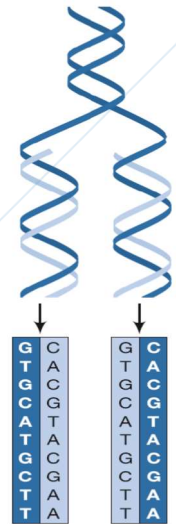


DUPLICAZIONE DEL DNA

I meccanismi alla base della replicazione del DNA dipendono dalla struttura a doppia elica del DNA teorizzata da Watson e Crick. Poco dopo la pubblicazione di questo articolo ne pubblicarono un altro, proponendo un modello per la replicazione del DNA. La loro ipotesi fondamentale è che uno dei due filamenti di ciascuna molecola di DNA neofornata è un **FILAMENTO PARENTALE**, mentre l'altro è sintetizzato **EX NOVO** secondo le regole dell'appaiamento. Per questo motivo è nota come **REPLICAZIONE SEMICONSERVATIVA**, processo tale per cui in ciascuna molecola figlia è conservata metà della molecola parentale.

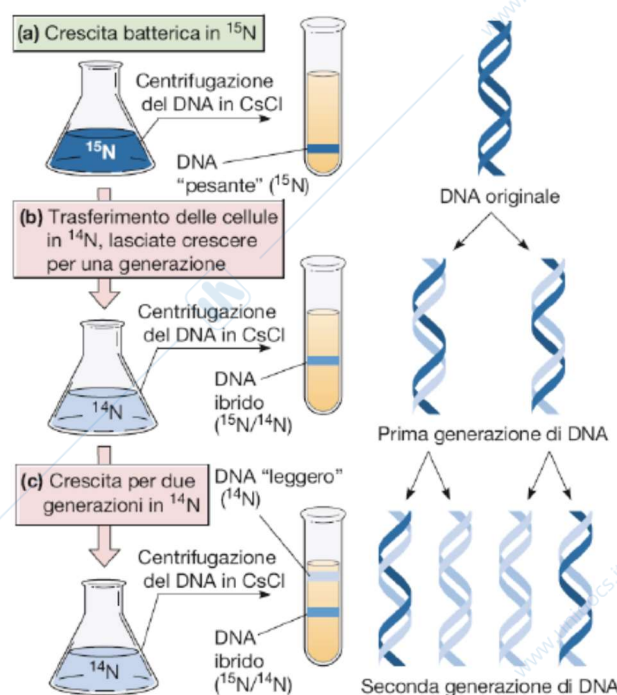


A cinque anni dalla pubblicazione di questa teoria, Mendelson e Stahl fecero un esperimento che dimostrò la correttezza del modello della replicazione semiconservativa (esperimento che sarà oggetto di un'ESERCITAZIONE).

Per la loro ricerca utilizzarono due isotopi dell'azoto, ^{14}N (7 protoni e 7 neutroni) e ^{15}N (8 neutroni), per distinguere i due filamenti di DNA neosintetizzati dai due filamenti parentali. Fecero crescere dei batteri per molte generazioni in terreno contenente cloruro di ammonio marcato metabolicamente (sfruttare il metabolismo ospite per modificarne il suo DNA) con ^{15}N , in modo che questo isotopo *pesante* (ma non radioattivo) dell'azoto fosse incorporato nelle molecole di DNA. Trasferirono poi le cellule che contenevano il DNA marcato con ^{15}N in un terreno di coltura contenente ^{14}N , l'isotopo normale *leggero* dell'azoto. Tutti i filamenti di DNA sintetizzati dopo il trasferimento avrebbero incorporato ^{14}N e non ^{15}N .

Dato che il DNA marcato con ^{15}N è molto più denso di quello marcato con ^{14}N , i nuovi filamenti potevano essere distinti dai vecchi attraverso una centrifugazione all'equilibrio di densità, utilizzando il cloruro di cesio CsCl (un sale di un metallo pesante) e un colorante, l'etidio bromuro che serve a rendere visibile tramite raggi ultravioletti le bande di DNA. A causa della diversa densità del DNA pesante e leggero i due DNA si fermano in posizioni diverse del gradiente.

