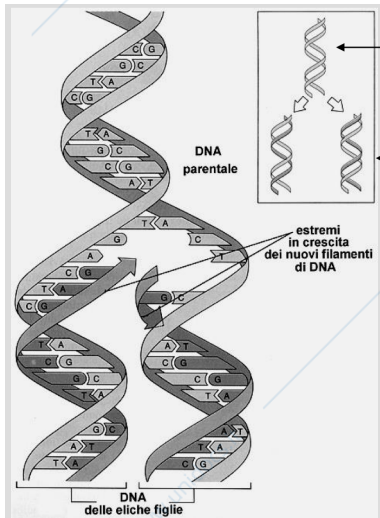


LA DUPLICAZIONE DEL DNA

La struttura a doppia elica del DNA suggerisce un possibile meccanismo di copiatura del materiale genetico, se le due catene della doppia elica si aprono esse possono servire da **stampo** per la formazione di una catena complementare. Si definisce **replicazione semiconservativa** perchè ogni molecola di DNA nuova avrà un filamento stampo che proviene dalla molecola originale ed un filamento appena assemblato nuovo.

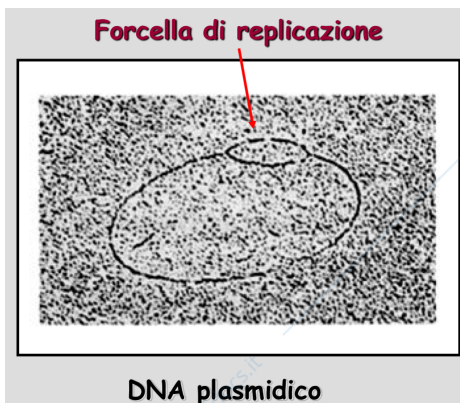


Al momento della duplicazione si avranno due nuove doppie eliche che saranno identiche tra loro e identiche a quella di partenza.

Rimangono da chiarire dei quesiti:

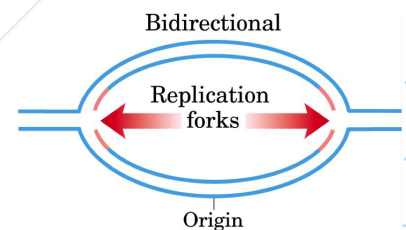
- Le due catene di DNA sono completamente disavvolte prima della replicazione?
- La replicazione inizia da un sito qualunque o da un sito preciso ?
- La replicazione procede in una o entrambe le direzioni ?

La duplicazione del DNA non inizia da un punto casuale ma c'è un sito di inizio preciso. Consideriamo ad esempio i **plasmidi** che sono strutture di DNA a doppia elica circolare, sono tratti di DNA piccoli che si trovano nei batteri, è DNA in più che serve per codificare delle proteine e degli enzimi che danno un vantaggio ai batteri.

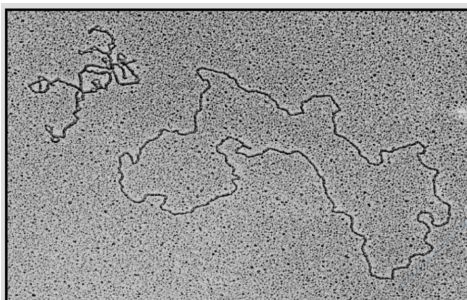


Quando il plasmide fa la duplicazione del DNA inizia sempre da un punto ben preciso, il DNA si apre in quel punto e inizia la duplicazione, prende il nome di forcella di replicazione.

La duplicazione avviene in entrambe le direzioni.



Nel DNA batterico c'è un solo sito di inizio che corrisponde ad una precisa sequenza di basi che prende il nome di **replicone**, nel DNA dell'uomo ci sono molti siti di inizio, sono stati individuati circa 30.000 repliconi.



Anche il DNA dei plasmidi può avvolgersi su se stesso formando dei superavvolgimenti, si parla di DNA plasmidico superavvolto e DNA plasmidico rilassato. Tra i due la forma attiva è quella rilassata perchè è possibile aprire la doppia elica e copiare il DNA.

