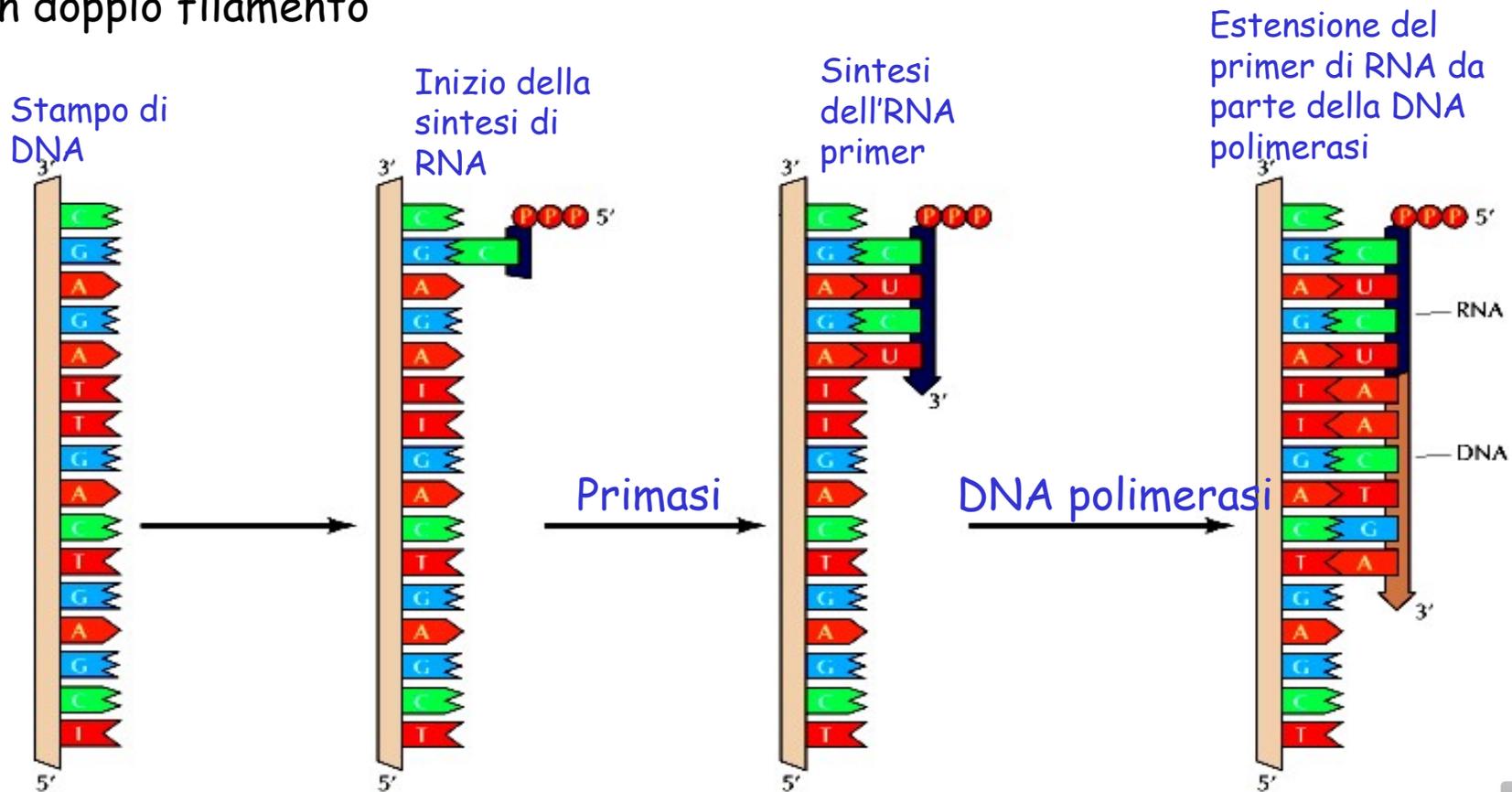
DNA primasi

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

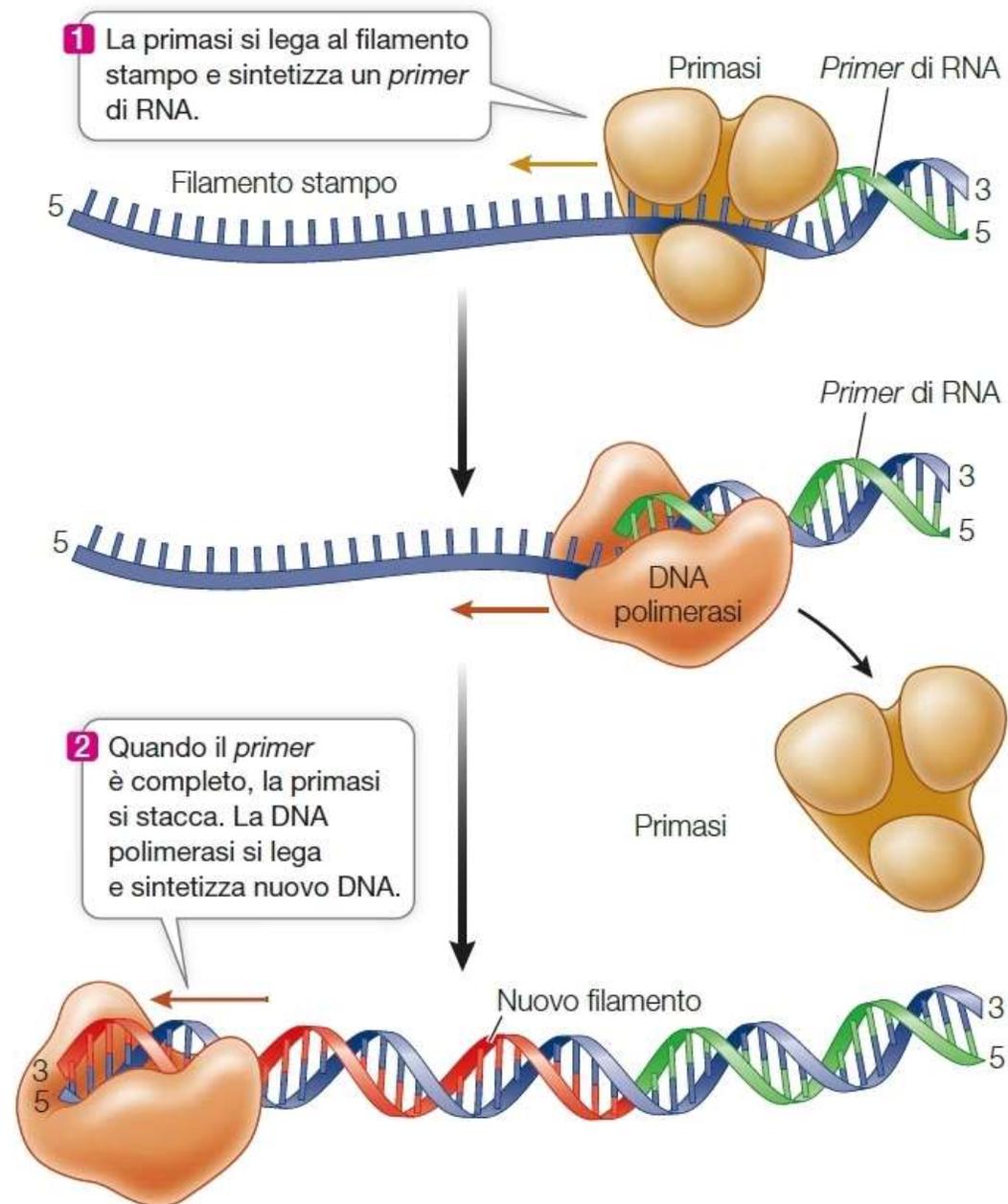
La DNA polimerasi è **incapace di dare inizio** a un filamento di DNA totalmente nuovo

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



DNA primasi

Figura 13.11 Il nuovo DNA si forma a partire da un *primer* La DNA polimerasi richiede un *primer* – un filamento «innesco» di DNA o RNA al quale può aggiungere i nuovi nucleotidi.



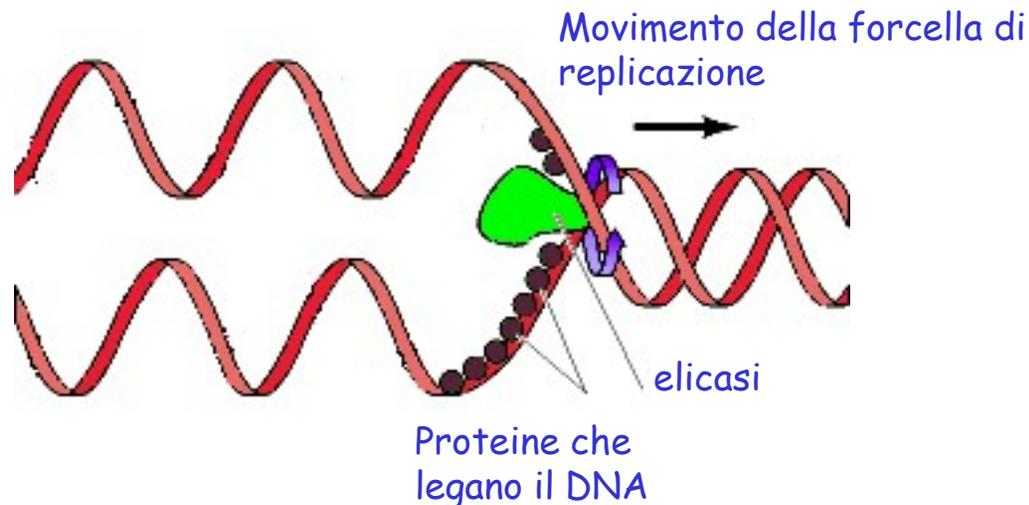
Le elicasi: Svolgimento del DNA

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.



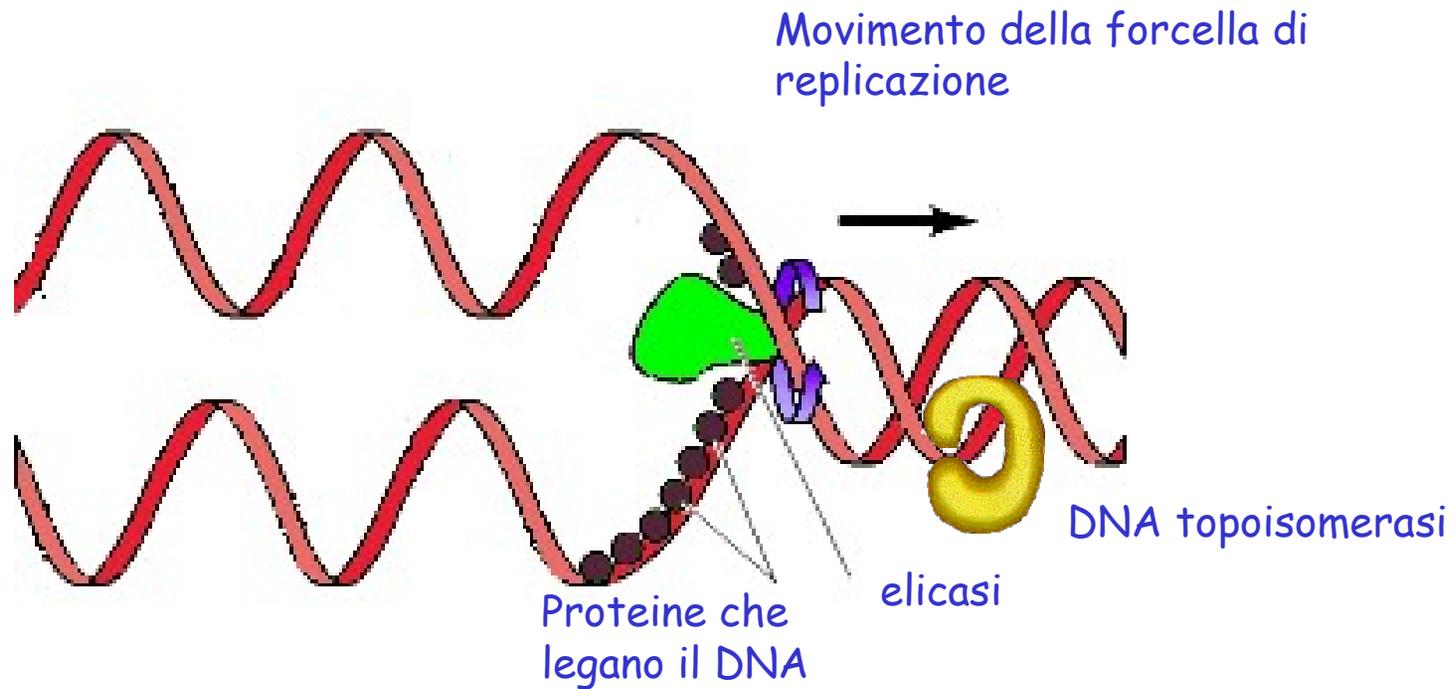
I filamenti nucleotidici separati vengono stabilizzati dalle **proteine che legano il DNA a singolo filamento**