Dopo un ciclo di replicazione si ottenne un'unica banda di DNA in cui la densità era intermedia tra quella del DNA pesante e quella del DNA leggero: questo dimostra che è per metà parentale e per metà di nuova sintesi.



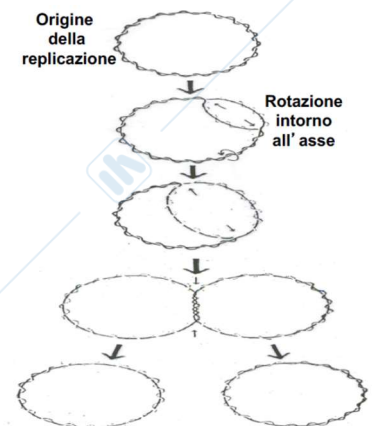
I dati ottenuti con batteri fatti crescere in ^{14}N per più generazioni fornirono ulteriori conferme: dopo il secondo ciclo trovarono la presenza di due bande, una alla densità intermedia e una alla densità del DNA- ^{14}N

REPLICAZIONE BIDIREZIONALE DI UN CROMOSOMA BATTERICO

Nel caso di DNA circolare, questo processo è chiamato **REPLICAZIONE TETA** perché si vengono a formare strutture intermedie che hanno la forma della lettera greca teta.

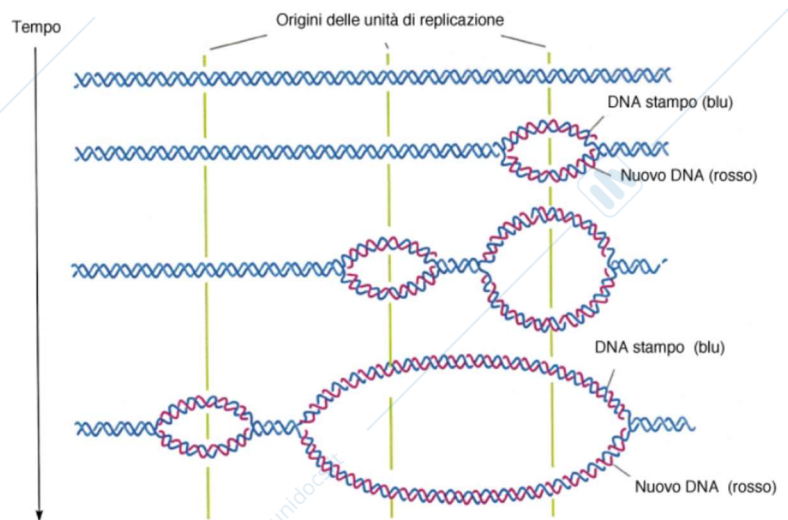
Si replica a partire da una **SINGOLA ORIGINE** per poi propagarsi in entrambe le direzioni.

Quando la replicazione del DNA è terminata e l'accrescimento della cellula è terminato, i due anelli di DNA restano interconnessi ed è richiesto l'intervento di una topoisomerasi per staccarli l'uno dall'altro.



REPLICAZIONE NEGLI EUCARIOTI

A differenza del cromosoma circolare dei batteri, la replicazione delle molecole lineari che costituiscono i cromosomi eucarioti ha **MOLTEPLICI SITI** di inizio (DNA troppo lungo per avere un singolo sito di replicazione), da cui si generano altrettante unità di replicazione, dette **REPLICONI**. Due bolle di replicazione possono aprirsi contemporaneamente e non (reciproche o tardive). Il DNA viene sintetizzato a livello di due forcelle di replicazione che si allontanano dall'origine in direzioni opposte, generando una **BOLLA** di **REPLICAZIONE**. Quando la bolla di un replicone incontra la bolla di un replicone adiacente, il DNA sintetizzato dai due repliconi si unisce.