Per poter avvolgere o rilassare il DNA devono intervenire degli enzimi, le **topoisomerasi**, che di conseguenza regolano l'attivazione o la disattivazione del DNA

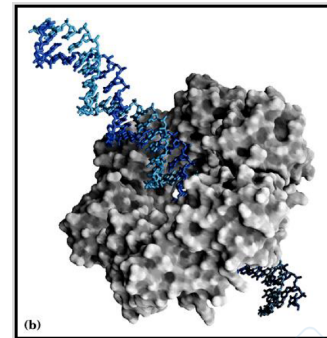
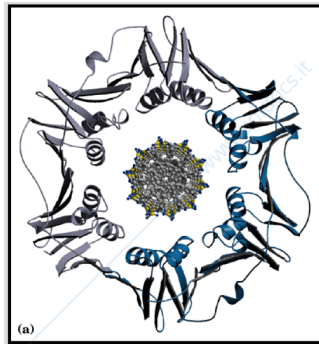
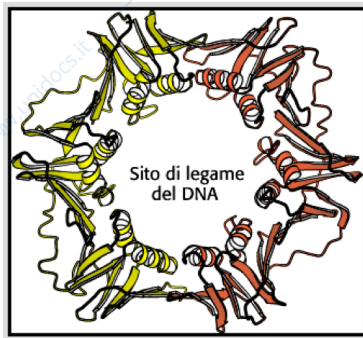
È stato visto che bloccando le topoisomerasi i batteri non sono più in grado di svolgere le loro funzioni, si può sfruttare questa informazione per combattere dei batteri producendo degli inibitori delle topoisomerasi, molti di questi inibitori sono utilizzati come antibiotici. Le topoisomerasi dei batteri si chiamano **girasi**, le topoisomerasi dell'uomo non agiscono sui plasmidi perchè non ne abbiamo ma agiscono sul DNA regolandone la duplicazione ad esempio bloccando questi enzimi nel caso di patologie tumorali si possono curare tumori.

L'enzima che si occupa di copiare il filamento di DNA prende il nome di **DNA polimerasi**, il nostro organismo contiene 3 tipi di questo enzima, è importante la **processività** dell'enzima ovvero il numero di nucleotidi che riesce a legare prima di smettere di funzionare.

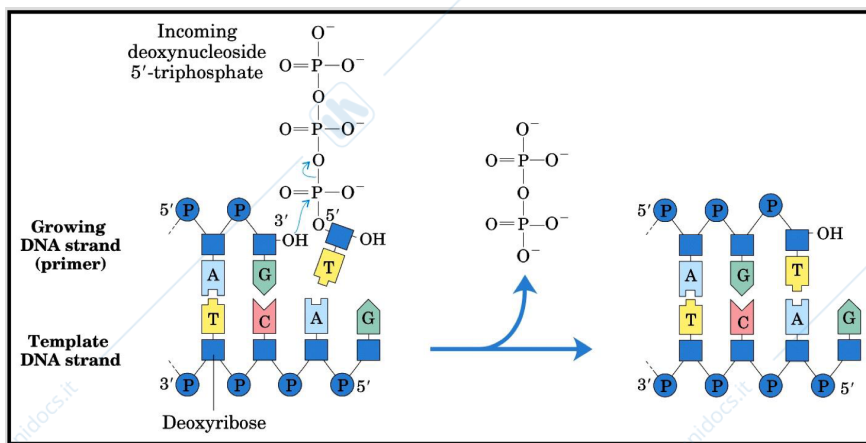
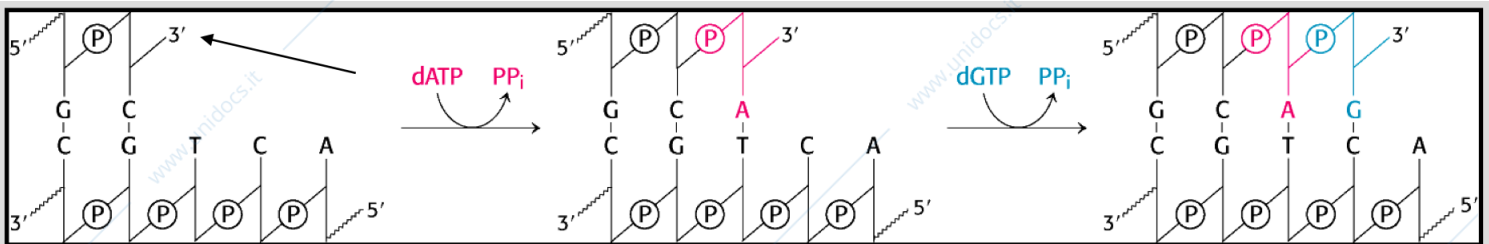
	DNA polymerase		
	I	II	III
Structural gene*	<i>polA</i>	<i>polB</i>	<i>polC (dnaE)</i>
Subunits (number of different types)	1	≥4	≥10
M_r	103,000	88,000†	830,000
3'→5' Exonuclease (proofreading)	Yes	Yes	Yes
5'→3' Exonuclease	Yes	No	No
Polymerization rate (nucleotides/sec)	16-20	40	250-1,000
Processivity (nucleotides added before polymerase dissociates)	3-200	1,500	≥500,000

