

REPLICAZIONE DEL DNA

Il DNA si replica nella fase S del ciclo cellulare (nell'interfase tra G1 e G2). Negli eucarioti la replicazione del DNA inizia in più origini contemporaneamente.

Replicone: è l'unità di replicazione definita da un sito necessario affinché la replicazione possa iniziare. Gli eucarioti hanno diversi repliconi per lo stesso filamento mentre i procarioti ne hanno uno solo. Il punto in cui inizia la replicazione viene detto ORC (origin replication complex).

La replicazione del DNA è **semiconservativa**, in quanto il DNA si apre e i due filamenti vengono usati come stampo per i due nuovi filamenti. Di conseguenza i due nuovi DNA avranno un filamento del DNA originale ed un nuovo filamento, per questo si dice semiconservativa.

Nella replicazione il DNA viene duplicato in due copie quasi perfettamente identiche, infatti in caso di errori vi sono molti meccanismi di riparazione e quei pochissimi errori che sfuggono vengono considerati come mutazioni, ossia la principale sorgente di variabilità su cui poi agisce la selezione naturale.

DNA POLIMERASI

È l'enzima che catalizza la replicazione del DNA. Essa lavora sempre andando in direzione 5'-3' ad eccezione della sua attività di esonucleasi (ossia correzione degli errori) che va in direzione 3'-5'. Va ad una velocità di circa 1000 nucleotidi al secondo e compie circa un errore ogni miliardo di nucleotidi copiati. Ogni volta che lega un nucleotide due gruppi fosfato di quest'ultimo vengono rilasciati. La struttura della DNA polimerasi assomiglia alla mano destra chiusa dove il palmo contiene il sito catalitico ed è quindi associato al nuovo DNA.

La DNA polimerasi può solo allungare la nuova catena di DNA ma non la può iniziare. Pertanto, la **primasi** catalizza la formazione di un breve frammento di RNA complementare allo stampo che viene detto primer e funge da innesco per la reazione. Il primer alla fine verrà rimosso dalla attività di esonucleasi della DNA polimerasi la quale sostituirà i ribonucleotidi con desossiribonucleotidi. Quindi a differenza della DNA polimerasi la primasi è in grado di iniziare una nuova catena unendo due nucleosidi.

SINTESI DEL NUOVO DNA

Durante la replicazione del DNA si possono distinguere delle biforcazioni a Y dette forcelle di replicazione. In questi punti si sta muovendo la replicazione del DNA aprendo i due filamenti ed usando ognuno come stampo. Di conseguenza le forcelle continuano a muoversi lungo direzioni opposte e quindi la replicazione è detta bidirezionale.

Poiché i filamenti sono antiparalleli e la DNA polimerasi si muove solo in direzione 5'-3' allora i due filamenti di nuova sintesi crescono in direzioni opposte. Pertanto, i due filamenti alla forca di replicazione vengono copiati in modo diverso, ognuno da una molecola di DNA polimerasi diversa. Esistono quindi due tipi di filamenti durante la replicazione:

- Un **filamento guida** in cui la DNA polimerasi segue l'andamento di apertura della forcella di replicazione, quindi ha bisogno di un solo primer e procede con la sintesi in modo continuato
- Un **filamento in ritardo** in cui la DNA polimerasi procede nel verso opposto all'apertura della forcella, quindi ogni 200 paia di basi circa viene installato un nuovo primer di RNA dove si attacca

la DNA polimerasi, e vengono quindi sintetizzati tanti frammenti di nuovo DNA detti **frammenti di Okazaki**. I vari primer vengono poi rimossi dalla DNA polimerasi stessa e sostituiti con del DNA ogni volta che essa li incontra sul proprio cammino, e i vari frammenti di Okazaki vengono legati tra loro dalla DNA ligasi.

