

La duplicazione del DNA



Il DNA è una doppia elica formata da due filamenti appaiati secondo il principio di appaiamento delle basi azotate complementari : A si appaia a T con due legami idrogeno e G a C si appaiano con tre legami idrogeno

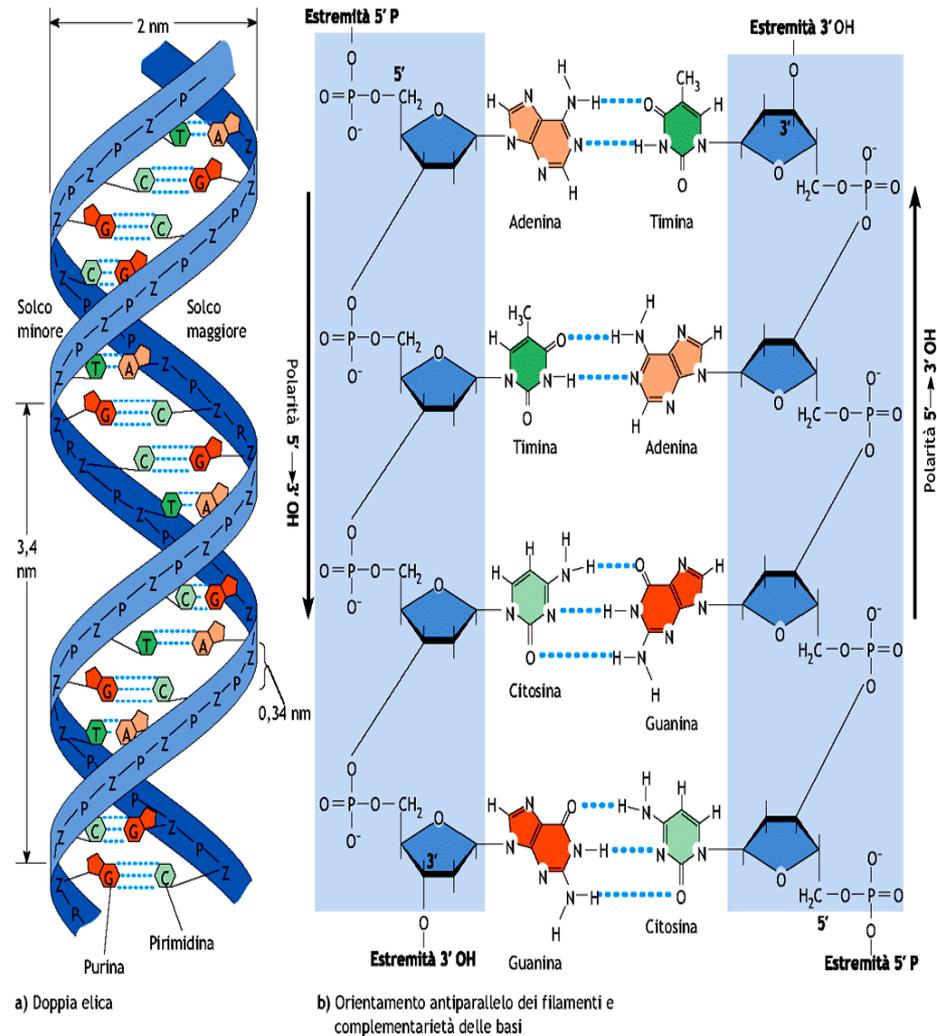
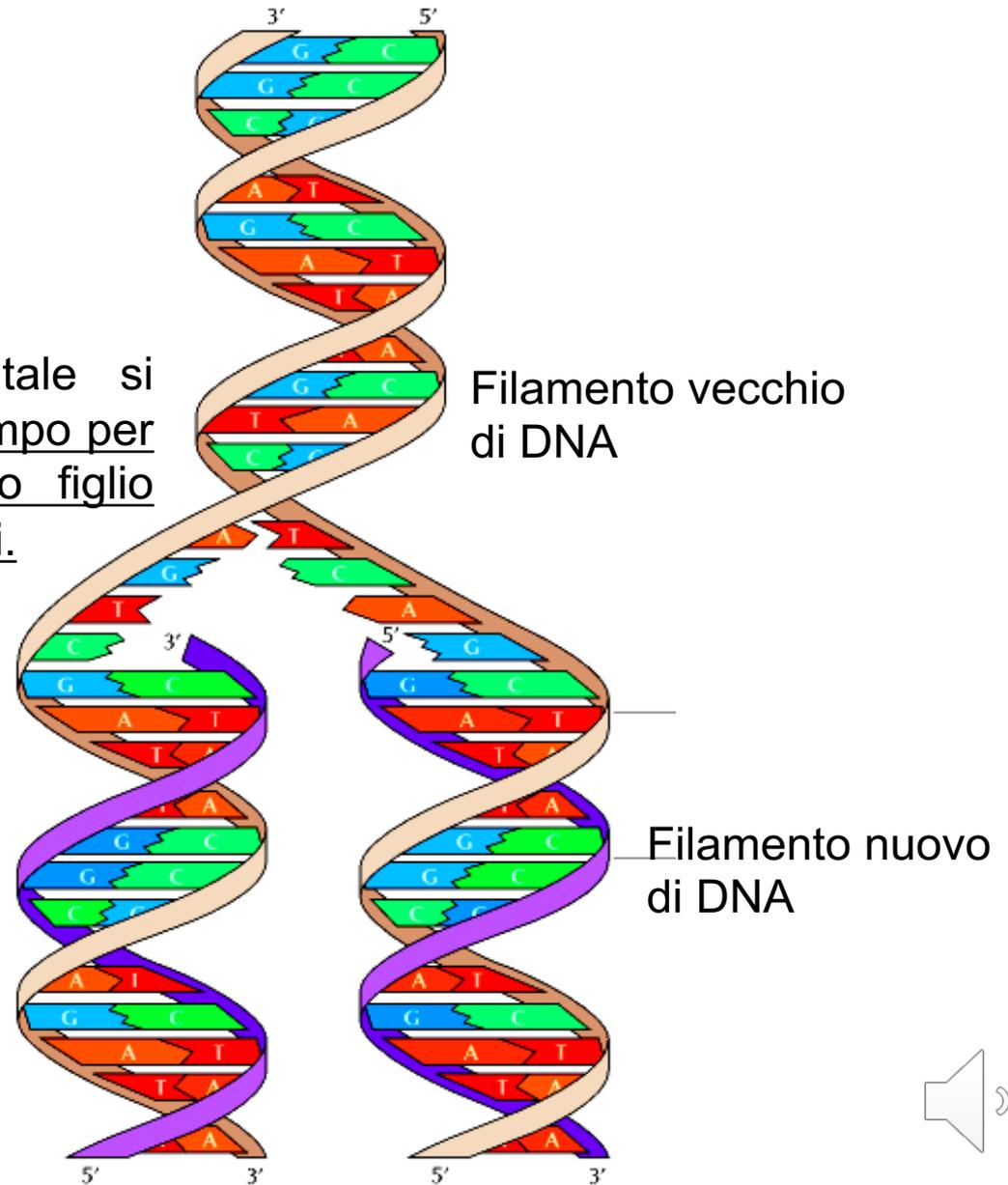


Figura 1.51 Le due eliche del DNA sono complementari e antiparallele. I legami idrogeno che si instaurano fra le basi complementari sono indicati dalle linee tratteggiate in blu. Gli accoppiamenti canonici nel DNA prevedono le coppie A=T e C=G. Nei tratti a doppia elica dell'RNA, la coppia A=T è sostituita dalla coppia A=U. Inoltre, le due eliche (che hanno polarità 5'P → 3'OH) decorrono in direzione opposta (antiparallelismo).