Delle tre polimerasi quella che ha processività maggiore è la DNA polimerasi 3, quando avviene la duplicazione del DNA sarà questa quella che agirà. Anche le altre hanno un ruolo.

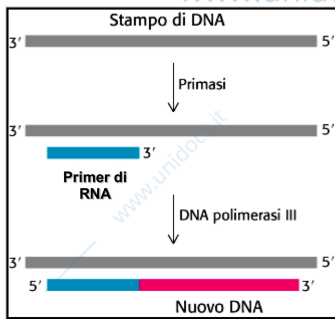
La DNA polimerasi 3 è strutturata in modo da circondare il DNA in fase di duplicazione, inizialmente si aggancia al DNA e inizia a scorrerlo fino a quando trova l'apertura della doppia elica.



La DNA polimerasi poi aggiunge i nucleotidi complementari a quelli che ci sono sul filamento, i nucleotidi che si utilizzano sono i trifosfato anche se nel DNA c'è un solo gruppo fosfato, si utilizzano i trifosfato perchè c'è bisogno di energia per formare il legame fosfodiesterico con il nucleotide precedente, il legame che si rompe è il legame anidridico tra il fosfato alfa e il fosfato beta, si libera un **pirofosfato** ovvero due molecole di fosfato che sono ancora legate tra di loro.



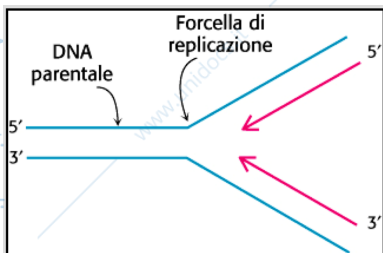
In queste condizioni non c'è un vantaggio energetico perchè l'energia prodotta dalla rottura del legame anidridico viene subito utilizzata per formare il legame fosfodiesterico, questo vuol dire che non è spontanea e che non va avanti, per far sì che il ΔG sia minore di 0 viene sfruttato il pirofosfato che viene idrolizzato, questo cambia l'entropia e rende la reazione spontanea.



Per inserire il primo nucleotide c'è bisogno di formare il legame fosfodiesterico tra il fosfato e il gruppo **3' OH** che però non è presente quando si apre il DNA perché non ci sono ancora nucleotidi legati, è quindi necessaria la presenza di un **primer** che viene sintetizzato da un altro enzima ovvero dalla **primasi**, questo enzima fa un piccolo frammento di DNA in modo che la DNA polimerasi 3 possa continuare la sintesi perché adesso è presente il gruppo 3' OH.

Il piccolo frammento di primer che viene formato dalla primasi non è di DNA ma è di RNA, è presente il ribosio e l'uracile. Ogni frammento di DNA che si genera ha a monte un piccolo frammento di RNA che verrà eliminato. La primasi è un enzima di RNA polimerasi DNA dipendente.