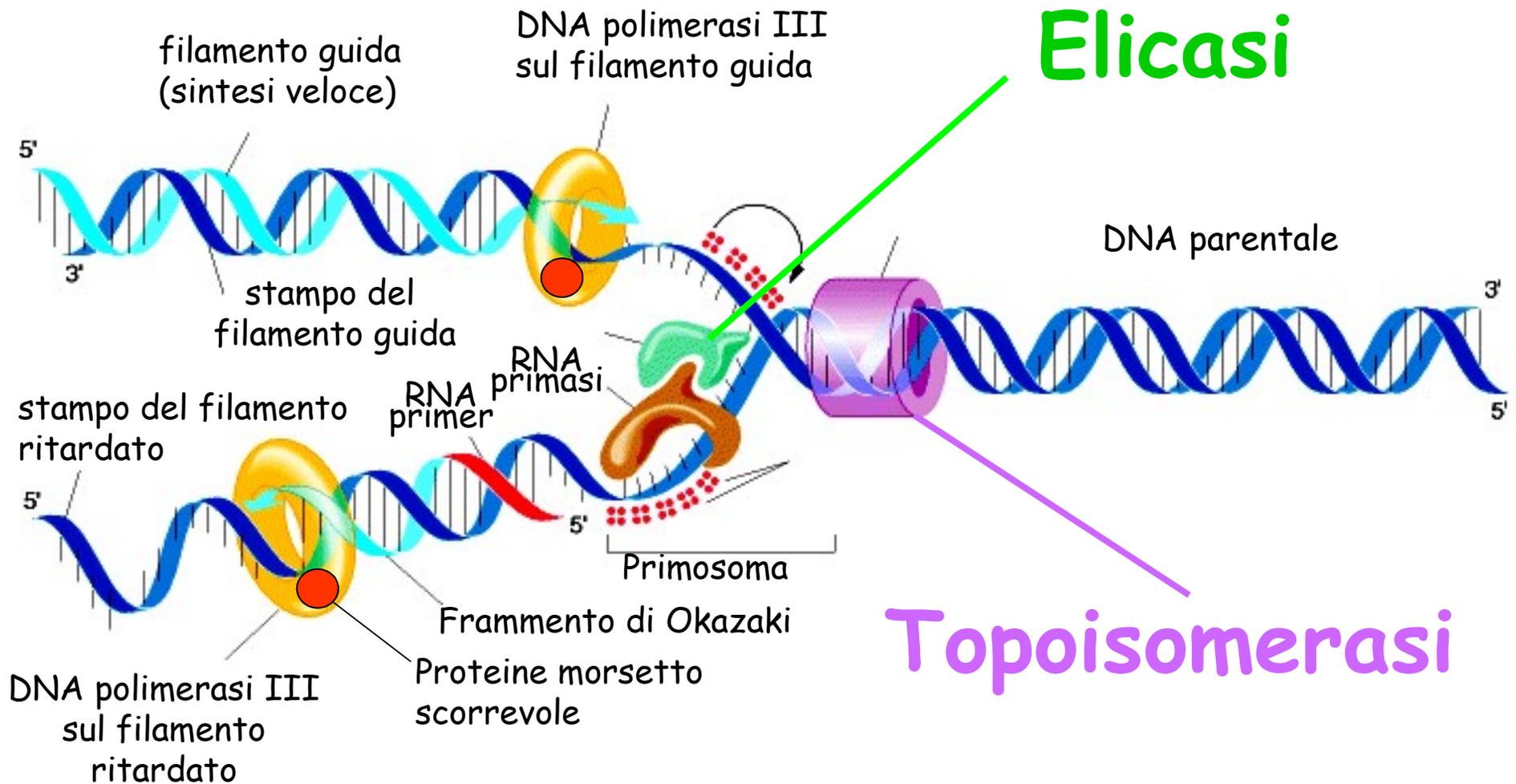
Svolgimento del DNA: le topoisomerasi

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



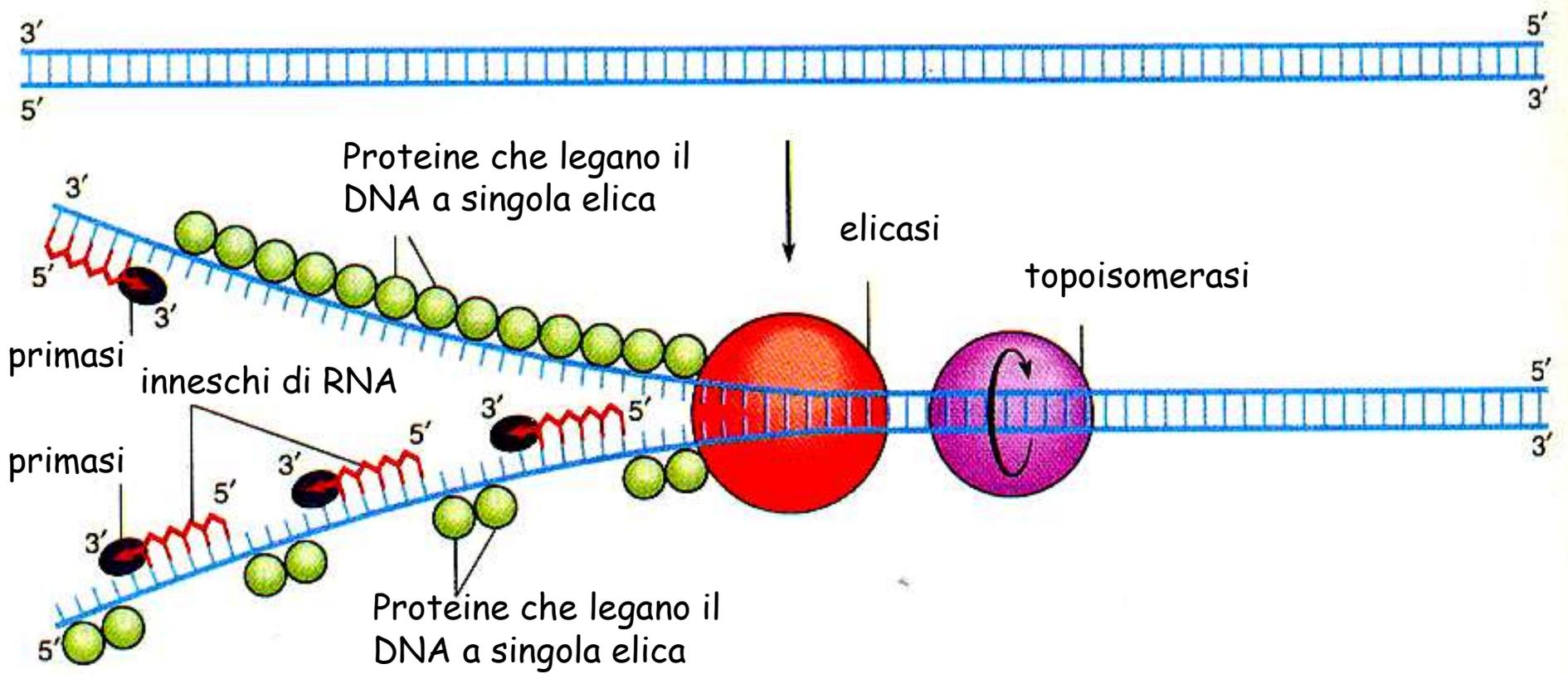
Complesso multienzimatico implicato nella replicazione del DNA



DNA primasi

ELICASI

TOPOISOMERASI



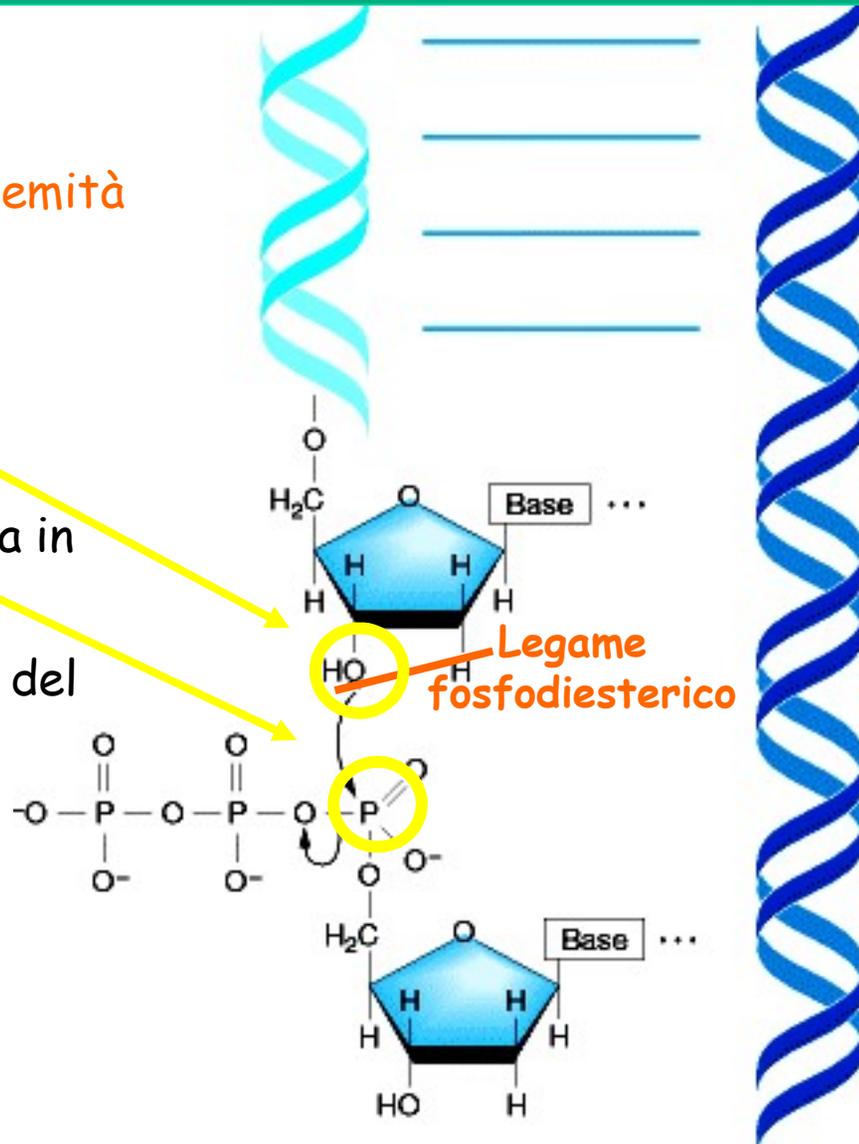
4. Reazione di allungamento della catena di DNA catalizzata dalla DNA polimerasi

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.