Replicazione del DNA avviene secondo una modalità di tipo semiconservativo

I due filamenti di DNA parentale si separano e ciascuno serve da stampo per la sintesi di un nuovo filamento figlio mediante accoppiamento delle basi.



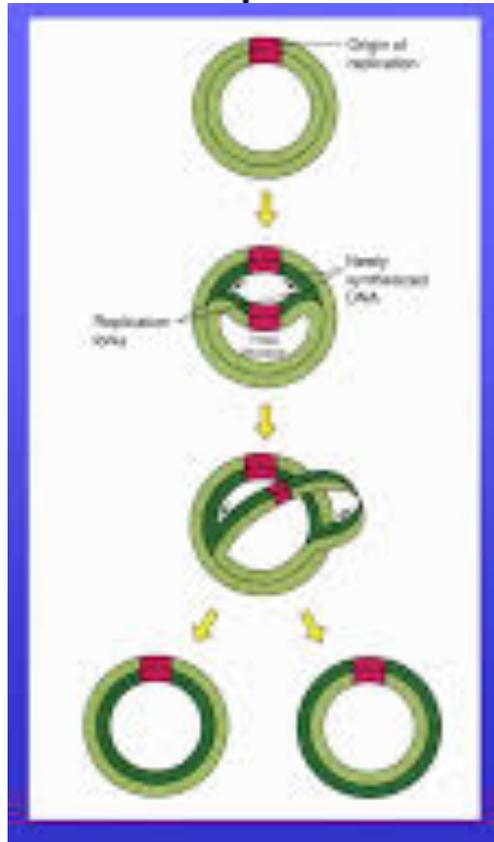
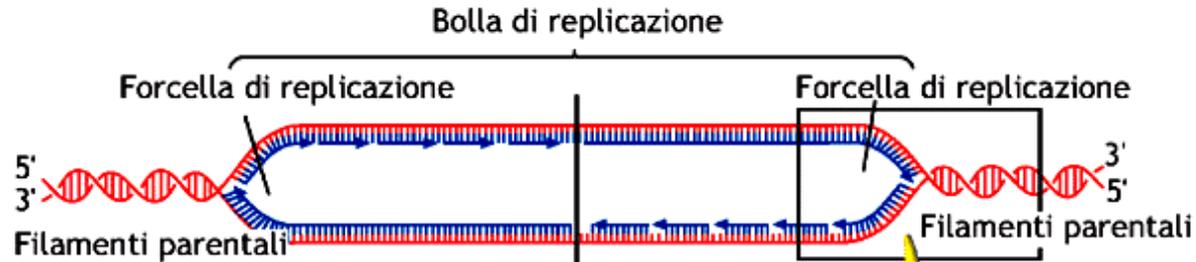
Enzimi coinvolti della duplicazione del DNA (batteri)

- Elicasi
- Topoisomerasi
- Primasi
- DNA Polimerasi III
- DNA Polimerasi I
- Ligasi

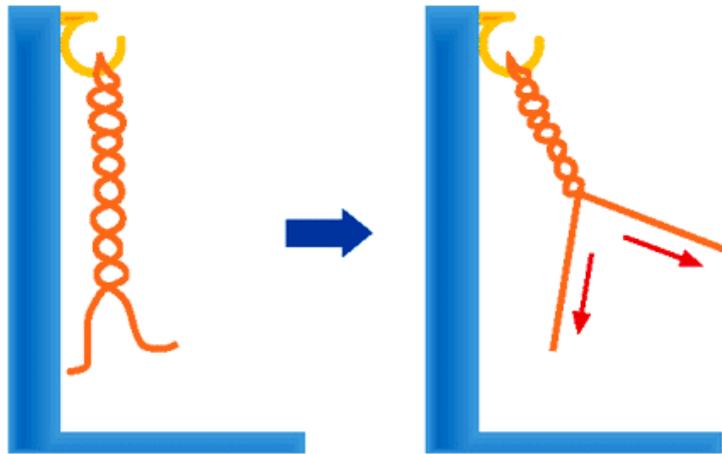
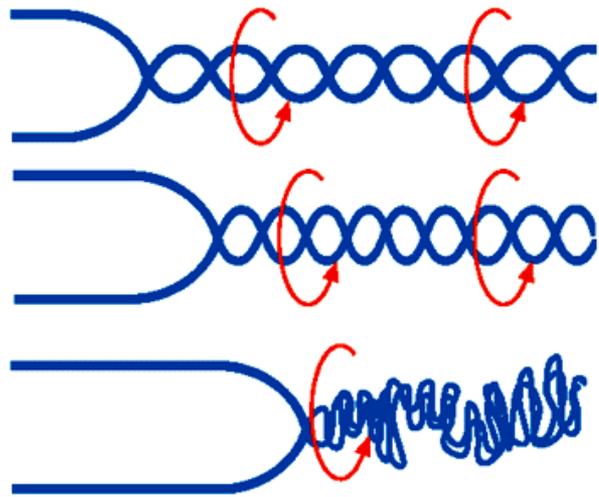


Replicazione del DNA nei procarioti: inizio

- Inizio della replicazione in **oriC** riconosciuta dalla **proteina DnaA** e procede nelle due direzioni opposte fino al completamento della sintesi dei nuovi filamenti.
- L'interazione richiama **l'elicasi** in un sito adiacente ricco di AT interazione **necessaria per apertura della doppia elica**.



Replicazione del DNA: topoisomerasi



■ **Figura 4.6** Il procedere della forcella di replicazione provoca un movimento di torsione della molecola del DNA e quindi il suo superavvolgimento come quando si vuole svolgere una corda a due capi con una delle estremità attaccata ad un uncino.

I

a)

b)

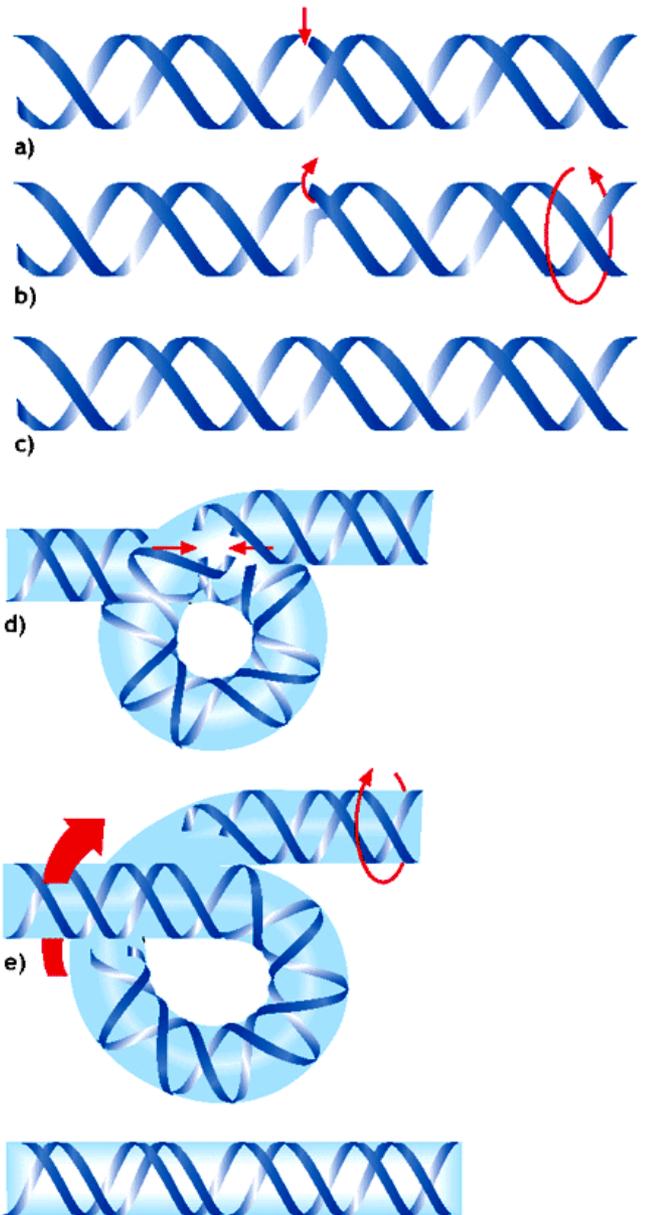
c)