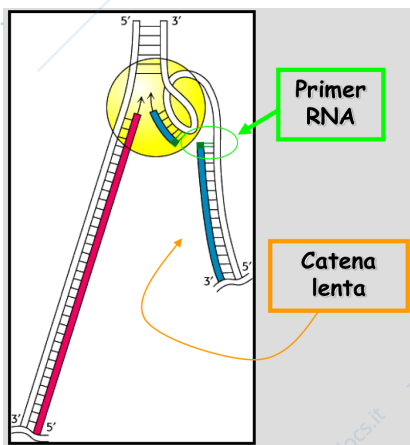
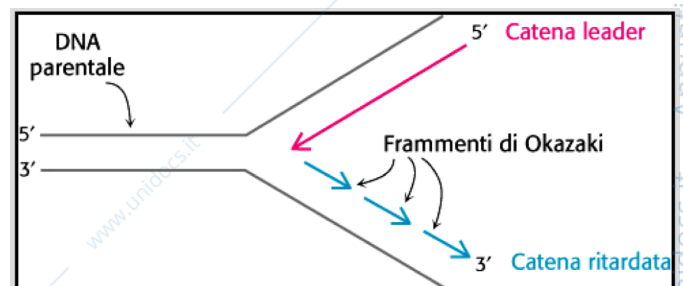
La direzione con cui avviene la sintesi del nuovo filamento di DNA è dal 5' al 3' proprio perché le basi azotate si legano via via all'estremità 3'.



Il DNA in forma di singolo filamento praticamente non è presente perché viene sintetizzato il filamento corrispondente appena la doppia elica iniziale viene aperta, è importante che non rimanga per molto come singolo filamento perché sarebbe più facilmente degradabile.

Se le due eliche sono antiparallele vuol dire che una ha direzione 5' - 3' mentre l'altra ha direzione 3' - 5', la DNA polimerasi 3 sintetizzerà il filamento in modo opposto rispetto ai due filamenti quindi in un caso dovrebbe andare in direzione 5' - 3' e nell'altro 3' - 5' ma può andare solo in direzione 5' - 3'.

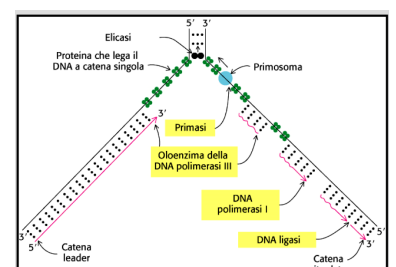
Il fatto che i due filamenti vengono copiati simultaneamente è possibile grazie ai **frammenti di Okazaki**, ovvero il filamento che va in direzione 3' - 5' viene sintetizzato sotto forma di piccoli frammenti di circa 1000 nucleotidi, i cosiddetti frammenti di Okazaki, i quali vengono sintetizzati nella giusta direzione ovvero quella in cui può andare la



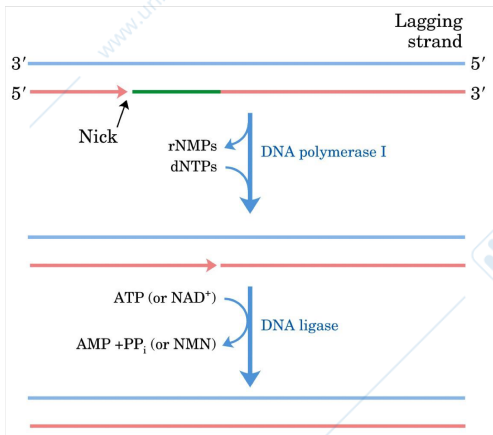
Quello che avviene a livello della forcella di replicazione è che uno dei due filamenti sta disteso, quello che viene sintetizzato in direzione 5' - 3', mentre l'altro filamento viene girato dalla DNA polimerasi 3 in una piccola zona in modo da cambiarne la direzione in quella zona, questo processo viene fatto via via per tutta la catena. Nel punto in cui viene rigirato il filamento la sintesi non avviene perciò quando viene disteso si alternano zone di DNA e zone di interruzione.