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

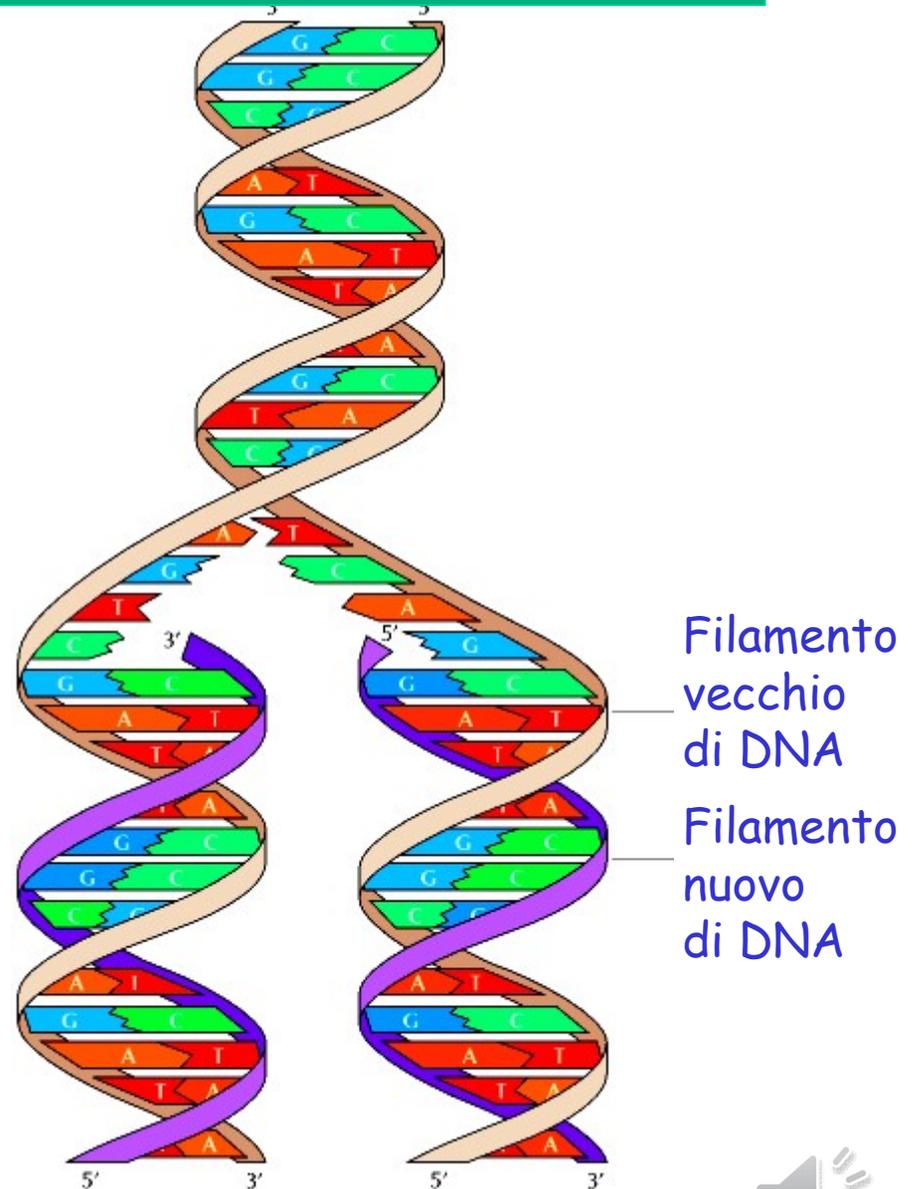
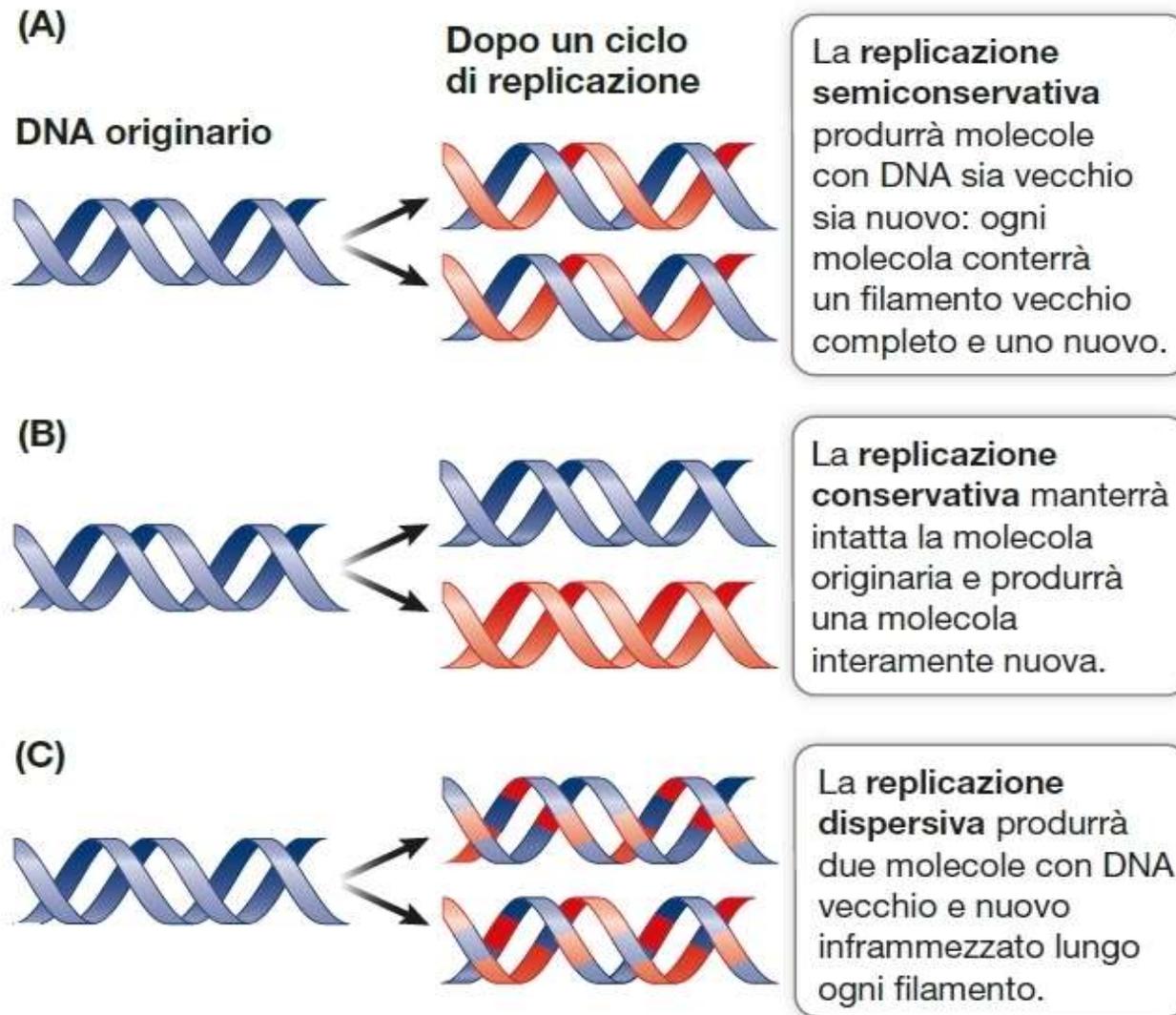


Figura 13.8 I tre modelli di replicazione del DNA In ogni modello, il DNA originario è colorato in blu, mentre quello neosintetizzato è in rosso.



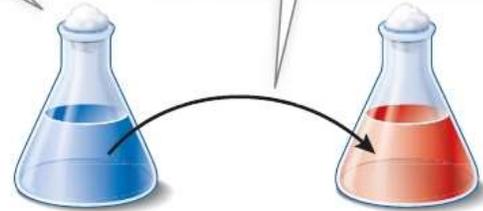
ESPERIMENTO DI MESELSON –STAHL

Verificarono il meccanismo della replicazione semiconservativa

METODO

1 Si allestiscono colture batteriche in un terreno contenente ^{15}N (azoto pesante).

2 Si trasferiscono alcuni batteri in un terreno contenente ^{14}N (leggero); la crescita batterica continua.

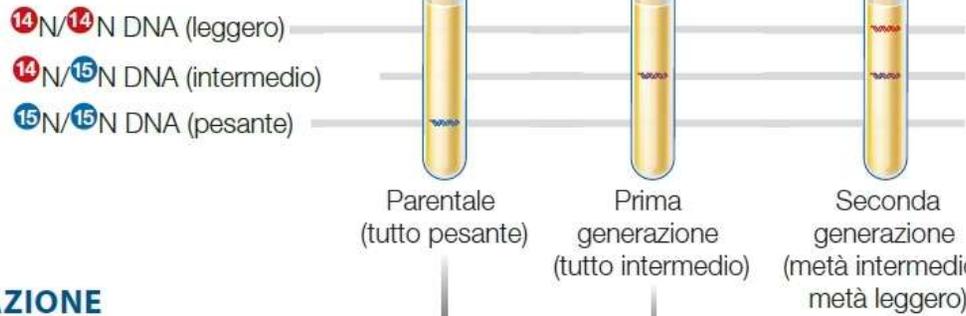


3 Si raccolgono campioni dopo 0 minuti (dopo un ciclo di replicazione) e 40 minuti (dopo due cicli di replicazione)

4 Si estrae il DNA dai batteri e lo si inserisce in una soluzione.

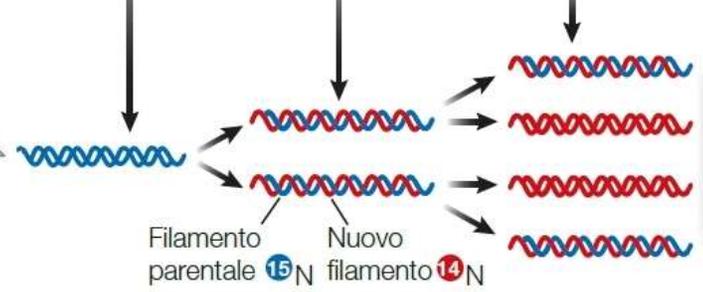
Campione a 0 minuti Campione dopo 20 minuti Campione dopo 40 minuti

RISULTATI



INTERPRETAZIONE

Prima che i batteri si riproducano per la prima volta nel substrato leggero (a 0 minuti), tutto il DNA (parentale) è pesante.

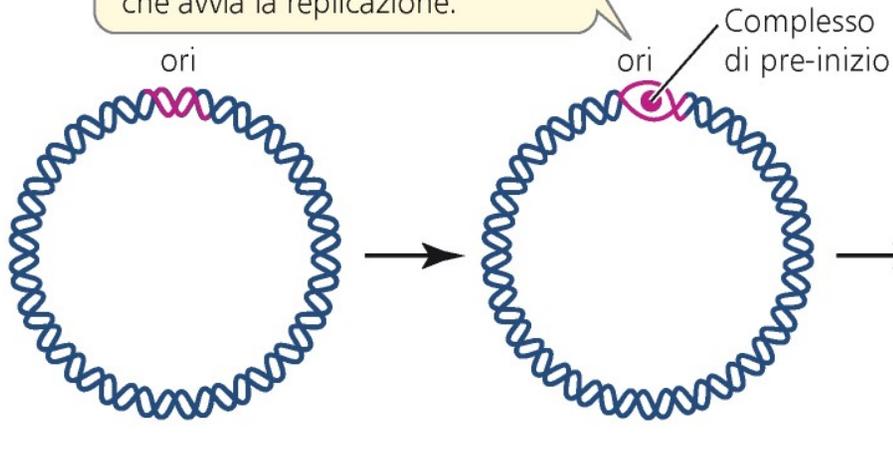


Dopo due generazioni, metà del DNA è intermedio e metà leggero; non è più presente DNA pesante.