INIZIO DELLA REPLICAZIONE

Le origini di replicazione sono i luoghi in cui vengono reclutate le numerose proteine che innescano la denaturazione del DNA e la sua successiva replicazione.

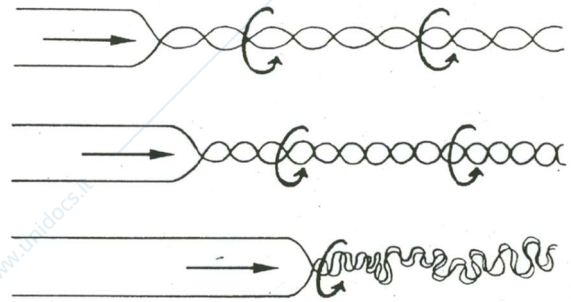
Inizialmente, un complesso proteico multi-subunità, noto come **COMPLESSO DI RICONOSCIMENTO DELL'ORIGINE (ORC)** si lega all'origine di replicazione. Successivamente si lega il **COMPLESSO MCM** (proteine di mantenimento del microcromosoma), che contiene diverse **DNA ELICASI** che facilitano la replicazione denaturando la doppia elica. Questo complesso richiede la partecipazione di un terzo gruppo di proteine, i **CARICATORI DELL'ELICASI**, che mediano il legame delle proteine dell'MCM all'ORC. Nel complesso questi tre gruppi di proteine prendono il nome di **COMPLESSO DI PRE-REPLICAZIONE**.

La proteina iniziatrice si lega al DNA nel punto di origine della replicazione e, utilizzando l'energia derivata dall'ATP, inizia a denaturare il DNA. Il DNA, per essere duplicato, deve aprirsi in una bolla di replicazione in cui le basi azotate di un filamento devono andare ad interrompere/spezzare i legami con le altre basi azotate del secondo filamento. Questo avviene grazie all'azione di una particolare proteina (enzima), la **DNA ELICASI**,

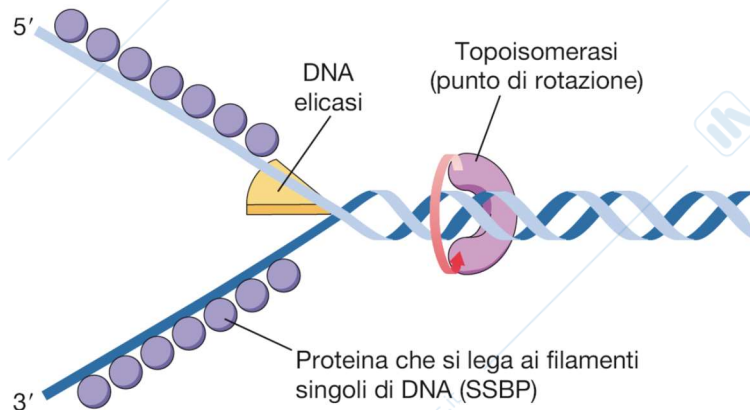
in grado di individuare specifiche basi azotate e spezzarne i legami idrogeno: sono proprio delle specifiche sequenze contenute nel genoma a richiamarle (azione di particolari proteine che sono in grado di individuare specifiche basi azotate e spezzare i legami).

La duplicazione parte contemporaneamente in due direzioni, verso destra e sinistra: la forcella replicativa di destra (speculare a quella di sinistra) è un filamento definito "anticipato" perché viene sintetizzato nella stessa direzione complessiva di replicazione.

Nel momento in cui si tenta di aprire la doppia elica del DNA, si viene a generare una forza opposta che sostanzialmente determina un impedimento della continuazione dell'apertura dei due filamenti (l'estremità del cromosoma è impossibilitato a srotolarsi). Questa tensione deve essere allentata in modo tale da continuare la replicazione, e questo avviene grazie agli ENZIMI TOPOISOMERASI: associati al DNA, sono capaci di rompere un legame fosfodiesterico tra i due filamenti consentendo il passaggio e lo srotolamento di un filamento, facendolo rotare attorno all'asse del filamento di 360° , per poi ricostruire il legame e la doppia elica. È dunque in grado di rilassare la torsione imposta dalla forcella di replicazione e di eliminare i superavvolgimenti.