Ogni frammento di DNA di Okazaki sarà preceduto da un piccolo frammento di RNA ovvero il primer.

Per poter aprire la doppia elica c'è bisogno di alcuni enzimi che riescono a mantenere stabili i due filamenti divisi, uno ad esempio è l'**elicasi**.



Il nuovo filamento di DNA non deve presentare frammenti di RNA, a questo scopo agisce un enzima che riesce ad andare anche in direzione 3' - 5' ovvero la **DNA polimerasi 1**, ha attività **esonucleasica** che significa che può rompere i legami che formano i nucleotidi.



Questo enzima riesce a riconoscere i frammenti di RNA e a rimuoverli i nucleotidi, successivamente scorre lungo tutto il filamento neo sintetizzato per controllare se ci sono stati errori durante la sintesi, percepisce se gli appaiamenti tra le basi sono corretti o meno, nel caso in cui ci sia un errore rimuove il nucleotide sbagliato e inserisce quello giusto. Un altro ruolo che ha questo enzima è quello di riempire le zone di interruzione che si trovano tra i frammenti di Okazaki non riuscendo però a legarli tra di loro, l'enzima che invece interviene per legare tra loro i nucleotidi che non sono stati legati è la **DNA ligasi**.

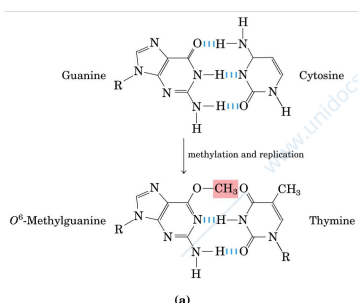
Grazie a questo processo e a tutti questi enzimi si ottengono due filamenti completamente identici a quello di partenza.

È possibile che durante la replicazione del DNA ci siano degli **errori** oppure che il DNA venga danneggiato per qualche motivo, è necessario che questi errori vengano riparati altrimenti si propagherebbero con le duplicazioni successive e possono portare a cambiamenti negativi drastici. Sia la DNA polimerasi 3 che la DNA polimerasi 2 che la DNA polimerasi 1 hanno la possibilità di correggere gli errori, la DNA polimerasi 3 quando sintetizza il DNA è abbastanza corretta, ha una frequenza di errore ogni $10^3/10^4$ basi, la DNA polimerasi 2 ha attività di "proofreading" ovvero ricontrolla la sequenza di basi e migliora la precisione, la DNA polimerasi 1 sostituisce le basi errate migliorando ulteriormente la precisione. Per copiare l'intero genoma umano la probabilità di errore deve essere inferiore a 3×10^9 .

DNA polimerasi I	→ Elimina i primers e riempie i vuoti sul filamento lento
DNA polimerasi II	→ Riparazione del DNA
DNA polimerasi III	→ Enzima principale nella sintesi del DNA

La DNA polimerasi 2 è importante anche nella fase successiva alla sintesi del DNA perchè può essere danneggiato e modificato chimicamente, alcuni degli **agenti** che possono **danneggiare** il DNA sono:

- **ROS**: ovvero i radicali liberi dell'ossigeno, sono specie molto reattive, possono ossidare la guanina a 8-ossiguanidina che non si appaia più con la citosina ma con l'adenina.
- **DEAMINAZIONE DELL'ADENINA**: l'adenina può perdere il gruppo NH₂ e quindi subire deaminazione trasformarsi in ipoxantina che si appaia con la citosina anziché con la timina
- **AGENTI ALCHILANTI**: sono agenti che reagiscono con gli atomi di azoto della guanina e dell'adenina modificandoli chimicamente
- **RAGGI UV**: danneggiano il DNA e un esempio sono i nei della pelle
- **RAGGI X**: in base all'energia possono essere ionizzanti e rompere i filamenti di DNA



Esempio di alchilazione della guanina, non può più formare 3 legami a H ma 2, quando la DNA polimerasi 3 in fase di sintesi passa sulla guanina alchilata sente che può formare 2 legami e quindi inserisce la timina, questa è una **mutazione**.