II

d)

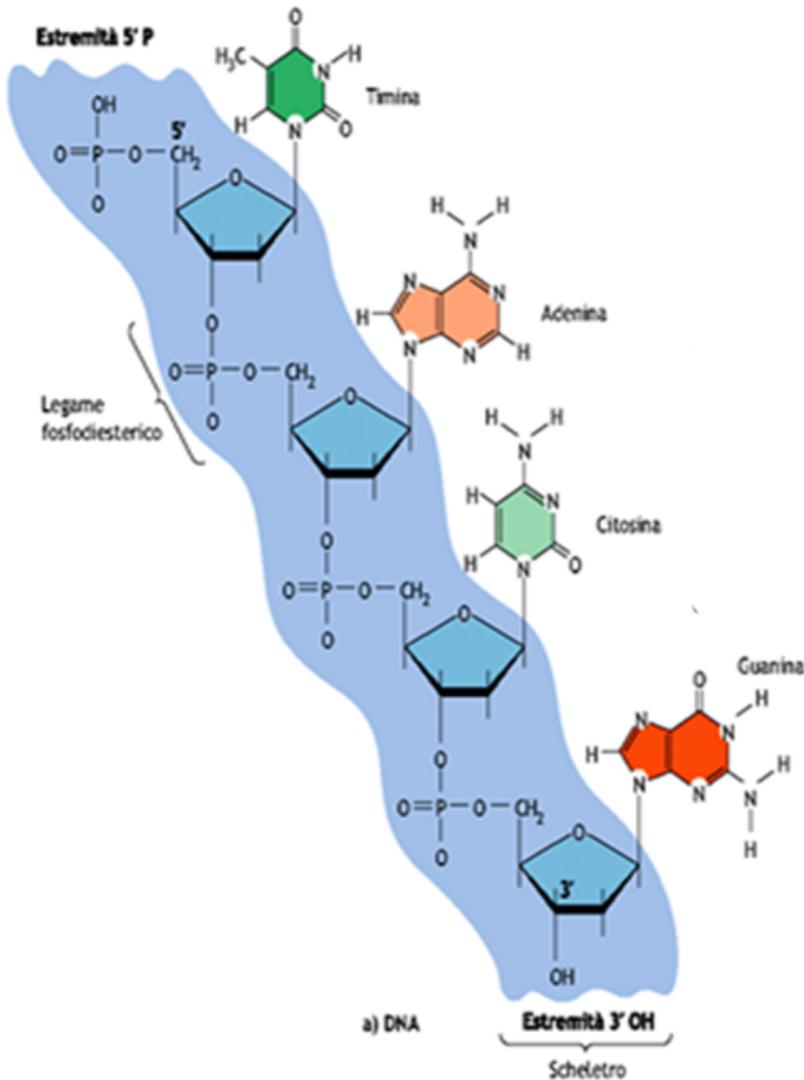
e)

f)



■ **Figura 4.7** (a-b-c) L'azione della topoisomerasi I: l'enzima introduce un singolo taglio, in seguito la molecola viene risaldata. (d-e-f) L'azione della topoisomerasi II: l'enzima introduce una rottura in entrambi i filamenti, in seguito la molecola viene risaldata.

Tutte le DNA polimerasi note hanno due proprietà fondamentali in comune che hanno implicazioni fondamentali per la replicazione del DNA:



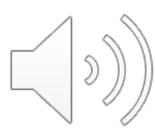
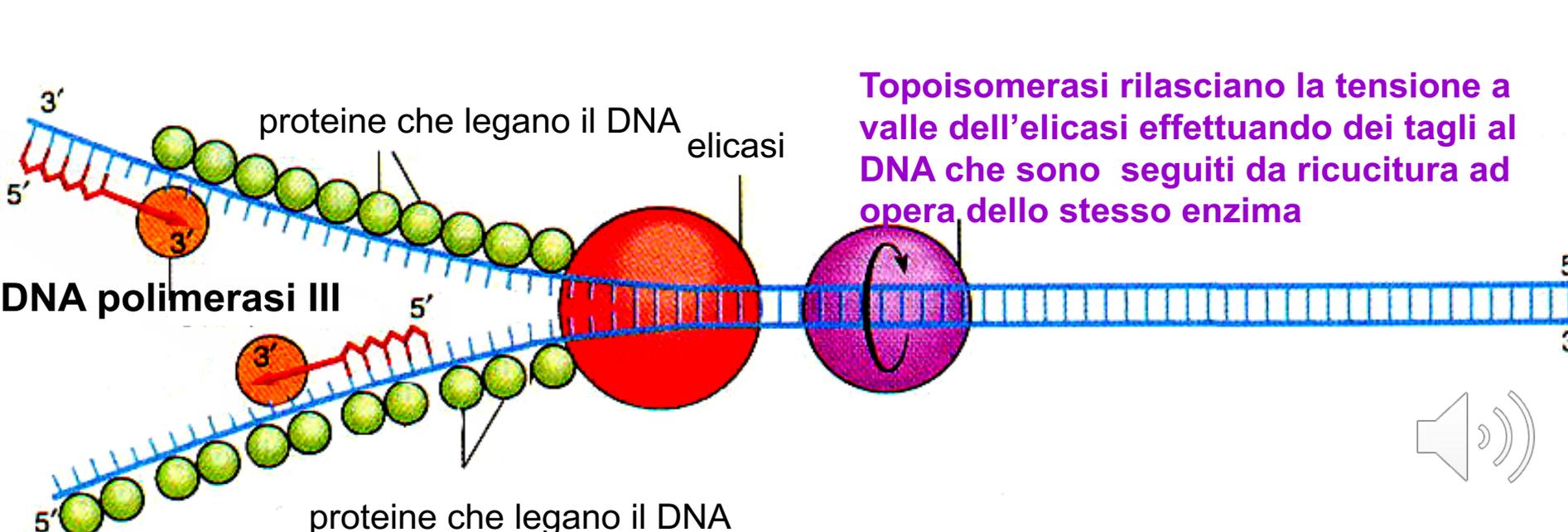
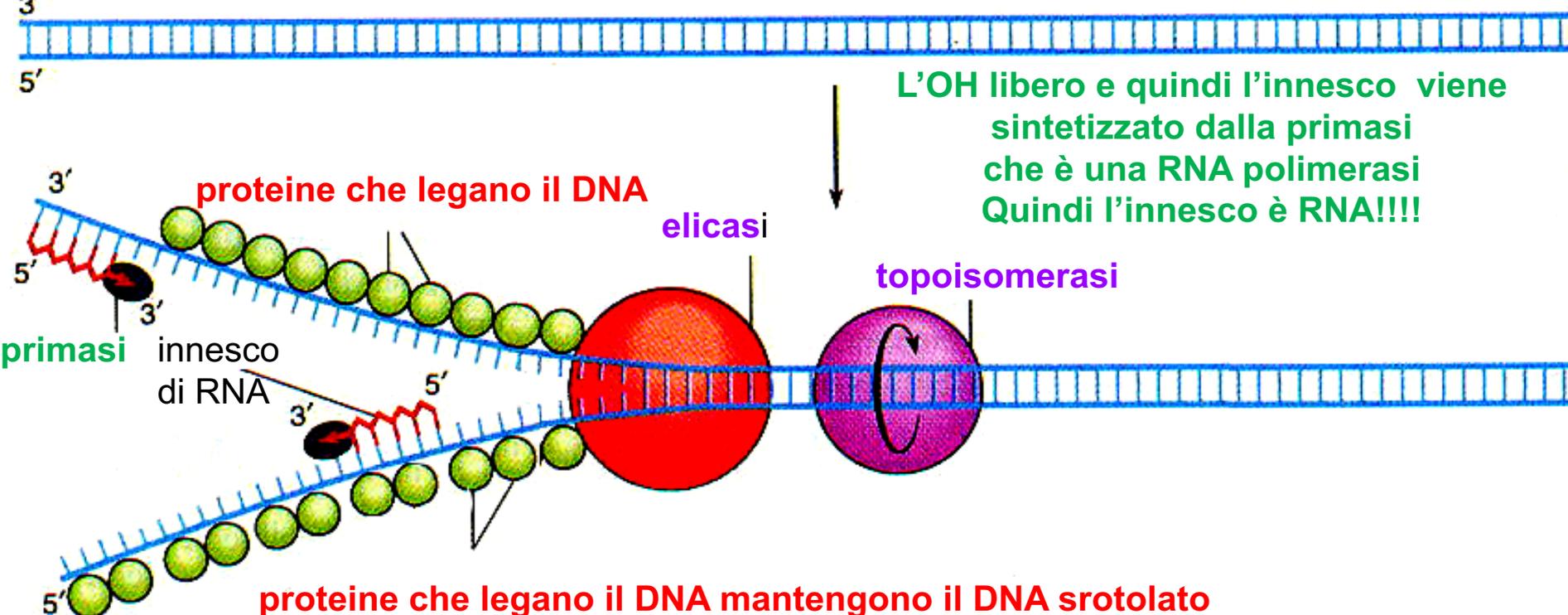
1. Tutte le polimerasi **sintetizzano DNA soltanto in direzione 5'-3'**, aggiungendo dNTP **al gruppo 3' ossidrilico** di una catena in crescita.
2. Le DNA polimerasi possono aggiungere un nuovo deossiribonucleotide soltanto ad un filamento primer preformato che forma legami idrogeno con lo stampo e **non sono capaci di iniziare la sintesi di DNA catalizzando la polimerizzazione di dNTP liberi**.