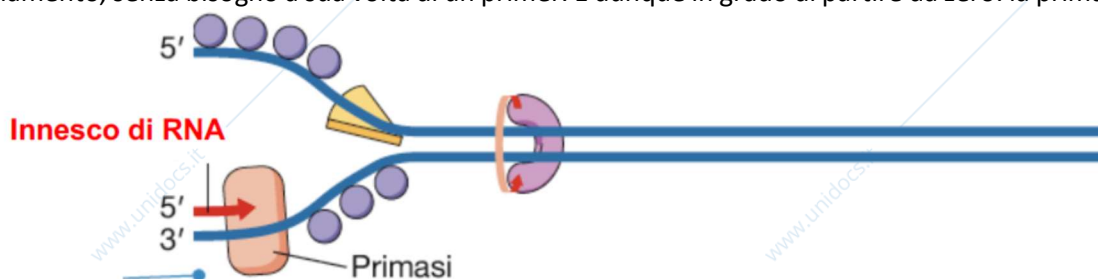
Per mantenere i due filamenti aperti, inoltre, devono essere presenti delle particolari proteine SSBP (single strand binding protein) che vanno a legarsi, schermando i possibili legami idrogeno che le basi vorrebbero formare per ricostruire la doppia elica.



CORPO DELLA REPLICAZIONE

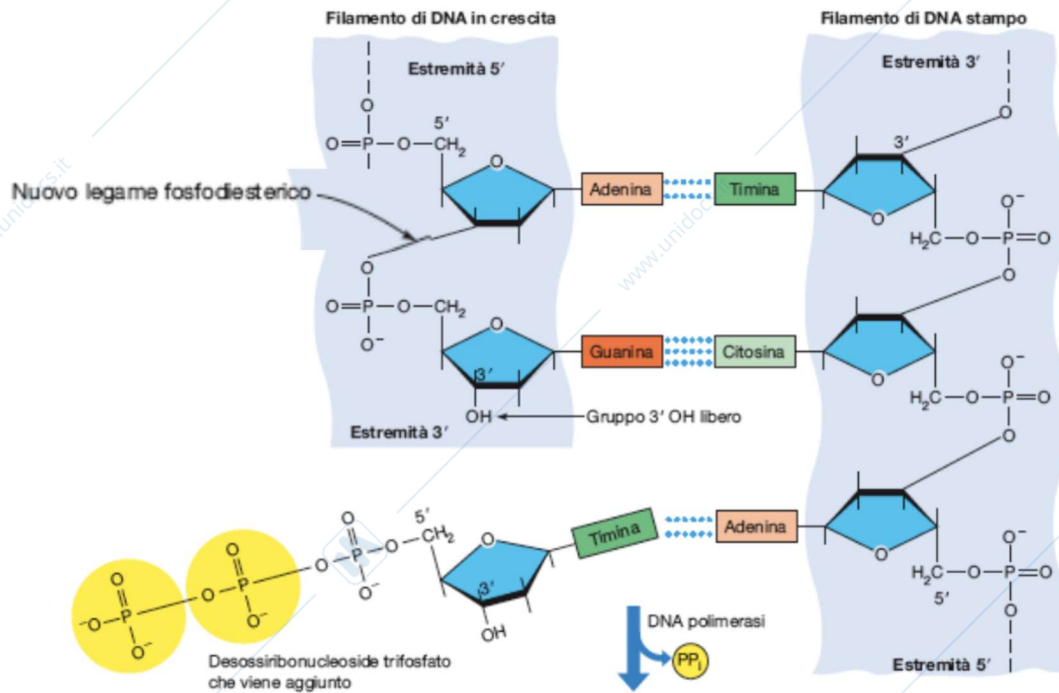
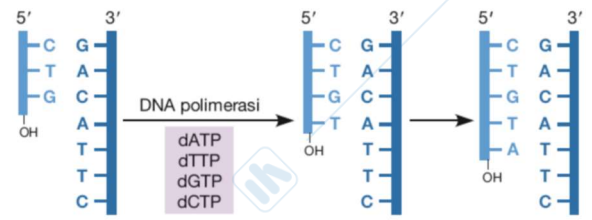
La sintesi del nuovo filamento di DNA è determinata principalmente dall'enzima DNA POLIMERASI, il quale funziona in direzione $5' \rightarrow 3'$ (direzionalità sempre ben determinata): il $5'$ fosfato sarà sempre il primo nucleotide da dove si è originato il filamento e il $3'$ sempre l'ultimo. Questo enzima è però in grado di aggiungere nuovi nucleotidi solo ad un filamento nucleotidico già esistente. Quindi come inizia la replicazione del DNA?