Poiché presentano tre gruppi fosfato i nucleotidi usati dalla DNA polimerasi sono dATP, dGTP, dCTP e dTTP. A fine replicazione tutti gli inneschi ancora presenti vengono rimossi, i “gap” vengono riempiti dalla DNA polimerasi e poi vengono legati al resto del filamento dalla DNA ligasi.

L’apertura della forcella di replicazione comporta il superavvolgimento del DNA davanti ad essa il quale richiederebbe molta energia; quindi per aprire la forcella e risolvere questo problema vengono usati tre enzimi:

- Un enzima detto **elicasi** si muove lungo lo stampo davanti alla DNA polimerasi e separa tra loro i due filamenti di DNA, usa 1ATP per ogni elica separata
- I filamenti singoli vengono stabilizzati da proteine che legano il DNA a singolo filamento, impedendogli così di riavvolgersi subito dietro alla forcella
- I superavvolgimenti vengono rilasciati dalla DNA **topoisomerasi**, la quale introduce una rottura nel DNA di fronte alla forcella in modo tale che esso ruoti attorno a questa rottura. Vi è una topoisomerasi 1 che rompe un singolo filamento, e una topoisomerasi 2 che rompe entrambi i filamenti.

Vi sono inoltre più tipi di DNA polimerasi:

Tabella 13.2 Le DNA polimerasi coinvolte nella replicazione dei genomi batterici ed eucariotici.

Enzima	Subunità	Attività esonucleasica		Funzione
		3'→5'	5'→3'	
DNA polimerasi batteriche				
DNA polimerasi I	1	Sì	Sì	Riparazione del DNA, replicazione
DNA polimerasi III	Almeno 10	Sì	No	Principale enzima della replicazione
DNA polimerasi eucariotiche				
DNA polimerasi α	4	No	No	Innescare la replicazione
DNA polimerasi γ	2	Sì	No	Replicazione del DNA mitocondriale
DNA polimerasi δ	2 o 3	Sì	No	Principale enzima della replicazione
DNA polimerasi ϵ	Almeno 1	Sì	No	Richiesto per l'individuazione dei danni al DNA durante la replicazione del genoma (Sezione 13.3.2)
DNA polimerasi κ	1 o 2?	?	?	Richiesto per l'attacco delle molecole di coesina che tengono uniti i cromatidi fratelli fino allo stadio di anafase della divisione nucleare (Sezione 13.2.3)

I batteri e gli eucarioti possiedono altre DNA polimerasi coinvolte principalmente nella riparazione del DNA danneggiato. Questi enzimi includono le DNA polimerasi II, IV e V di *Escherichia coli* e le DNA polimerasi β , ζ , η , θ e ι eucariotiche. I processi di riparazione sono descritti nella Sezione 14.2.

Negli eucarioti la replicazione del DNA avviene in più origini contemporaneamente e vengono create quindi più forcelle di replicazione che andando avanti finiranno per unirsi con le altre.

La DNA polimerasi ha anche attività di proof-reading (o correttore di bozze) in quanto è in grado di capire se ha commesso un errore e di risolverlo (anche se commette un errore ogni miliardo di basi).