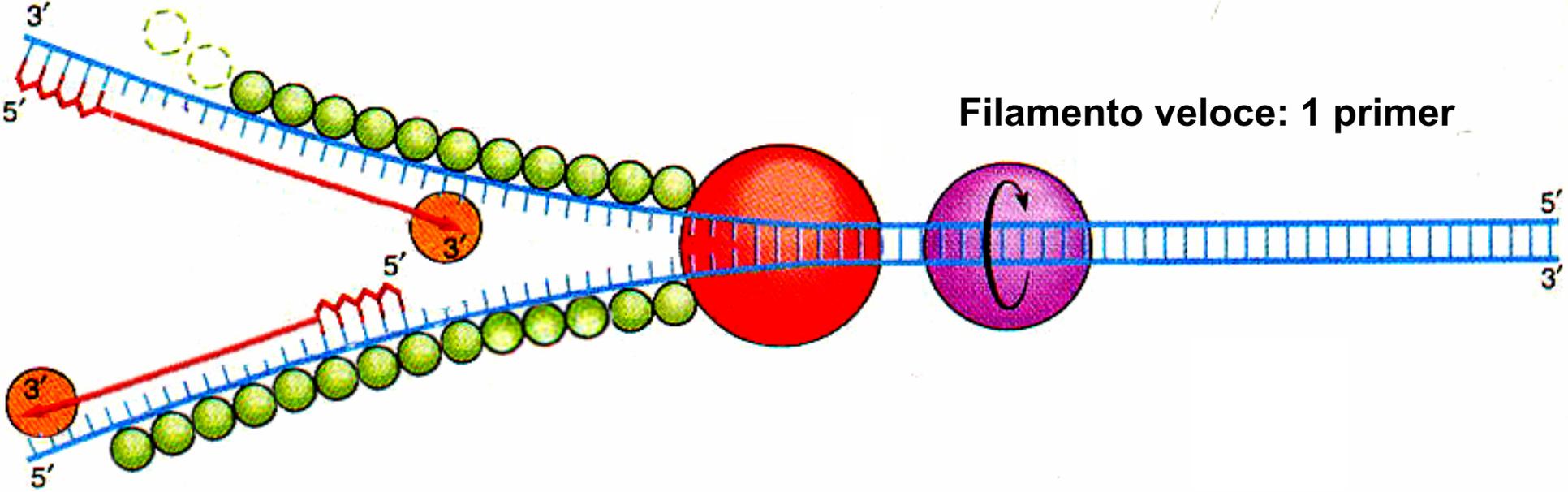
La DNA polimerasi catalizza la sintesi di un nuovo filamento di DNA

DNA Polimerasi procariotiche ed eucariotiche

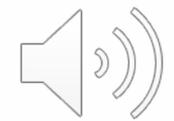
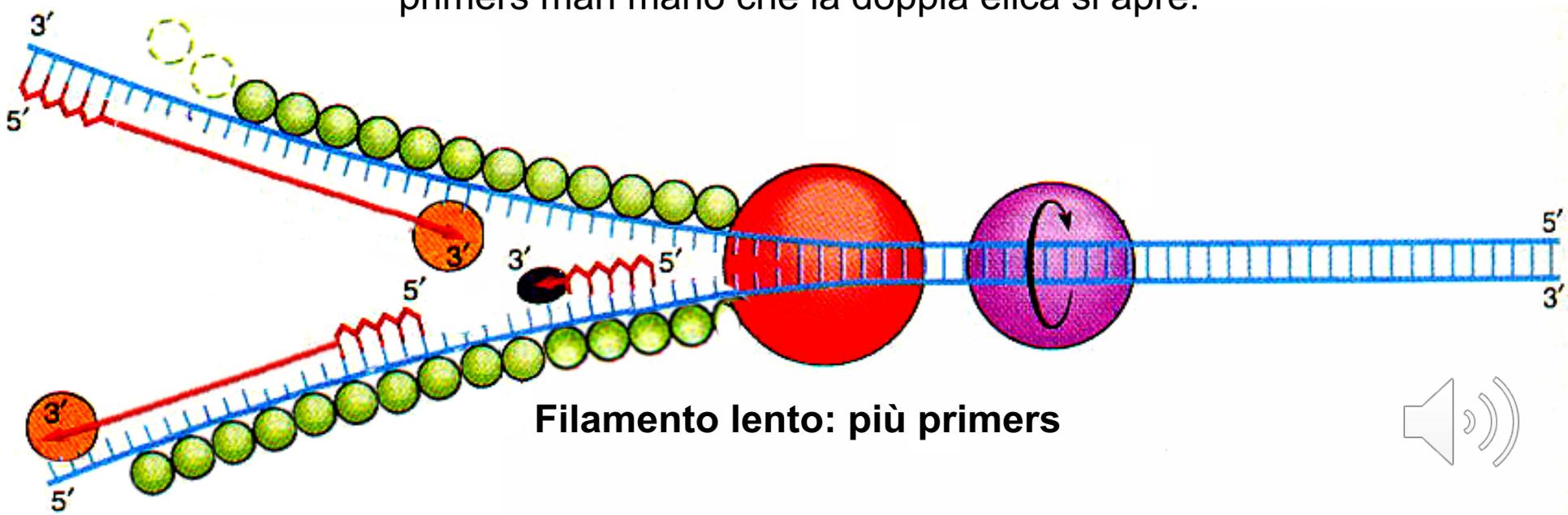
Enzimi	Direzione della sintesi	Attività esonucleasica	Funzioni possibili
Procariotici			
Polimerasi I	5' → 3'	5' → 3' 3' → 5'	riempimento dei "gap" lasciati dalla rimozione dell'innesco; riparazione del DNA
Polimerasi II	5' → 3'	3' → 5'	riempimento dei "gap" lasciati dalla rimozione dell'innesco; riparazione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