La sintesi del DNA inizia con la formazione di corti PRIMER (inneschi) di RNA. I primer sono sintetizzati dalla PRIMASI, un enzima che utilizza come stampo una molecola di DNA a singolo filamento per guidare la sintesi di un tratto complementare di RNA. La primasi è un particolare tipo di RNA POLIMERASI, coinvolto solamente nel processo di replicazione del DNA, in grado di iniziare una nuova catena polinucleotidica complementare a un filamento, senza bisogno a sua volta di un primer. È dunque in grado di partire da zero: la prima reazione

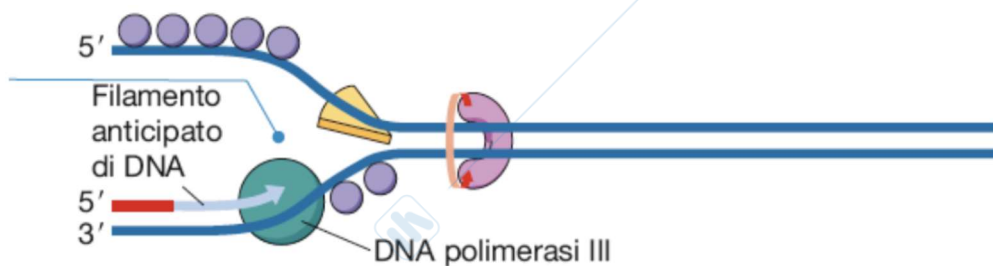


che avviene è quella che permette a due nucleotidi di legarsi insieme (è proprio questo che la differenzia dalla DNA polimerasi).

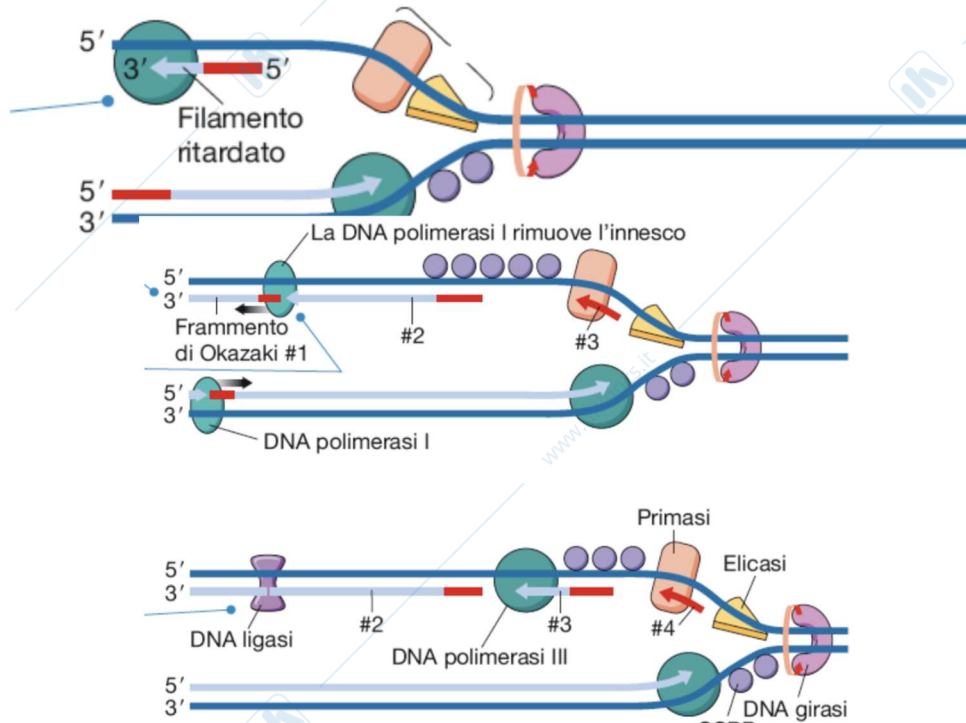
Dopo che si è formato il primer di RNA, la sintesi del DNA può procedere e la DNA POLIMERASI III (più veloce di tutte le altre) può aggiungere uno dopo l'altro i desossinucleotidi all'estremità 3' -OH del primer e dei nucleotidi successivi.