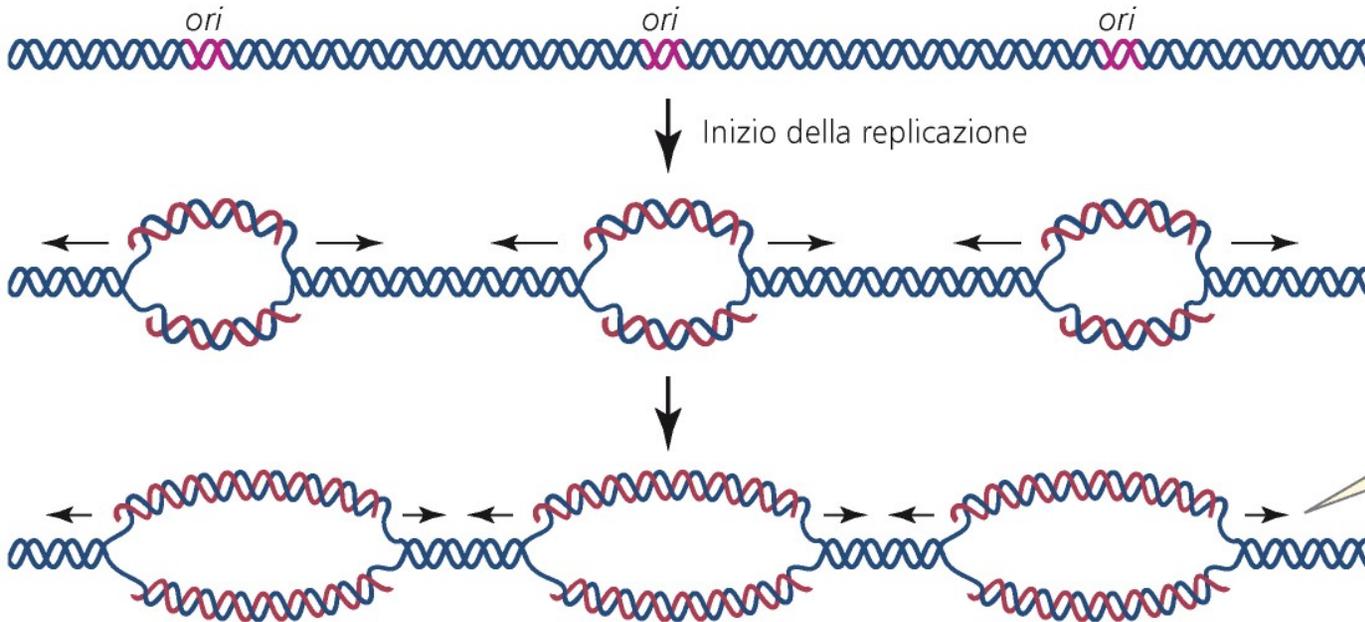
A Cromosomi procariotici

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



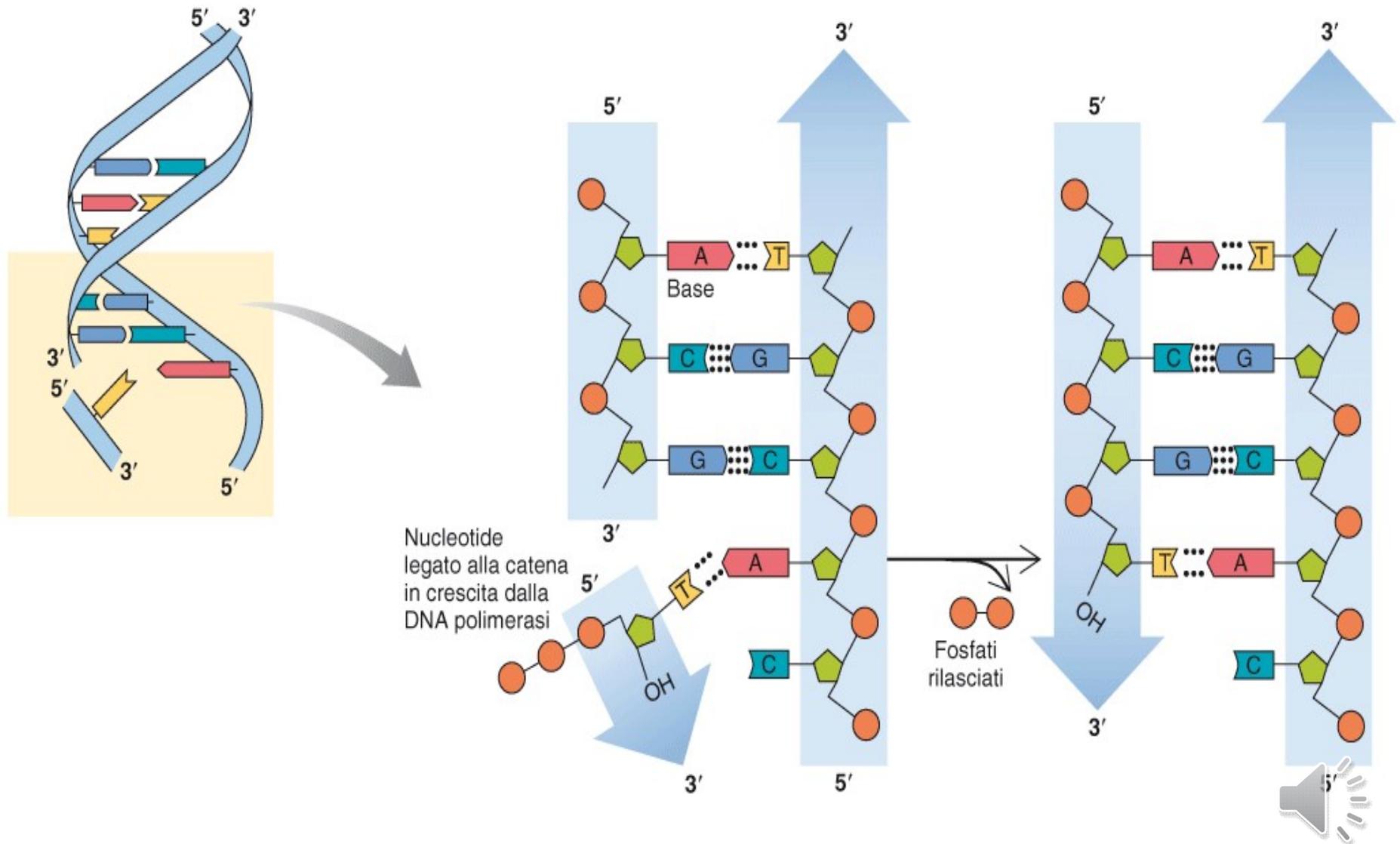
Contengono origini di replicazione multiple.

Le forcelle si muovono in direzioni opposte



FIGURA 12-13 Una visione semplificata della replicazione del DNA

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



La replicazione del DNA

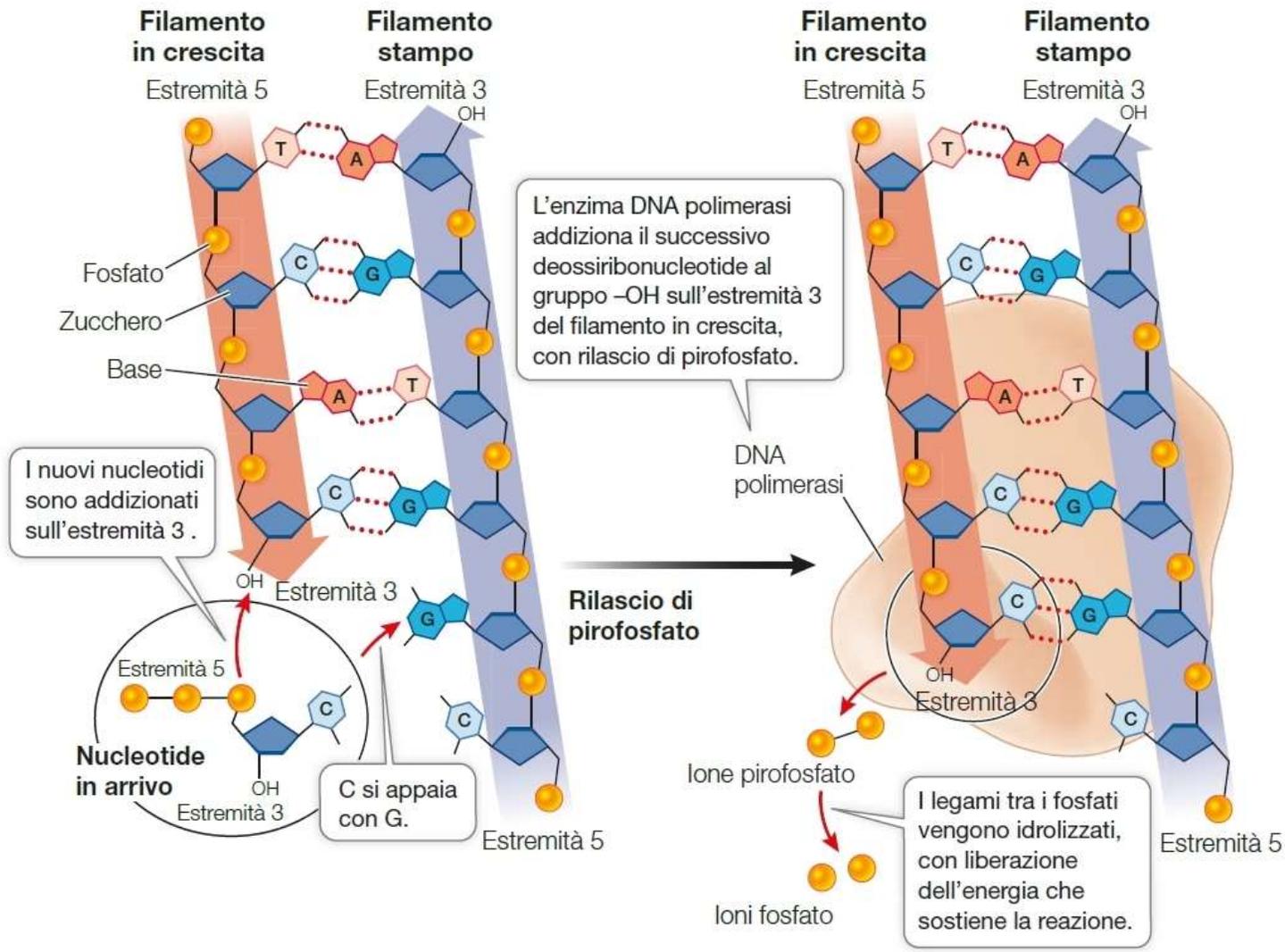


Figura 13.9 Ogni nuovo filamento di DNA cresce per addizione di nucleotidi dalla sua estremità 5' all'estremità 3'. Il filamento di DNA (qui sulla destra e ombreggiato in blu) fa da stampo per la sintesi del filamento complementare (qui a sinistra e ombreggiato in rosa). Il diagramma rappresenta l'addizione di dCTP (cerchiato).