TELOMERI

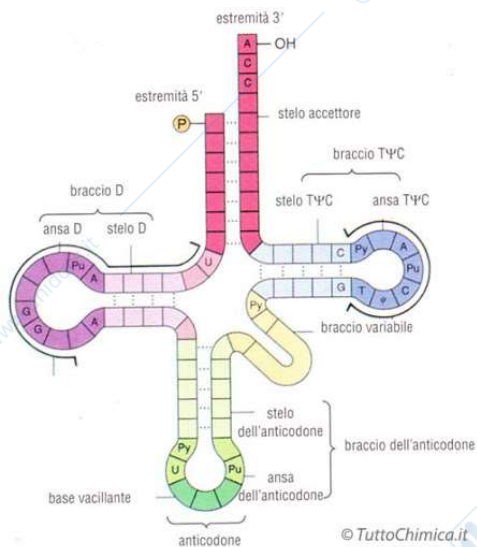
La replicazione del DNA comporta sempre un suo accorciamento. Infatti, a fine replicazione si hanno sempre due primer alle estremità 5' i quali quando vengono rimossi non possono essere sostituiti dalla DNA polimerasi poiché essa sintetizza solo in direzione 5'-3' ma alle estremità non ha niente a cui attaccarsi. Per questo motivo ad ogni ciclo di replicazione si hanno molecole di DNA figlie sempre più corte. I cromosomi risolvono questo problema con la presenza dei telomeri, ossia dei prolungamenti del DNA alle estremità che non codificano per nessun gene o proteina, pertanto possono essere accorciati dopo la replicazione. Alcune cellule presentano inoltre l'enzima telomerasi, che è in grado di allungare i telomeri poiché contiene una breve sequenza di RNA che usa come stampo per sintetizzare la sequenza di DNA da aggiungere al telomero. Nelle cellule tumorali la telomerasi è sempre attiva pertanto queste cellule non invecchiano mai perché il loro DNA non viene mai ridotto.

TRASCRIZIONE GENICA

I geni dirigono la sintesi delle proteine passando attraverso la trascrizione di una molecola di RNA.

L'RNA è un filamento costituito da ribonucleotidi legati con un legame fosfodiesterico. Anch'esso presenta una direzione 3'-5' e quattro basi azotate (adenina, guanina, citosina e uracile).

L'RNA presenta una struttura ripiegata in cui le basi complementari della stessa molecola si vanno ad appaiare tramite legami a idrogeno:



Nella trascrizione viene prodotto un filamento di RNA complementare al DNA usato come stampo.

L'enzima che catalizza questa reazione è la RNA polimerasi, la quale sintetizza andando in direzione 5'-3'. Questo enzima è dotato anche di attività elicasica in quanto è in grado di svolgere e riavvolgere il DNA mentre effettua la sintesi. Questo enzima catalizza la formazione di un legame fosfodiesterico tra l'estremità 3' dell'ultimo nucleotide e il fosfato in 5' del nucleotide appena aggiunto. Affinché il gene sia trascritto il DNA deve contenere prima e dopo di esso un segnale di

inizio e un segnale di stop, i quali vengono riconosciuti dalla RNA polimerasi che in base ad essi inizia o finisce la trascrizione.

Il segnale di inizio viene detto promotore e corrisponde ad una specifica sequenza del DNA all'inizio del sito di trascrizione, Esso consente l'attacco della RNA polimerasi e di fattori di trascrizione che facilitano l'inizio della trascrizione. Con il sito di terminazione la RNA polimerasi si stacca e finisce la trascrizione.

Negli eucarioti ci sono più tipi di RNA polimerasi:

I tipi di RNA polimerasi di procarioti e eucarioti

Nei procarioti una sola RNA polimerasi catalizza la sintesi di tutti i tipi di RNA

Negli eucarioti ci sono più enzimi :

RNA polimerasi I	→	rRNA (ribosomale)
RNA polimerasi II	→	mRNA (messaggero)
RNA polimerasi III	→	tRNA e rRNA 5.8 S

Le RNA polimerasi I e II riconoscono sul DNA delle sequenze poste a monte del sito di inizio della trascrizione (PROMOTORI)

La RNA polimerasi III si lega invece in posizioni a valle del sito di inizio della trascrizione

Negli eucarioti il promotore costitutivo è il TATA box (così chiamato per la sequenza di basi che contiene) il quale viene riconosciuto e legato dai fattori di trascrizione TF2A, TF2B e TF2D. ad essi si lega poi la RNA polimerasi 2 la quale è già legata al fattore TF2F. poi si legano TF2H e TF2E completando così il complesso preiniziale. Dopo l'RNA polimerasi 2 viene fosforilata ed inizia la sintesi.