Per il filamento anticipato, è necessario un unico primer di RNA al momento della formazione di una forcella di replicazione. La DNA polimerasi III può quindi aggiungere nucleotidi alla catena in modo continuo (si muove nella stessa direzione di quella complessiva della replicazione) in direzione 5' → 3'.

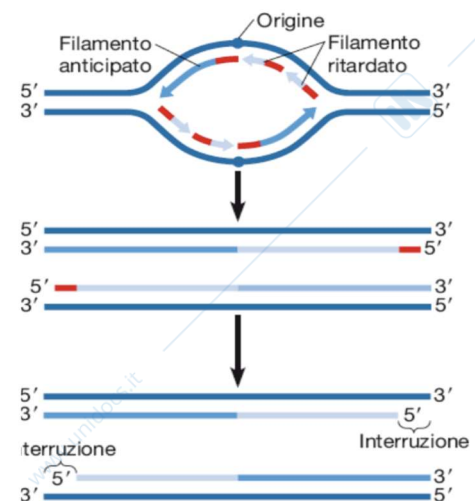


Il filamento ritardato, al contrario, è sintetizzato attraverso una serie di frammenti, conosciuti come FRAMMENTI DI OKAZAKI discontinui, ciascuno dei quali deve essere iniziato a partire da un diverso primer di RNA. A partire da ciascun primer, la DNA polimerasi III aggiunge desossinucleotidi fino a che il frammento che è sintetizzato non raggiunge il frammento adiacente.