Panoramica sulla replicazione del DNA

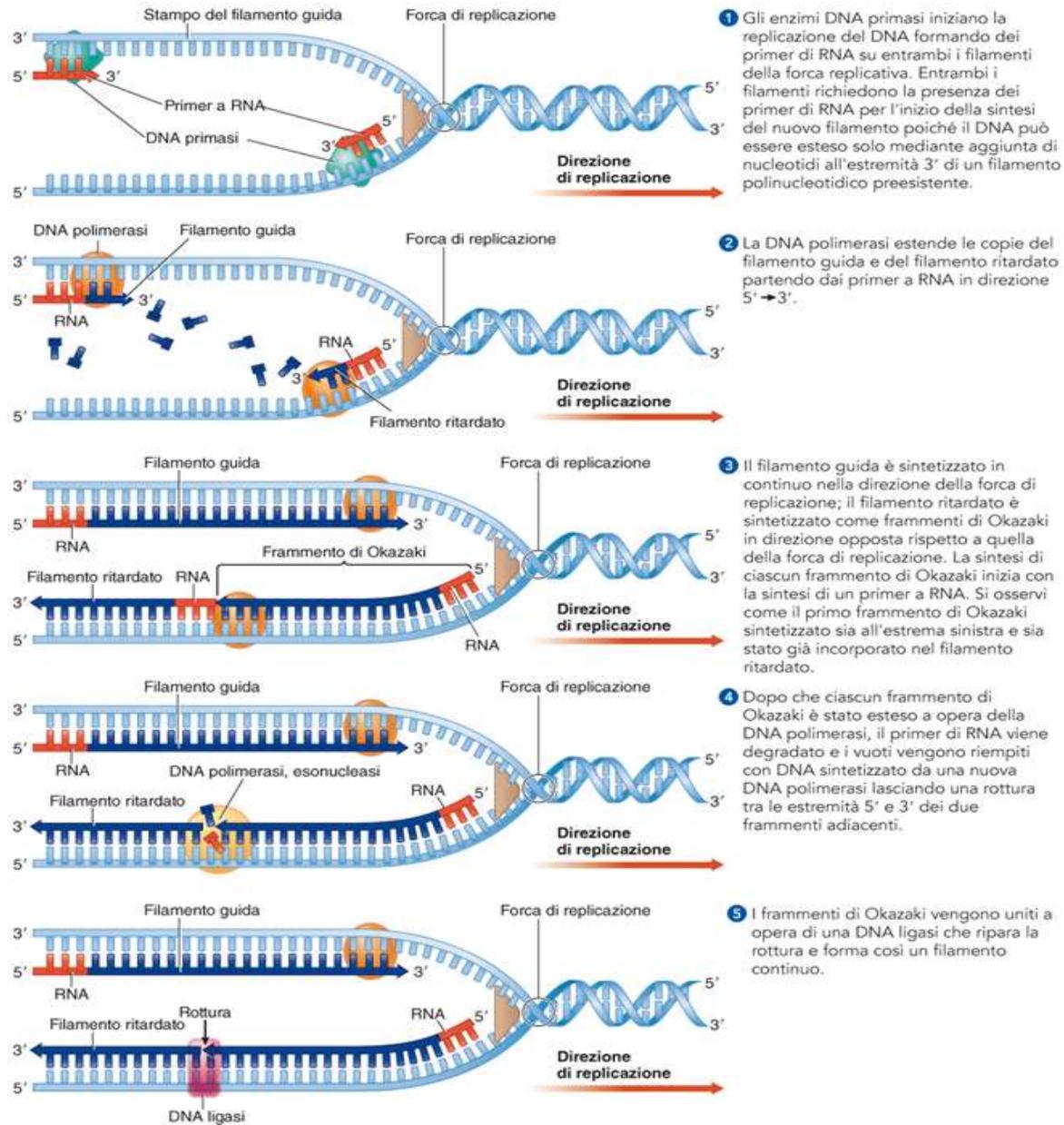


Figura 12-15 Panoramica sulla replicazione del DNA



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

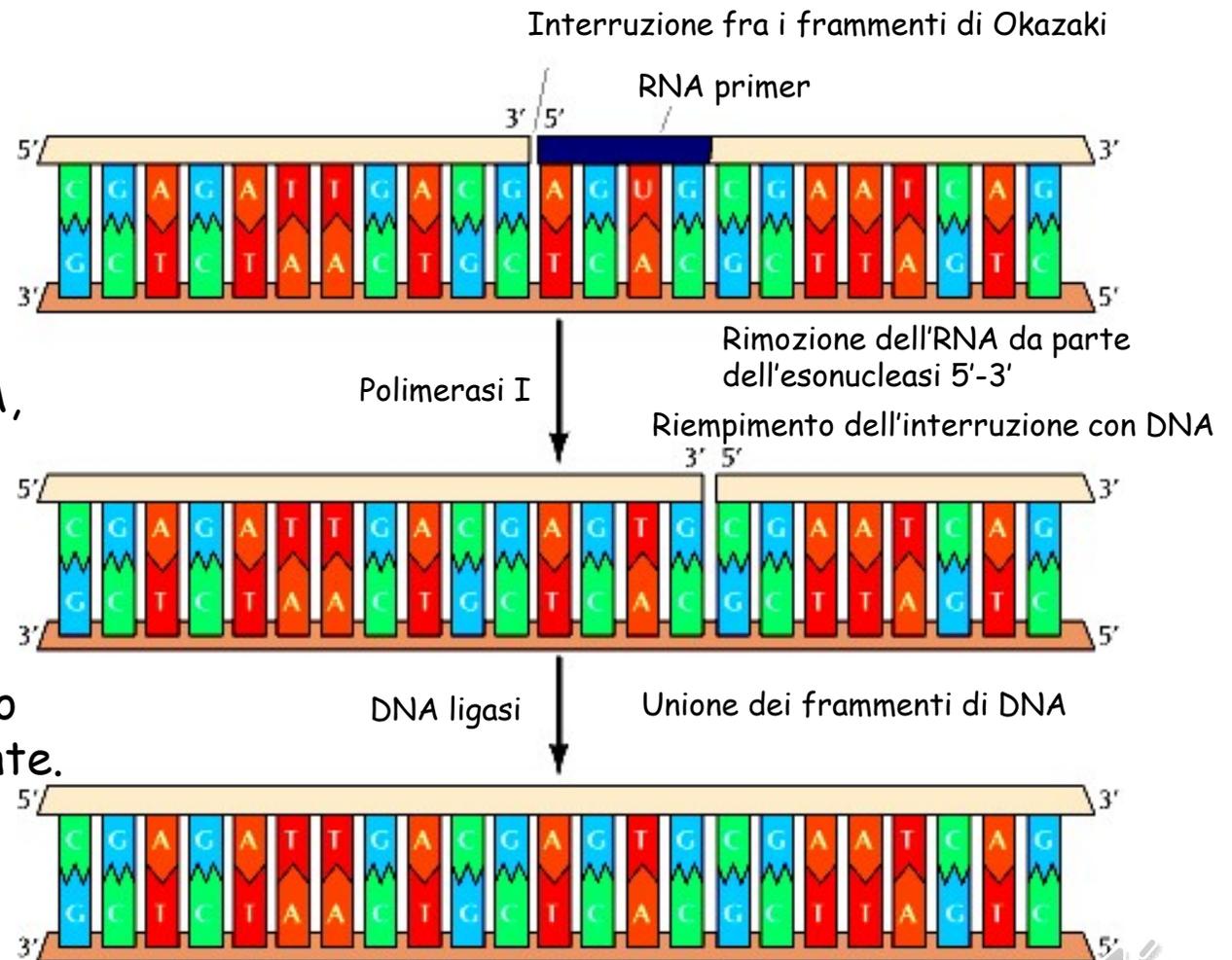


Figura 13.15 La storia del filamento ritardato Nei batteri, la DNA polimerasi I e la DNA ligasi cooperano con la DNA polimerasi III per portare a termine il compito complesso di sintetizzare il filamento ritardato.

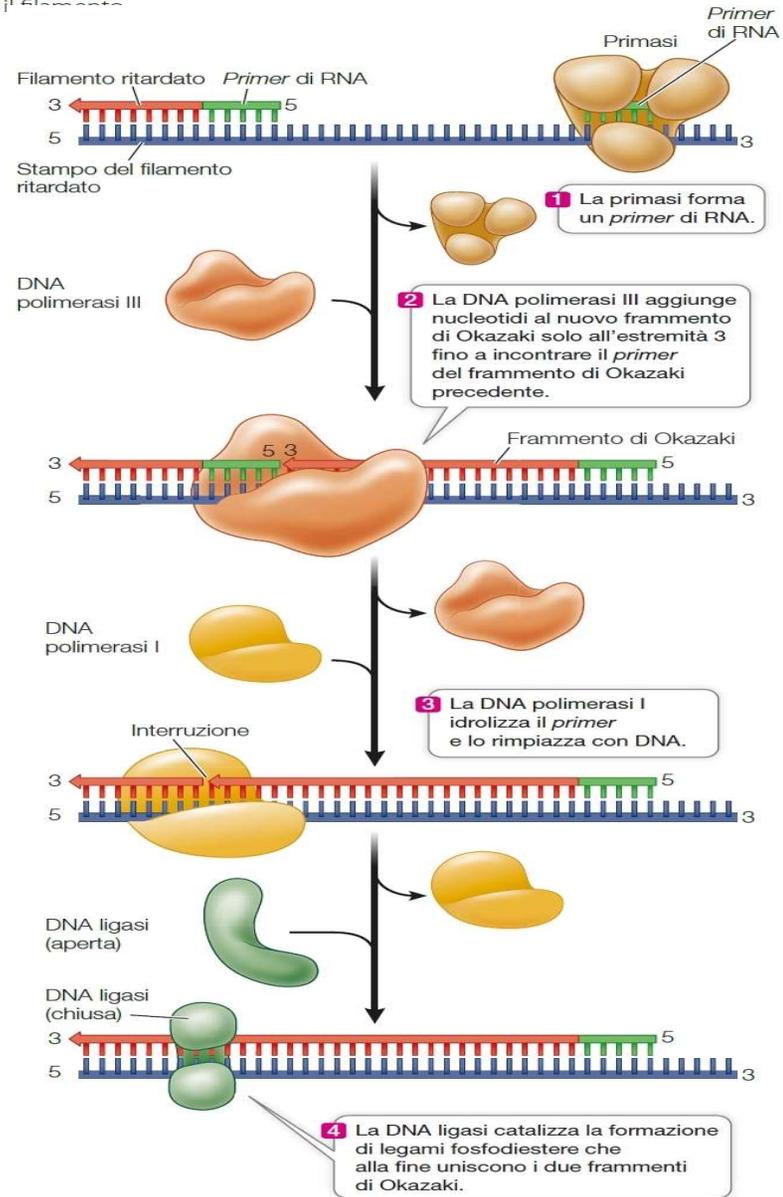


Figura 13.15 La storia del filamento ritardato Nei batteri, la DNA polimerasi I e la DNA ligasi cooperano con la DNA polimerasi III per portare a termine il compito complesso di sintetizzare il filamento ritardato.