MATURAZIONE

L'RNA polimerasi genera solo un trascritto primario che per diventare mRNA deve prima essere soggetto ad un processo di maturazione. Essa avviene ancora nel nucleo e solo dopo l'RNA potrà passare attraverso i pori nel citoplasma.

La maturazione consiste in tre passaggi: aggiunta di un cappuccio all'estremità 5', aggiunta di una coda di poliA in 3' e rimozione degli introni tramite splicing o splicing alternativo.

1-Il cappuccio aggiunto in 5' è formato da 7-metilguanossina e serve a rendere l'mRNA più resistente all'attacco delle nucleasi nel citoplasma e permette inoltre il riconoscimento come mRNA da parte della subunità inferiore dei ribosomi.

2-La coda di poliA aggiunta in 3' consiste in una lunga catena di nucleotidi con base adenina utile a proteggere l'mRNA dalle nucleasi. Viene aggiunta dalla poliA polimerasi che riconosce uno specifico segnale sull'mRNA e lo taglia inserendo poi la catena.

3-Splicing: l'RNA appena trascritto contiene degli introni, ossia delle sequenze che non portano informazione per una proteina e non servono quindi all'RNA maturo. Lo splicing è il processo attraverso il quale vengono rimossi gli introni ed avviene grazie a certe proteine ed RNA che riconoscono i siti di taglio. La rimozione degli introni avviene grazie alla formazione di un cappio da parte di questi, il quale viene tagliato e dopodiché vengono uniti gli esoni con una ligasi. La rimozione degli introni avviene ad opera dello spliceosoma, il quale è formato da snRNP (piccole particelle ribonucleoproteiche) contenenti snRNA ad attività ribozimica (ossia catalitica). Questo processo avviene solo negli eucarioti in quanto nei procarioti non vi sono introni. Si ottiene così l'mRNA in cui vi sono soltanto gli esoni. In alcuni casi può avvenire uno splicing alternativo: non vengono rimossi tutti gli introni e vengono scelti solo alcuni esoni, in tal modo si producono proteine diverse che però specializzano la cellula.

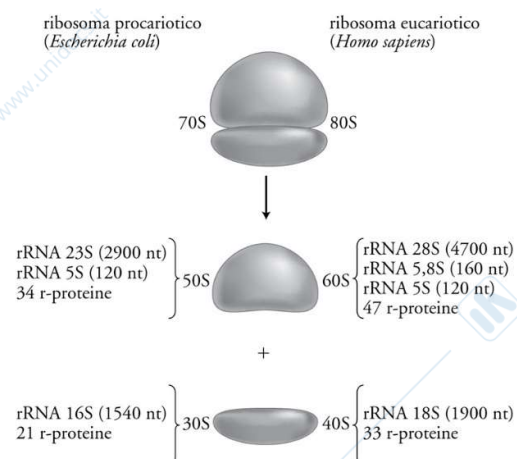
RNA POLIMERASI 1: Essa sintetizza gli rRNA. I geni ribosomiali sono presenti sul DNA a livello del nucleolo e, dopo essere stati trascritti, gli rRNA si complessano con proteine per formare le subunità del ribosoma che poi si complesserà nel citoplasma.

RNA POLIMERASI 3: Essa trascrive i geni per gli rRNA 5S, per i tRNA e alcuni geni per gli snRNA. Il tRNA è il più importante e subisce un processo di maturazione: viene rimossa la sequenza leader, viene aggiunta la sequenza CCA alla fine, vengono modificati i nucleotidi (con metilazione delle basi A, G, C, sostituzione di alcune basi con diidrouacile D e pseudouridina ψ), rimozione degli introni e viene assunta una struttura a trifoglio o ad L.

LA TRADUZIONE O SINTESI PROTEICA

In questo processo si ottiene una proteina attraverso la traduzione da un RNA messaggero.