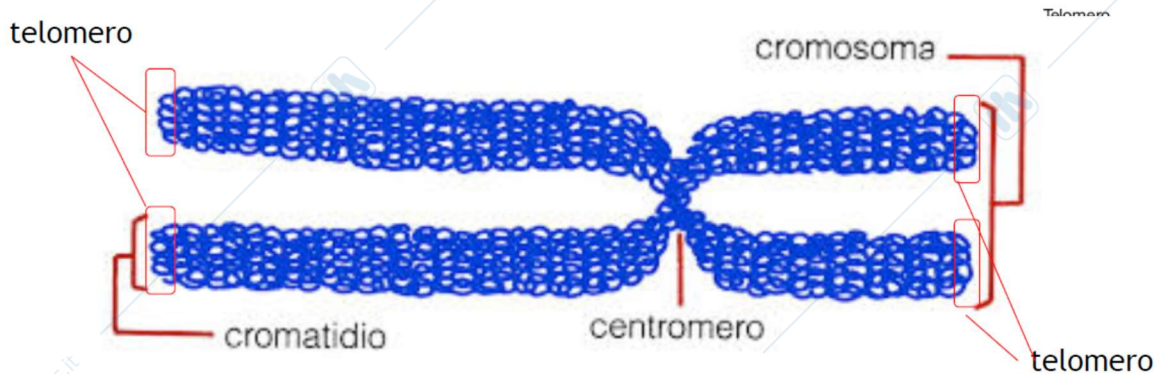


A questo punto il primer di RNA, che non ha più una funzione, è rimosso dalla DNA POLIMERASI I attraverso l'attività ESONUCLEASICA: agisce in direzione $5' \rightarrow 3'$, perciò rimuove il primer ed allunga il filamento nella stessa direzione fino a raggiungere il segmento sintetizzato in precedenza. Entra in gioco successivamente un nuovo enzima, la DNA LIGASI, in grado di creare un legame fosfodiesterico tra i due nucleotidi di fine e inizio di due frammenti adiacenti (non deve selezionare nessun nuovo nucleotide, ma semplicemente chiudere un legame).

Quando un filamento ritardato, allungandosi, raggiunge l'estremità della molecola di DNA e un'attività esonucleasica $5' \rightarrow 3'$ rimuove l'ultimo primer di RNA (regione poco stabile che si perde in quanto l'RNA ha un'emivita minore rispetto al DNA), rimane sul filamento neosintetizzato un tratto vuoto. Di conseguenza, le molecole di DNA lineare, a ogni replicazione, rischiano di generare molecole figlie sempre più corte: tanto più invecchiamo, tanto più le nostre cellule conterranno meno DNA. Se continuassimo a dare alla nostra progenie DNA sempre più corto, nel corso dei secoli l'uomo si estinguerebbe.

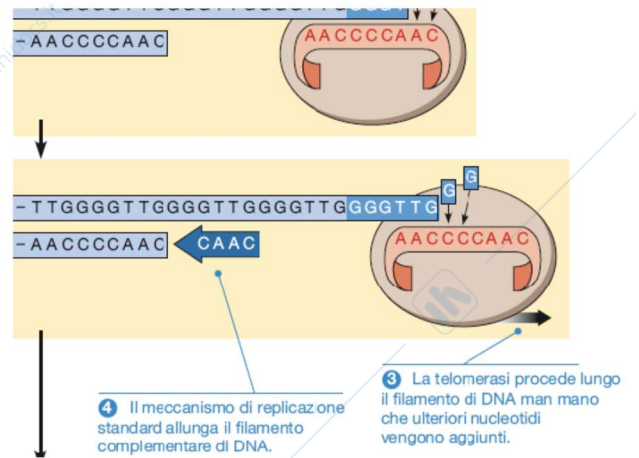


Le parti più terminali delle molecole di DNA, e più in generale dei cromosomi, sono formate da regioni altamente ripetitive, dette **TELOMERI**. Essi non portano informazione genetica ma sono importanti come orologio cellulare, in quanto una volta persi tutti i telomeri il DNA inizierà a perdere anche informazione (morte cellulare).



Le cellule della linea germinale, deputate alla produzione dei gameti, e le cellule staminali sono le uniche in cui non avviene l'accorciamento → questo perché è presente la **TELOMERASI**, una riboproteina (porzione proteica + RNA).

Oltre ad una porzione proteica, questo enzima contiene al suo interno un frammento RNA che ha una sequenza complementare alla sequenza dei telomeri (sequenze ripetute). La telomerasi è in grado di catalizzare l'allungamento del filamento principale, in modo tale da permettere la sintesi di un nuovo primer di RNA e la sintesi, da parte della DNA polimerasi, del tratto mancante di telomero.