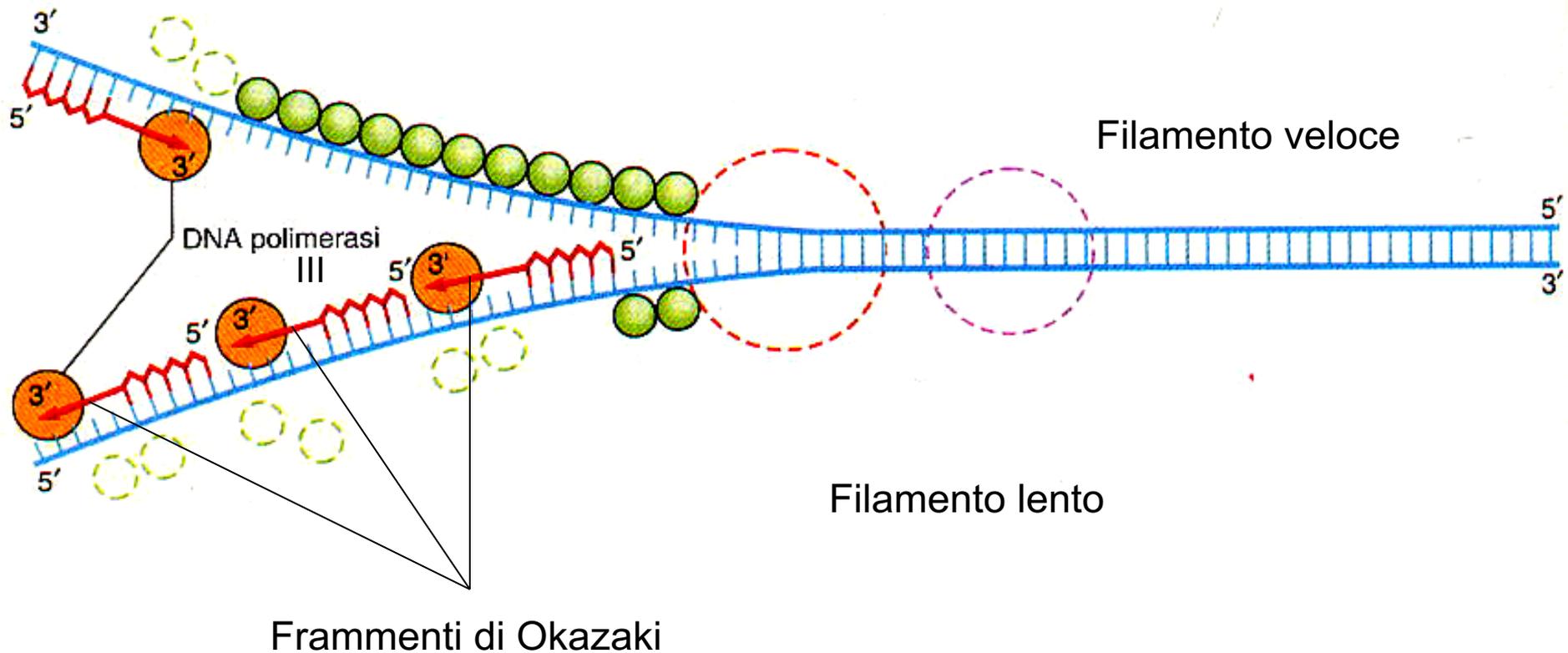




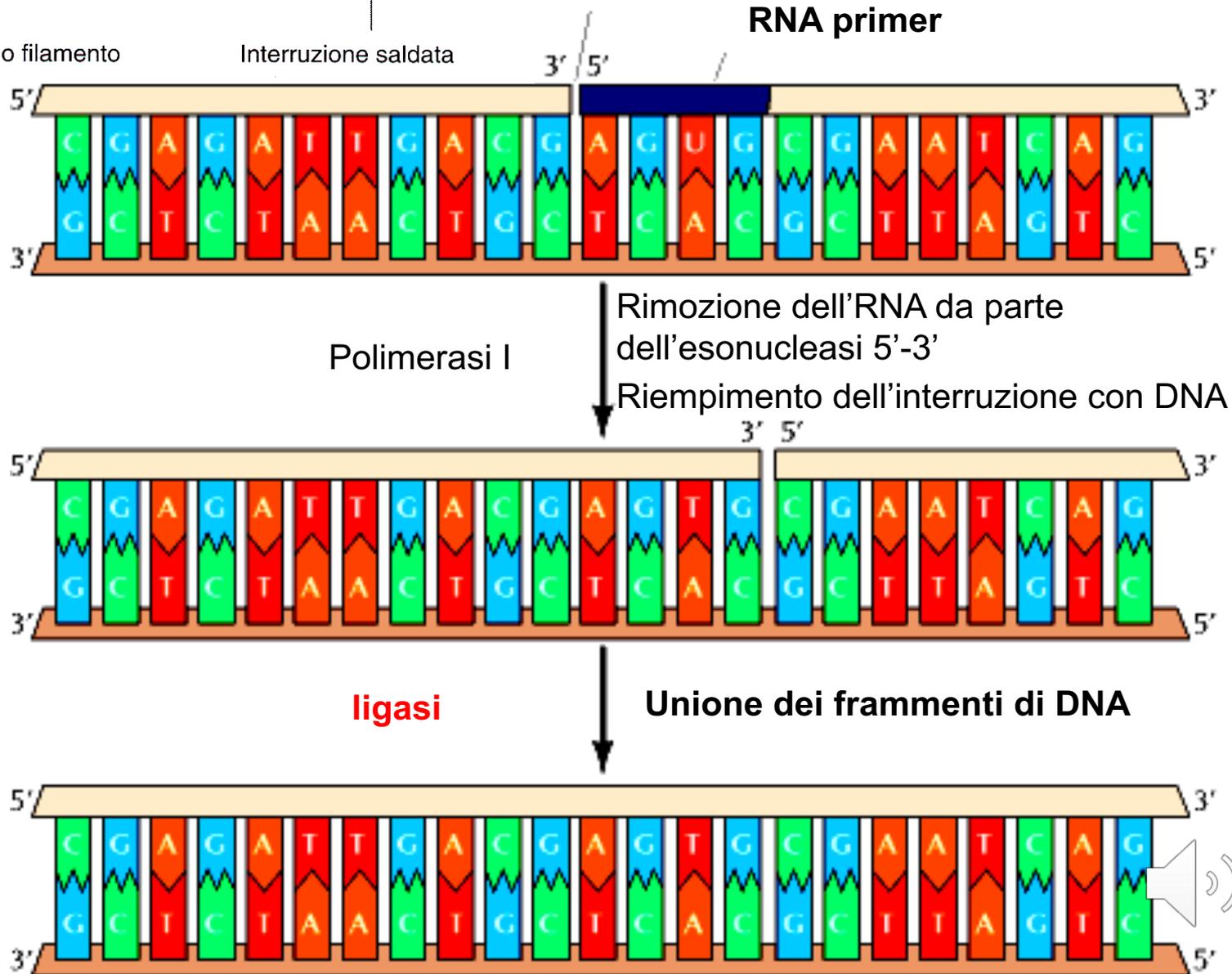
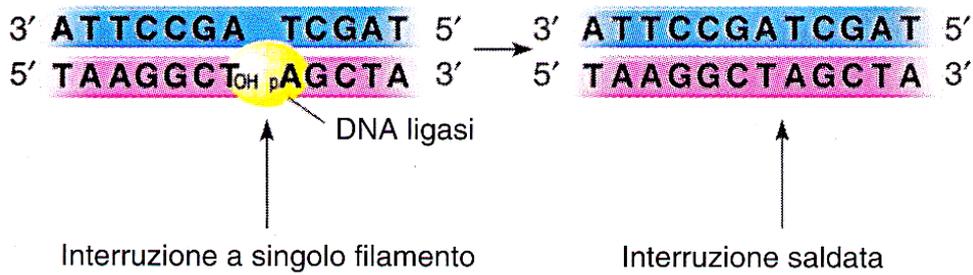
Il filamento veloce o leading e il filamento lento o lagging vengono sintetizzati con diverse velocità perchè nel lagging è necessaria la sintesi di nuovi primers man mano che la doppia elica si apre.