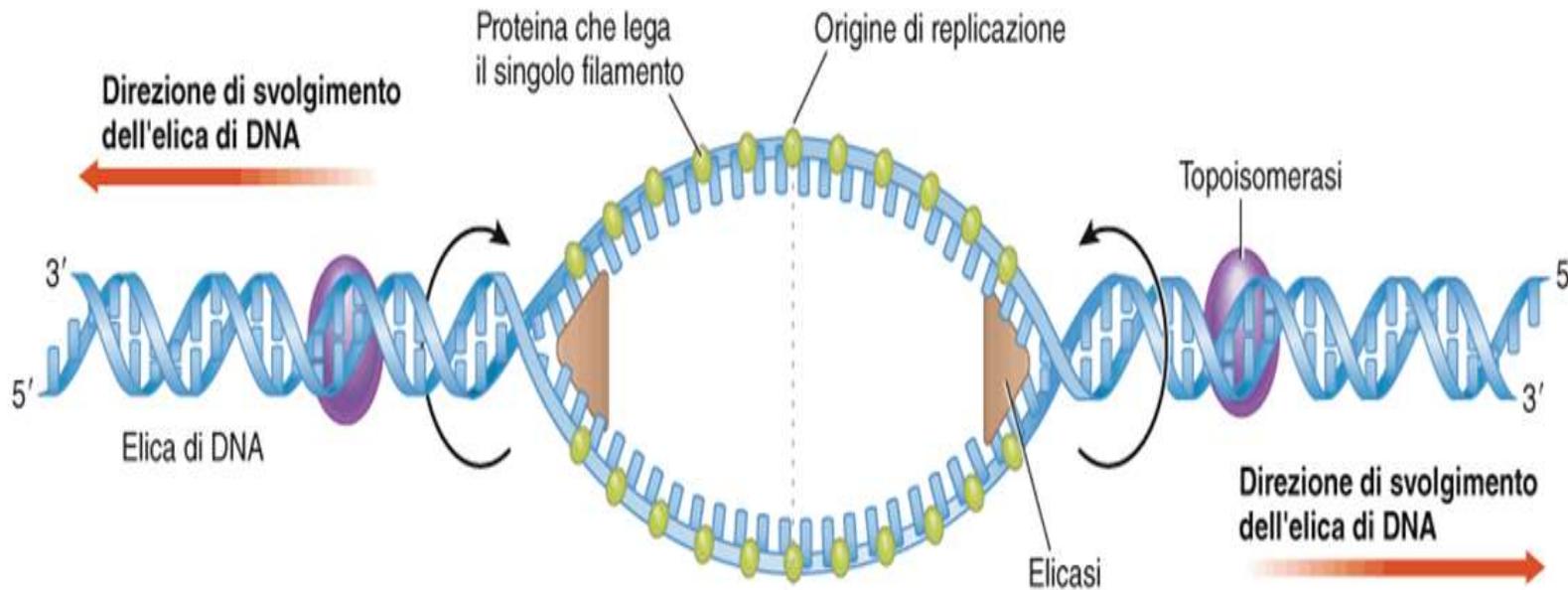


Figura 12-13 La separazione dei filamenti di DNA durante la replicazione

I filamenti di DNA si separano a livello dell'origine di replicazione grazie all'azione di una DNA elicasi ATP-dipendente che crea una "bolla di replicazione" con una forca di replicazione a forma di Y a ognuna delle due estremità della bolla. Le proteine che legano il singolo filamento si dispongono sui due filamenti singoli per evitare la riformazione dell'elica. Lo svolgimento dei filamenti determina la formazione di superavvolgimenti a valle della forca replicativa. Gli enzimi topoisomerasi eliminano questi superavvolgimenti operando tagli, svolgimenti e rigiunzioni dei filamenti appaiati.



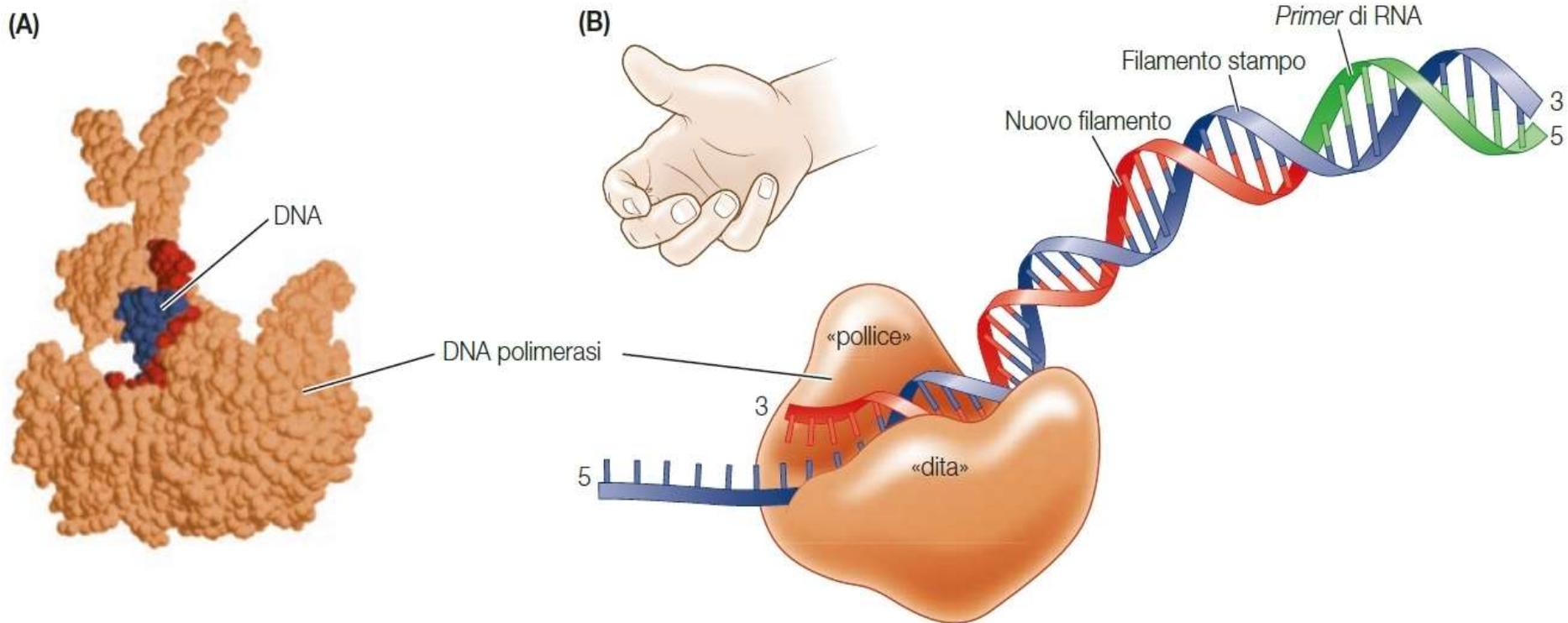


Figura 13.12 La DNA polimerasi si lega al filamento stampo

(A) L'enzima DNA polimerasi (in chiaro) è molto più grande della molecola di DNA (rossa e blu). (B) La DNA polimerasi è fatta

a forma di mano, e da questo punto di vista, le sue «dita» possono essere immaginate avvolgersi attorno al DNA. Queste «dita» possono riconoscere le diverse forme delle quattro basi azotate.



► FIGURA CHIAVE

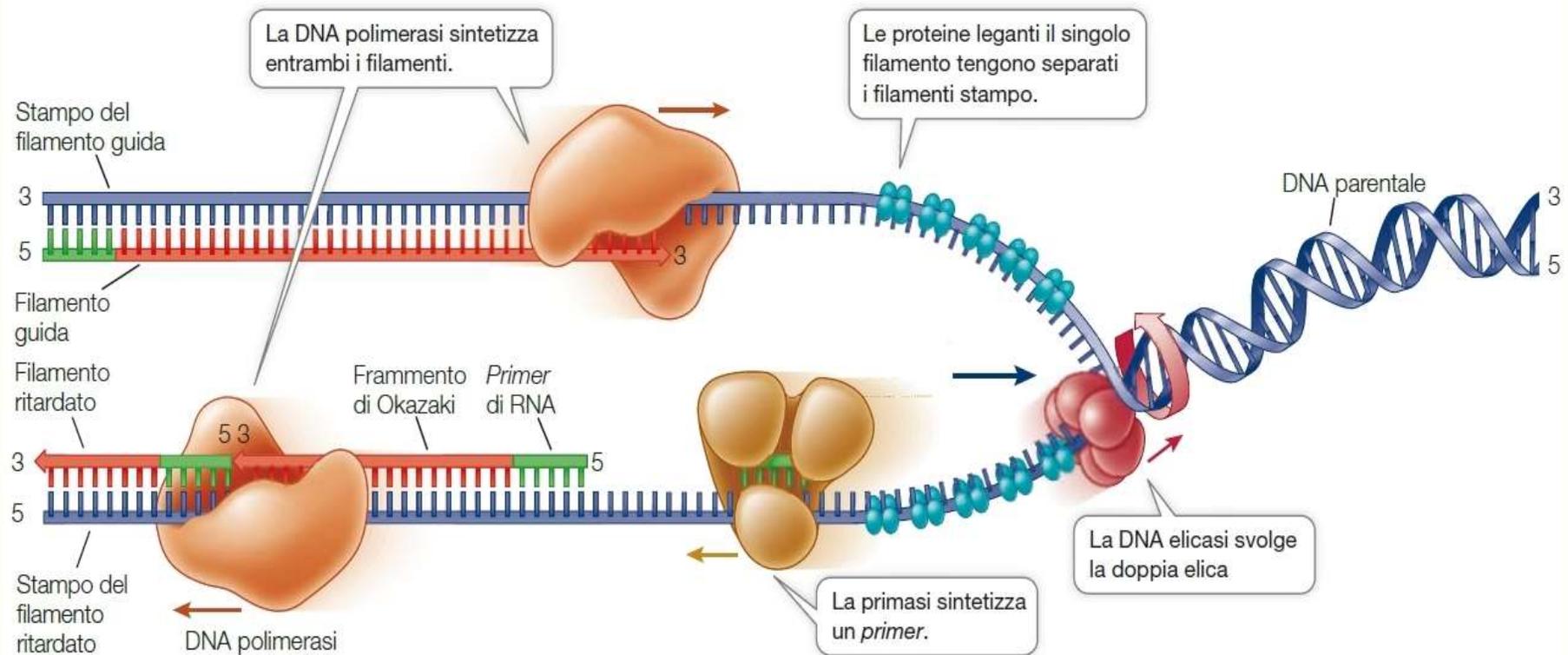
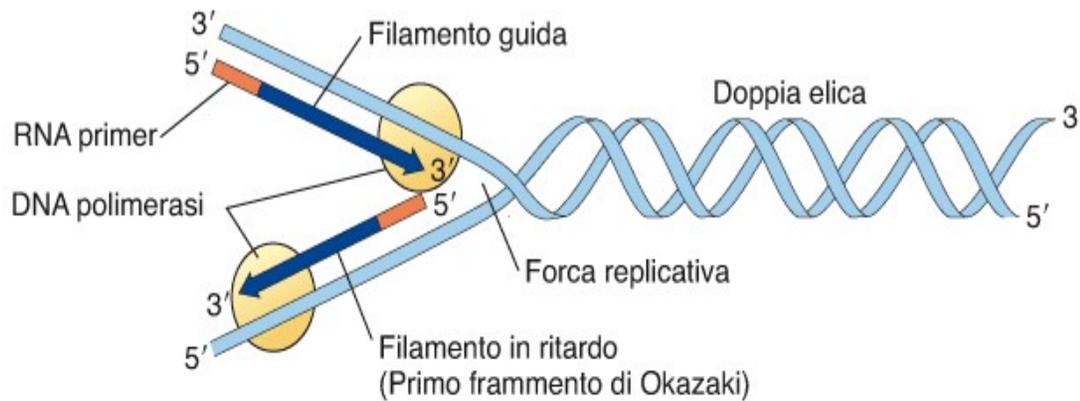


Figura 13.13 Molte proteine collaborano nel complesso di replicazione Diverse proteine, oltre alla DNA polimerasi, sono implicate nella replicazione del DNA. Le due molecole di DNA polimerasi mostrate qui sono infatti parte dello stesso complesso.