Gli mRNA procariotici sono spesso policistronici (ossia codificano per proteine multiple, ciascuna delle quali tradotta da un sito di inizio indipendente), mentre quelli eucariotici sono monocistronici (ossia codificano per una proteina singola). Gli elementi che vengono usati durante la traduzione sono: ribosomi, mRNA, tRNA e amminoacidi.



Al loro interno i ribosomi presentano inoltre tre siti: sito amminoacidico A, sito peptidico P e sito di uscita E.

Tutti gli mRNA presentano inoltre un codone di inizio dato da AUG e un codone di stop dato da uno tra UAG, UAA e UGA. Ciò che viene prima del codone di inizio e dopo il codone di stop non viene tradotto. Vi sono quindi delle regioni non tradotte dette UTR. Nell'mRNA vi sono poi sequenze di tre basi dette codoni che codificano per uno specifico amminoacido.

Il tRNA ha una struttura a trifoglio tale per cui presenta un anticodone ed è legato con un legame altamente energetico ad un amminoacido. La traduzione è possibile poiché durante essa il tRNA riconosce il codone dell'mRNA per appaiamento del suo anticodone e rilascia quindi l'amminoacido che ha legato. Il legame tra tRNA e amminoacido è catalizzato dalla amminoacil-tRNA-sintetasi, la quale usa un ATP per legare i due ed inoltre è specifica per ogni tRNA. Il tRNA iniziale degli eucarioti porta sempre la metionina mentre nei procarioti porta la formilmetionina.

1)INIZIO

La subunità minore del ribosoma riconosce il cappuccio di 7-metilguanosa negli eucarioti o la sequenza Shine-Dalgarno per agganciarsi all'mRNA. Dopodiché la subunità inizia a scorrere lungo l'mRNA fino al codone AUG. Sopra di esso si posiziona il tRNA con metionina (o formilmetionina) per appaiamento dell'anticodone. Sopra ad essi si posiziona poi la subunità maggiore inserendo il tRNA nel sito P. il tRNA che porta il secondo amminoacido (riconoscibile per l'appaiamento tra codone e anticodone) si posiziona nel sito A. Il secondo amminoacido si lega alla metionina staccandola dal suo tRNA e formando il primo legame peptidico. Ora il ribosoma scorre posizionando il primo tRNA nel sito E per farlo uscire dal ribosoma, e il secondo nel sito P (esso porta entrambi gli amminoacidi legati ora). Il sito A ora può ricevere il terzo tRNA. Per fare questo viene usato GTP nei procarioti e GTP o ATP negli eucarioti.

2)ALLUNGAMENTO

Tutti i prossimi tRNA si legano al sito A e da questo, tramite l'ausilio di peptidil-transferasi (un ribozima già presente nel ribosoma), legano i propri amminoacidi con quelli già presenti nel sito P. Fatto questo il ribosoma riprende a scorrere per fare spazio ad un altro tRNA. La fonte di energia usata per fare ciò è il GTP.

3)TERMINAZIONE

Viene riconosciuto uno dei codoni di stop UAA, UAG o UGA. Viene allora legato un fattore di distacco nel sito A e viene usata una molecola d'acqua per il rilascio di peptide, tRNA e ribosoma. Viene usato GTP. L'efficienza della sintesi proteica è aumentata dal fatto che lo stesso filamento di mRNA viene tradotto contemporaneamente da più ribosomi che si mettono in fila su di esso.

CODICE GENETICO

Il codice genetico codifica per gli amminoacidi. L'mRNA contiene 4 nucleotidi diversi e gli amminoacidi totali sono 20, pertanto la combinazione più piccola possibile per codificare almeno 20 amminoacidi è 3, in quanto $4^3 = 64$ combinazioni di triplette possibili. Di queste 61 codificano per i 20 amminoacidi mentre 3 sono i codoni di stop. Ciò vuol dire che un amminoacido può essere codificato da più codoni diversi ma un codone codifica per un solo amminoacido.