I corti inneschi di RNA sono utilizzati come punto di partenza per la replicazione da parte della DNA polimerasi III. I filamenti di nuova sintesi sul filamento lento sono chiamati frammenti di Okazaki.



La DNA ligasi salda le interruzioni sul filamento neoformato



Differenze nella replicazione del DNA negli eucarioti

1) A causa delle dimensioni diverse del DNA ci sono più forcelle di replicazione

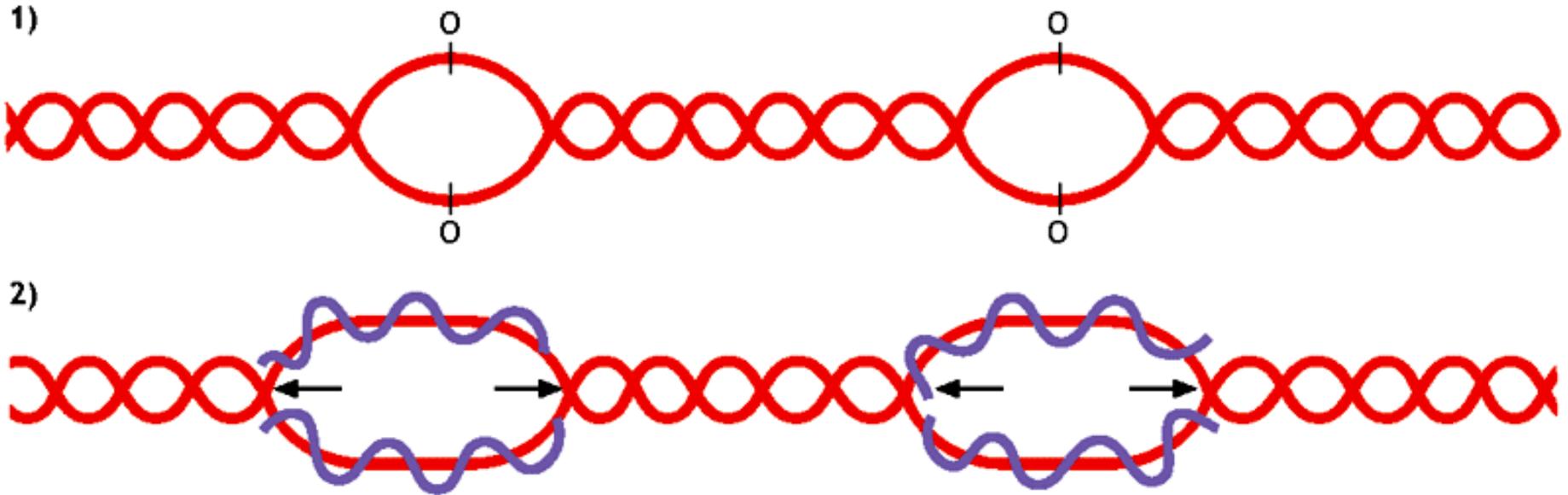
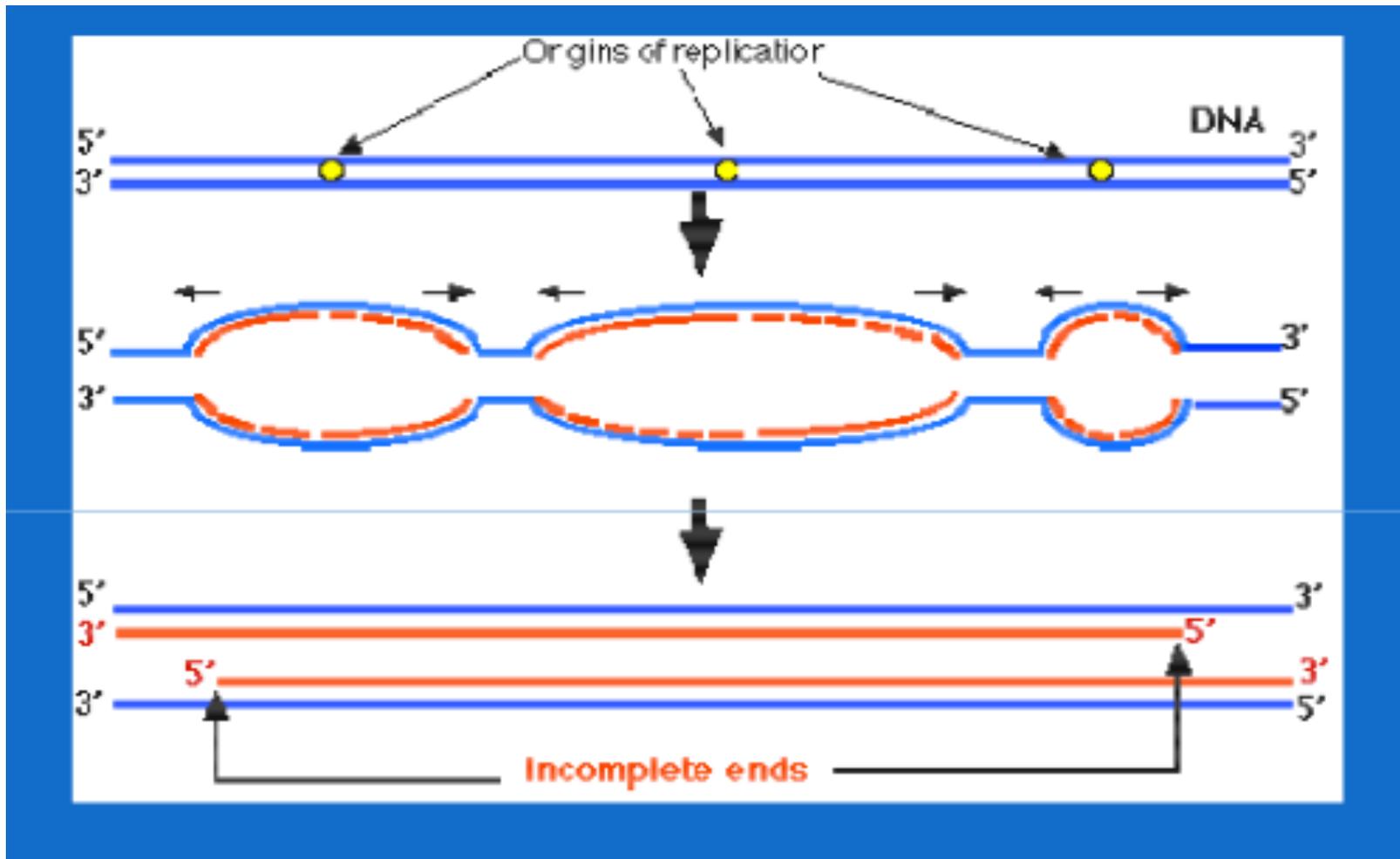