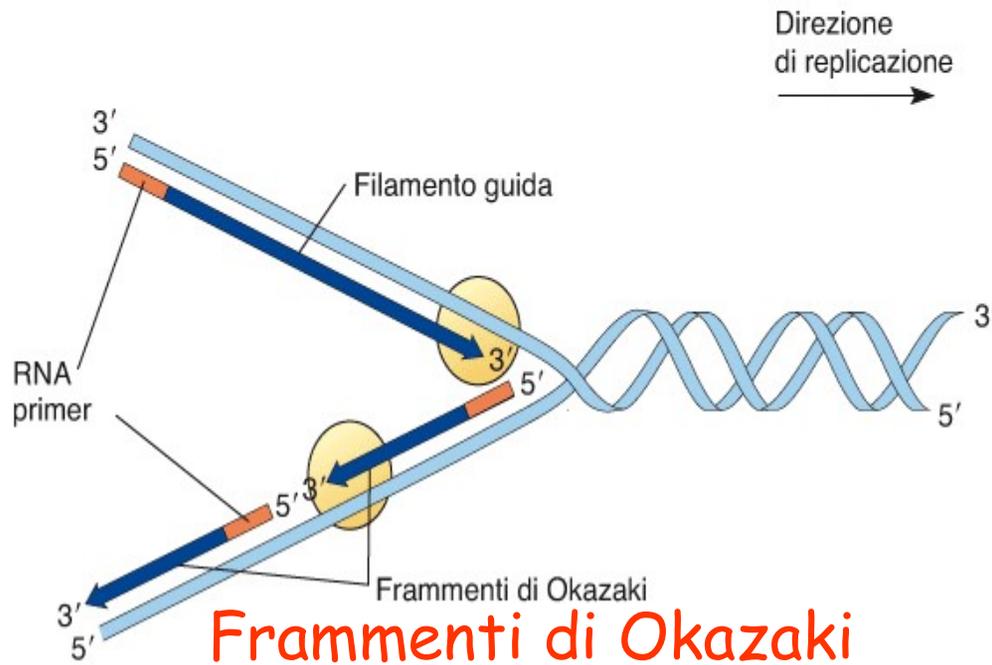
? Nella replicazione bidirezionale da un singolo punto di partenza, con le due forcelle di replicazione che si muovono lungo versi opposti, i singoli filamenti di DNA saranno *leading* o *lagging*?

▶ Attività 13.1 **Il complesso di replicazione**
The Replication Complex





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.



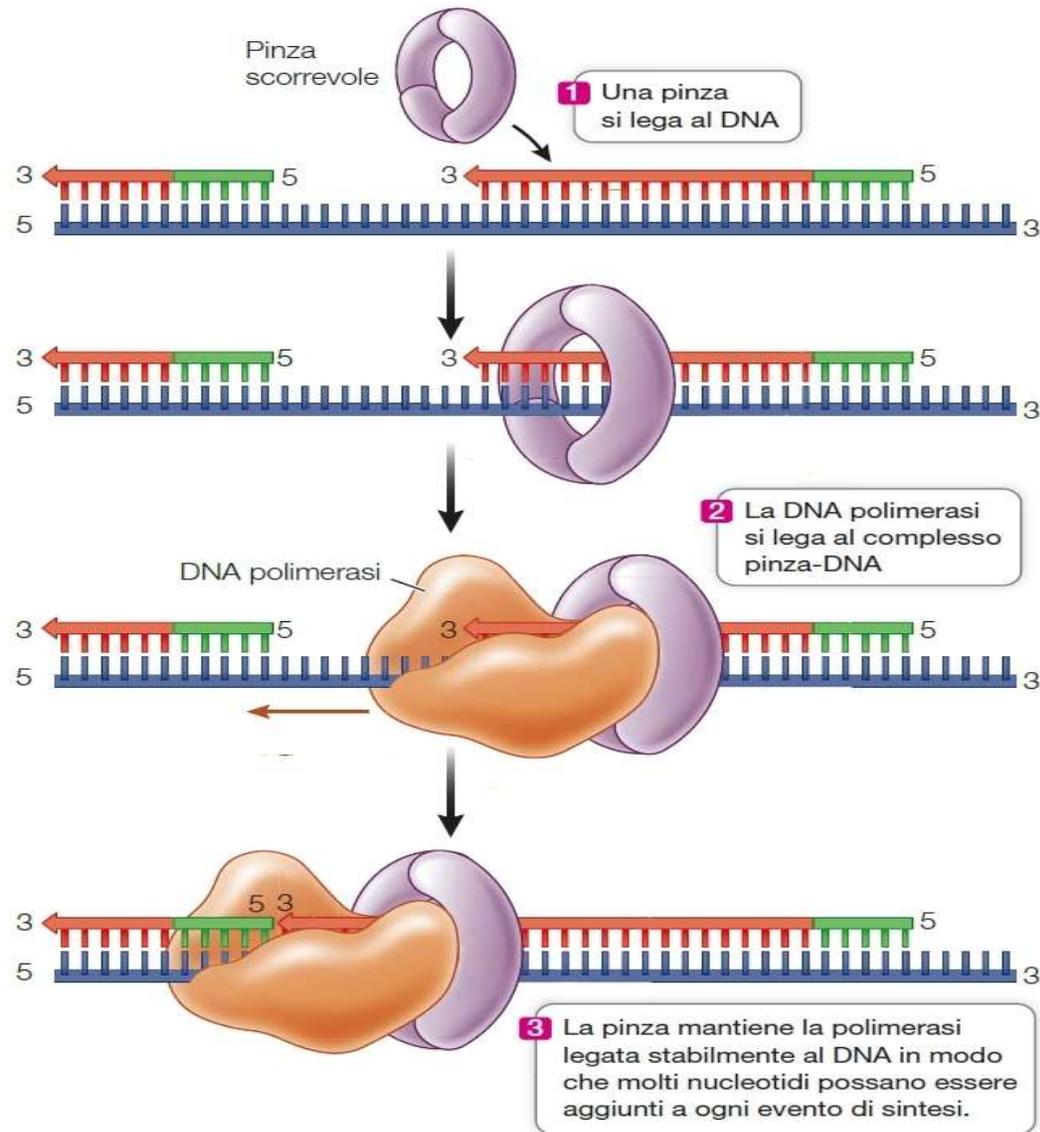


Figura 13.16 Una pinza scorrevole aumenta l'efficienza della polimerizzazione del DNA La pinza aumenta l'efficienza di polimerizzazione mantenendo l'enzima legato al suo substrato, in modo che l'enzima non si debba ripetutamente legare al DNA stampo e al substrato.



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 e 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

Lega le subunità nucleotidiche tra loro per formare un nuovo filamento di DNA a partire da un filamento di DNA stampo.

DNA primasi

Sintetizza corti tratti di RNA (primer) sul filamento in ritardo. Avvia la replicazione del filamento guida DNA ligasi.

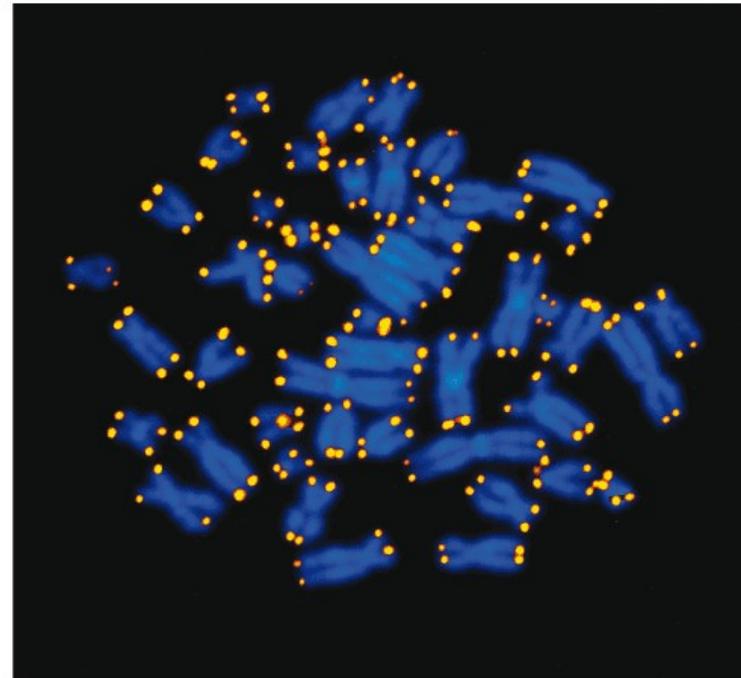
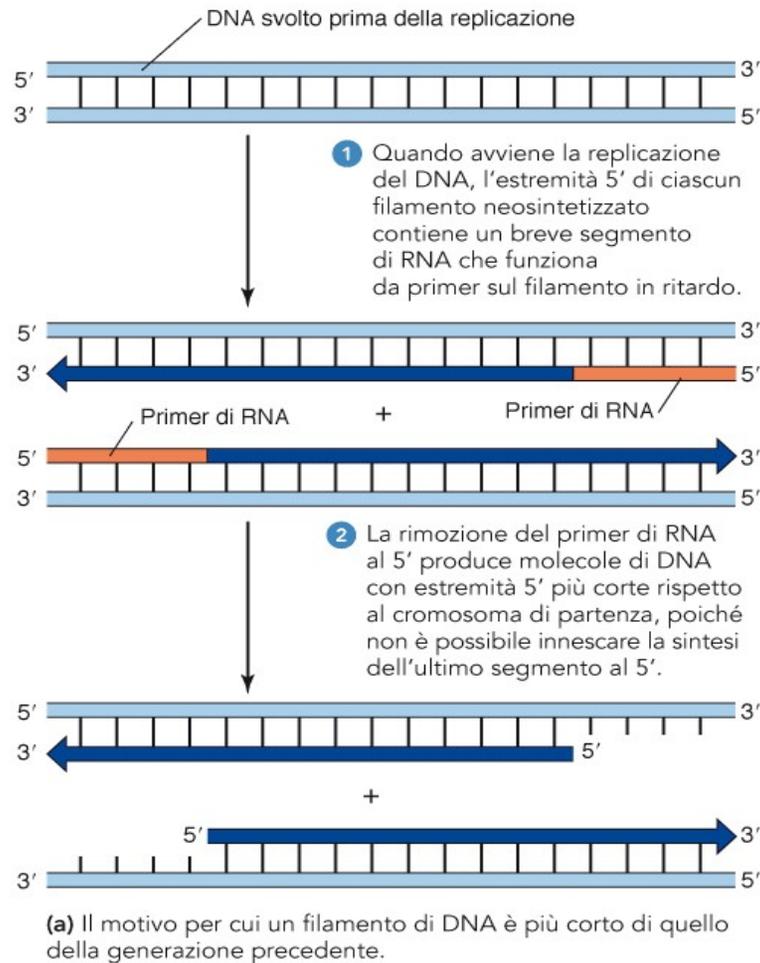
DNA ligasi

Lega tra loro i frammenti di Okazaki unendo l'estremità 3' del nuovo frammento di DNA all'estremità 5' del tratto di DNA adiacente.