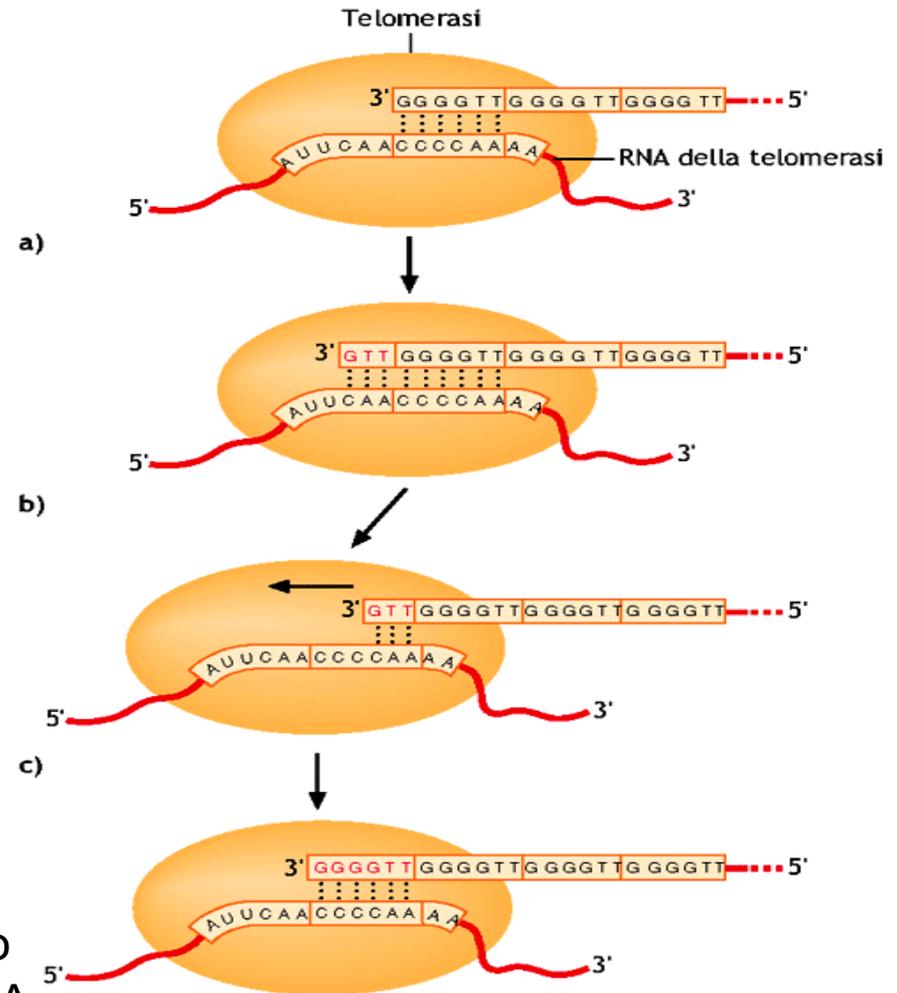
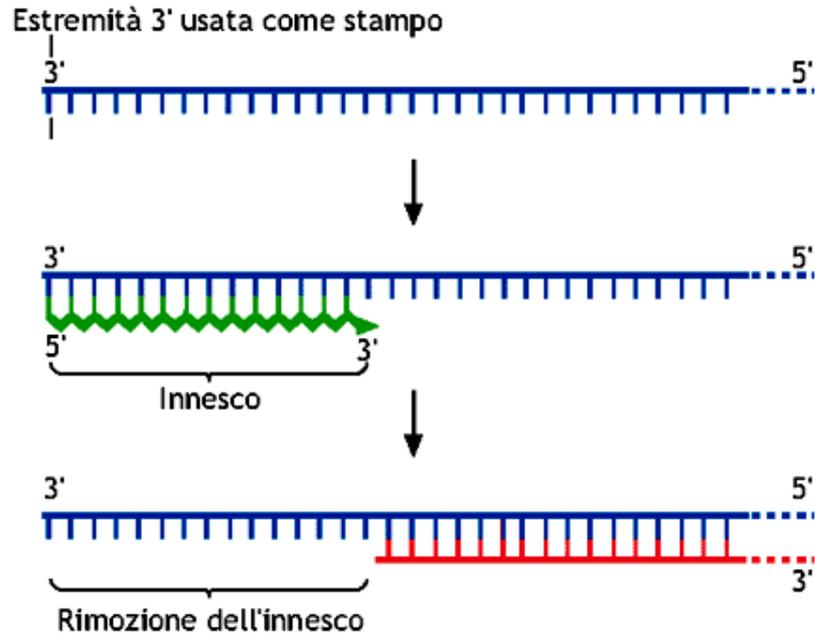
Figura 4.14 Replicazione del cromosoma degli eucarioti mediante molteplici forcelle di replicazione. **1)** In punti diversi del cromosoma, distanti circa 30.000-40.000 paia di basi, in corrispondenza delle origini di replicazione (O) si aprono i due filamenti, formando le “bolle di replicazione”. **2)** Si formano due forcelle di replicazione che procedono in senso centrifugo rispetto all’origine di replicazione, fino ad incontrarsi.



Problema negli eucarioti: l'accorciamento del filamento lento dovuta alla linearità dei cromosomi negli eucarioti



Eucarioti : La telomerasi previene l'accorciamento del filamento lento dovuta alla linearità dei cromosomi negli eucarioti

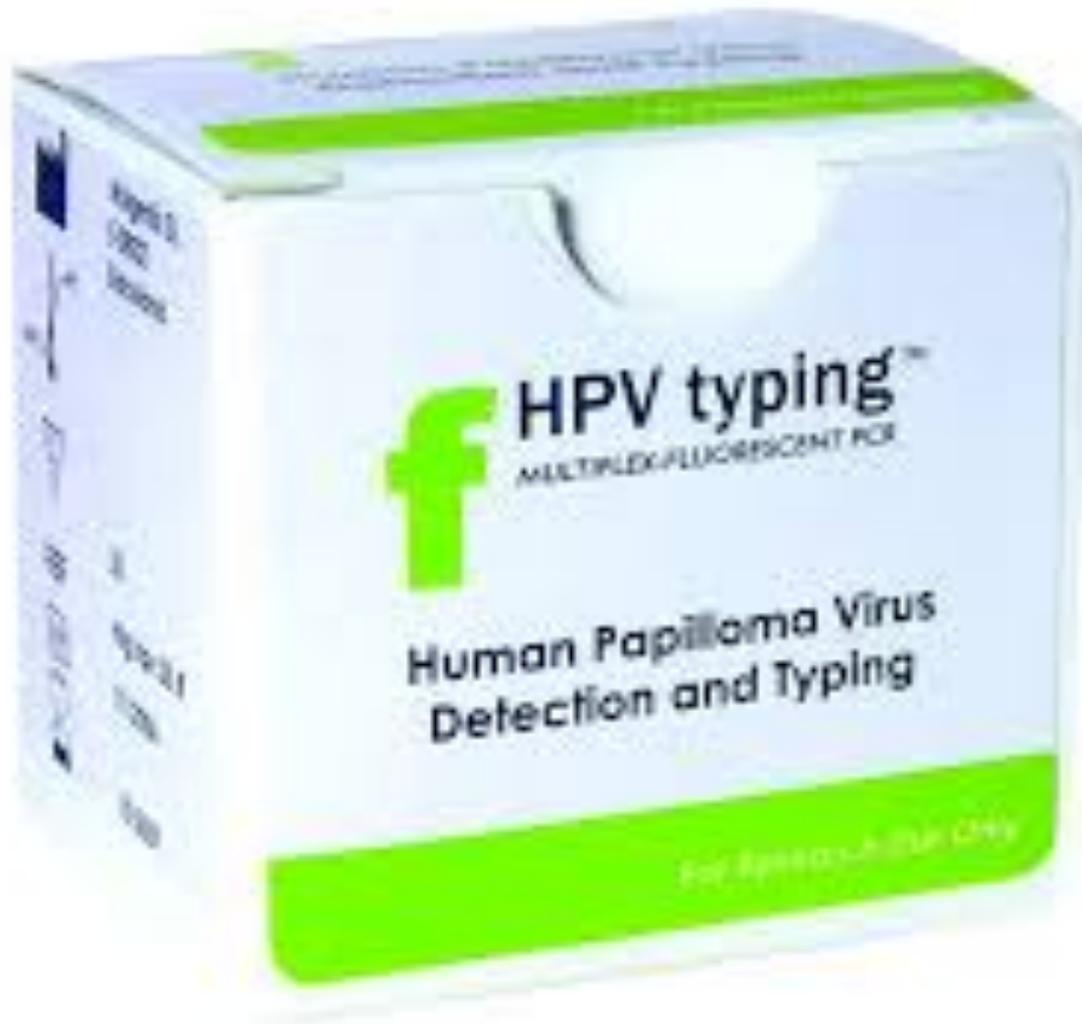


La telomerasi è costituita da

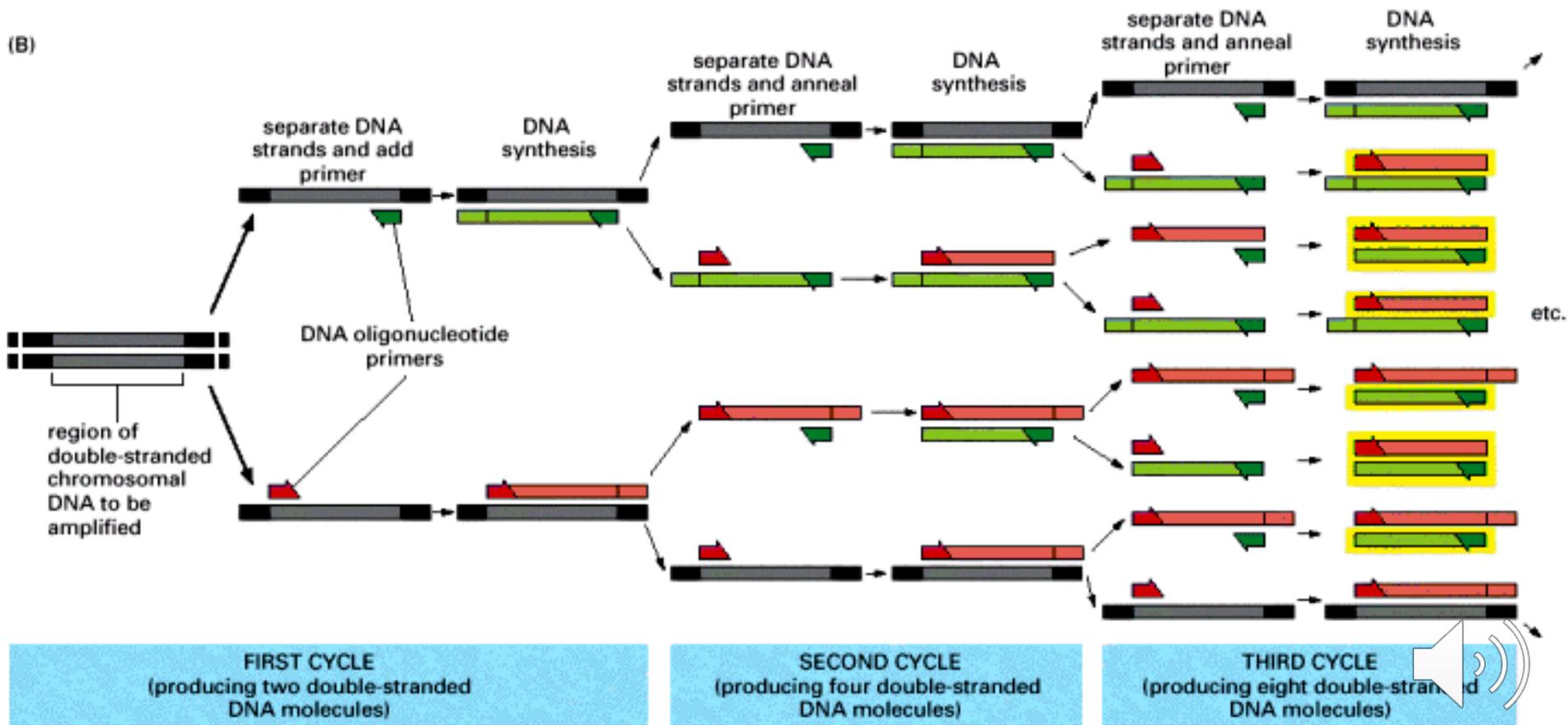
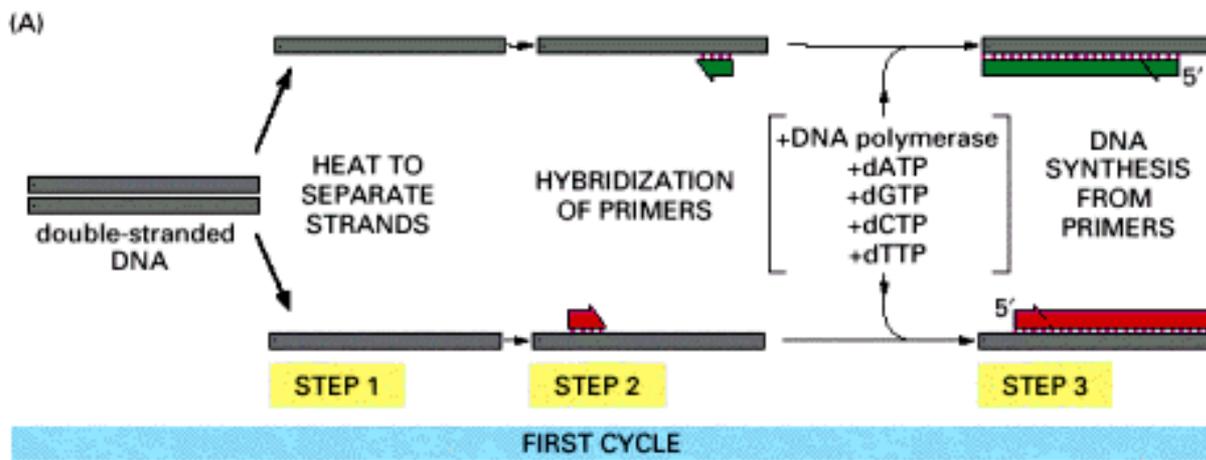
- 1) un RNA complementare al filamento singolo
- 2) da trascrittasi inversa che lo copia in DNA, allungando così il filamento singolo

Figura 4.19 La componente TERC (RNA) della telomerasi serve da stampo per la sintesi del DNA telomeric. (a) RNA della telomerasi lega la sequenza telomeric e (b) vengono subito sintetizzati tre nucleotidi di DNA, TTG, usando come stampo la molecola di RNA. La telomerasi, poi, scivola verso la fine della sequenza telomeric (c) in modo che le sue triplette AAC si appaiano con le triplette TTG neosintetizzate. (d) Il ciclo di allungamento continua.

***Test per identificare sequenze del virus HPV che causa cancro della cervice uterina
(si basa sulla Polymerase Chain Reaction)***



PCR: Polymerase Chain Reaction



La PCR- polymerase chain reaction



La Taq polimerasi è stata isolata dai batteri termofili 