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



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

FIGURA 12-18 I telomeri



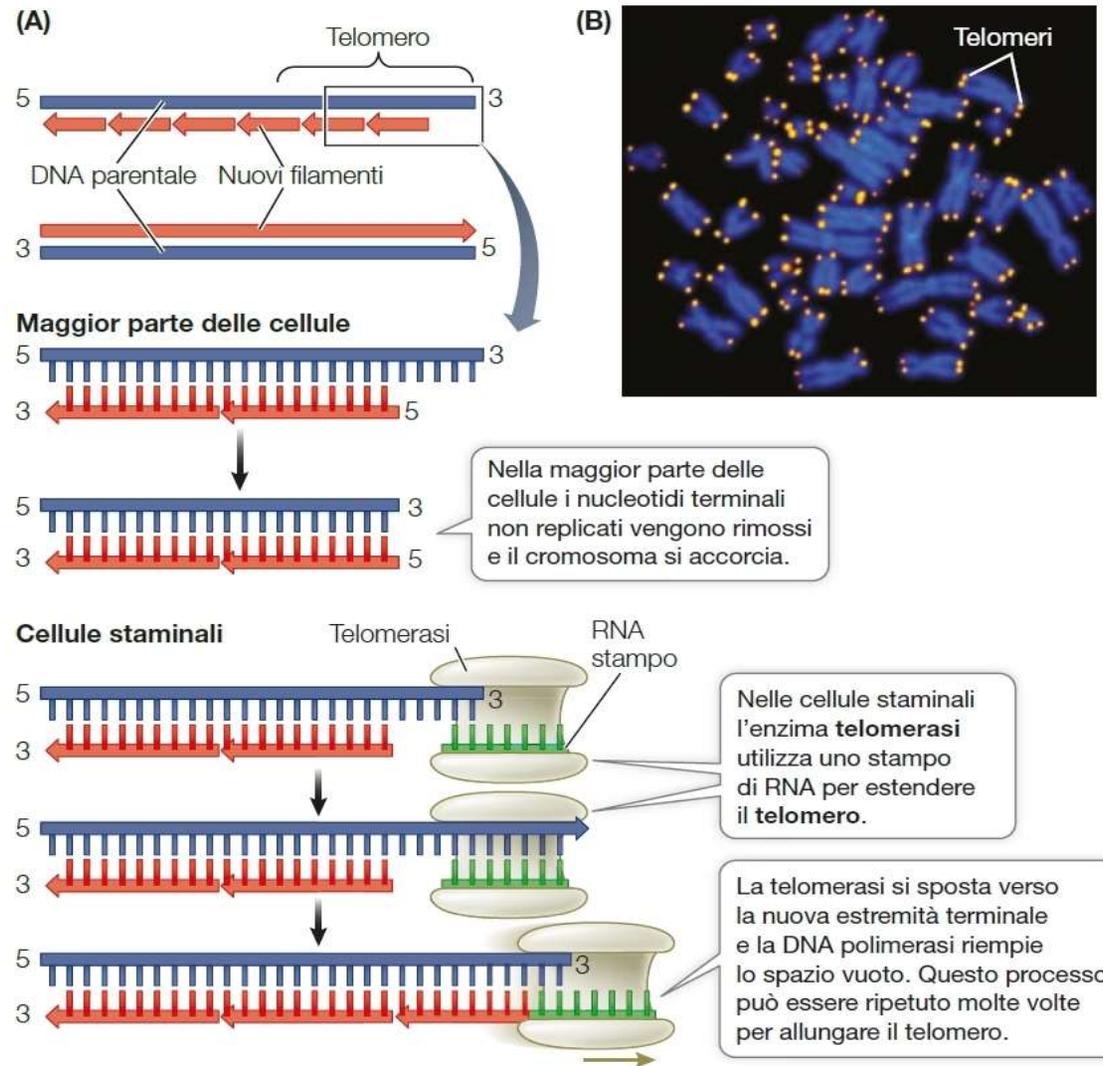


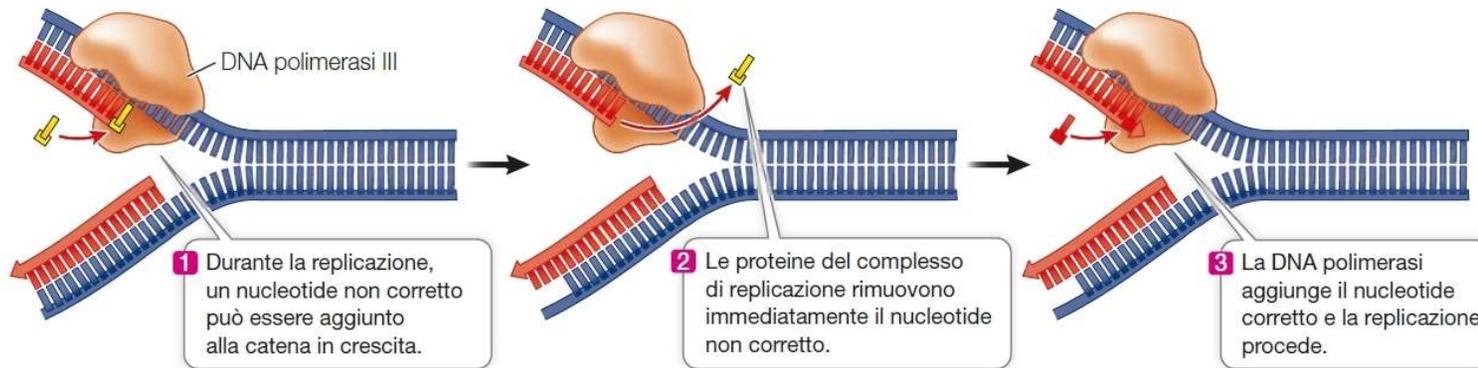
Figura 13.17 Telomeri e telomerasi (A) Nella maggior parte delle cellule, i cromosomi si accorciano a ogni replicazione perché il DNA del filamento stampo non replicato all'estremità 3' viene rimosso. Tuttavia, nelle cellule staminali, le telomerasi utilizzano degli RNA stampo per estendere il telomero e così impedire l'accorciamento del cromosoma. (B) Marcature luminose fluorescenti marcano le regioni telomeriche di questi cromosomi umani colorati in blu.



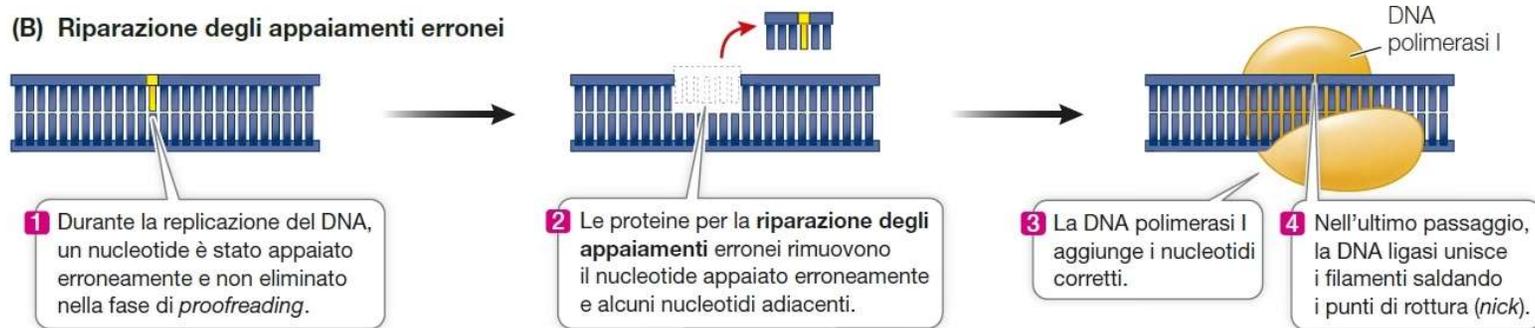
Riparazione del DNA



(A) Correzione di bozze



(B) Riparazione degli appaiamenti erranei



(C) Riparazione per escissione



Figura 13.18 Meccanismi di riparazione del DNA Le proteine del complesso di replicazione fungono anche da meccanismo di riparazione del DNA, riducendo così la quantità di errori nel DNA replicato. Un altro meccanismo (riparazione per escissione) ripara danni a molecole di DNA già esistenti.



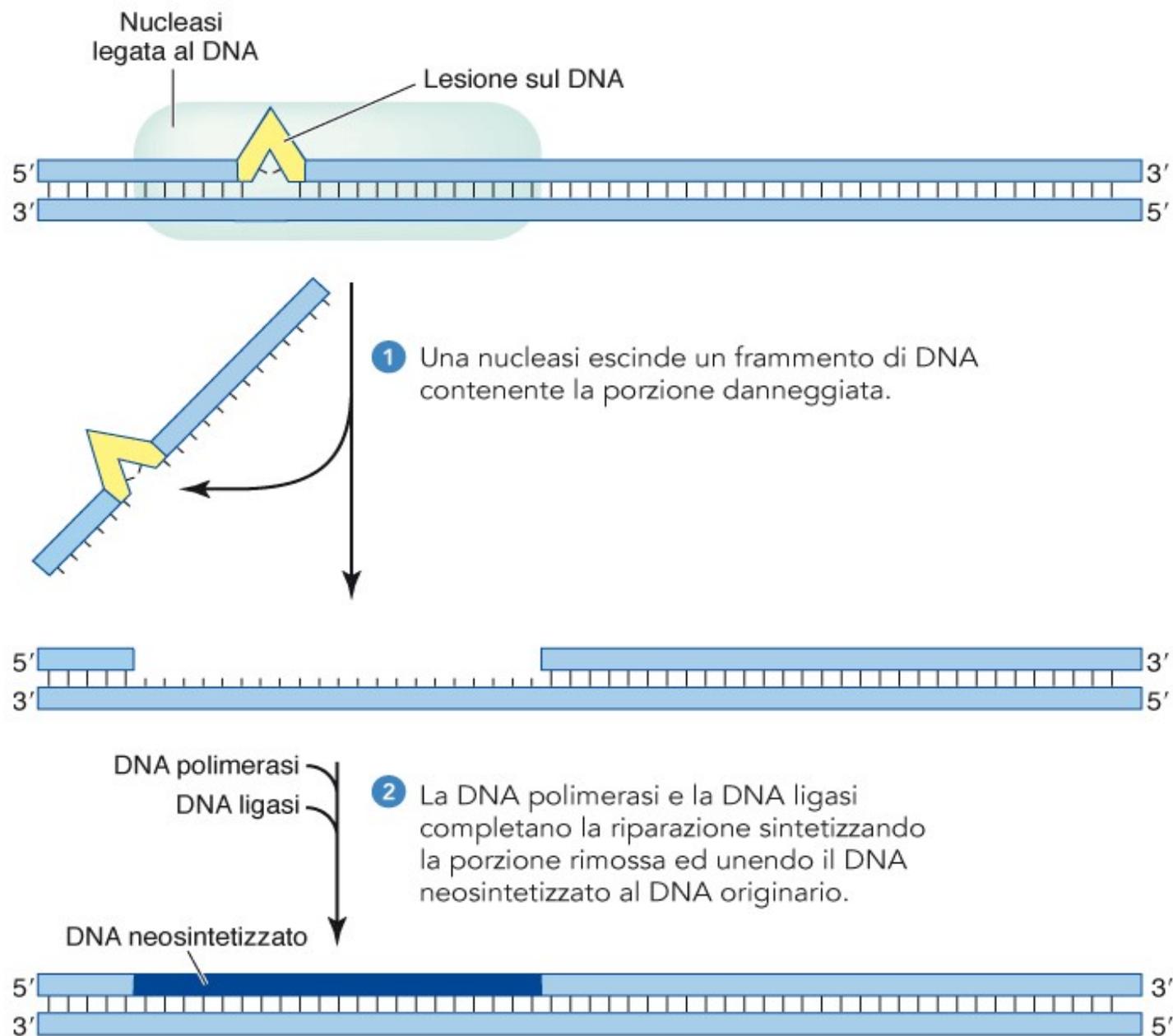


FIGURA 12-17 Riparazione per escissione nucleotidica del DNA danneggiato



Grazie dell'attenzione