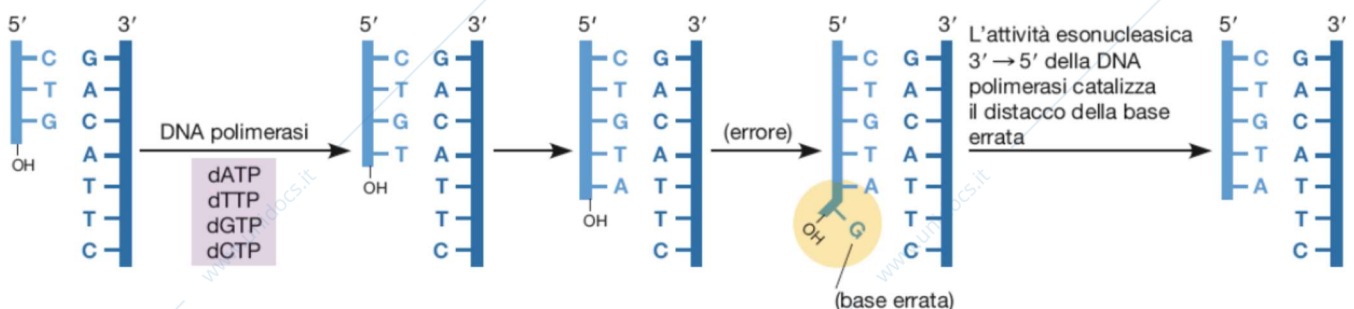


Nel 90% dei casi è stata riscontrata la presenza di questo enzima nelle cellule tumorali: l'attivazione del gene per la telomerasi permette a queste cellule di riprodursi all'infinito.

A differenza delle altre cellule, come quelle che derivano dalla pelle o i fibroblasti che si duplicheranno un certo numero di volte per poi estinguersi, le cellule tumorali sono in grado di duplicarsi senza mai estinguersi.

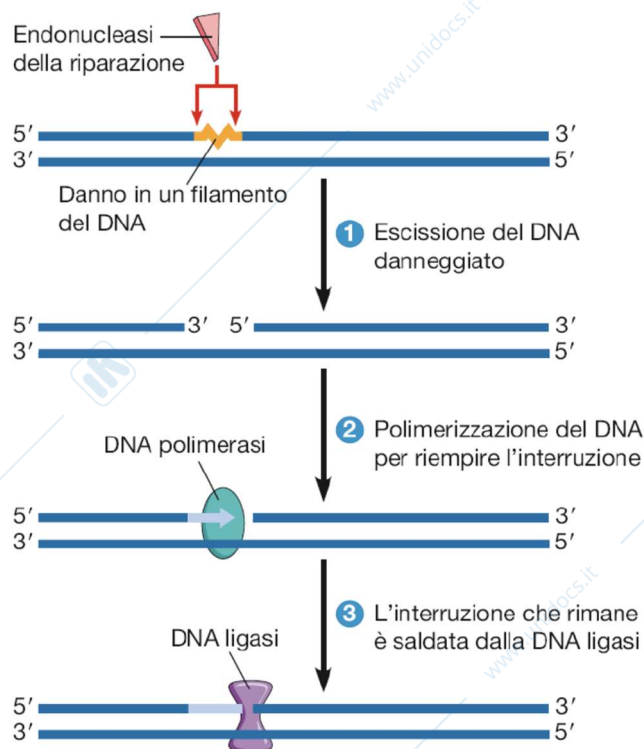
Durante la duplicazione la DNA polimerasi può introdurre degli errori, circa 1 su 10-100 milioni di basi polimerizzate. Cosa fa?

Nel momento in cui viene introdotta una base errata è in grado di identificarla e correggerla, attraverso un'azione **ENDONUCLEASICA** in direzione 3' → 5'. Questa attività di correzione, detta anche attività di correttore di bozze, consente una straordinaria precisione, circa 1 errore su 10⁷ o 10⁸ basi.



Il DNA può anche presentare dei danni che possono insorgere spontaneamente, essere indotti da fattori ambientali e da alterazioni chimiche. Un esempio di causa potrebbero essere per esempio i raggi ultravioletti. La cellula danneggiata presenta strutture specializzate per essere ricostruita:

1. Le basi danneggiate vengono individuate da DNA GLICOSIDASI specifiche, che riconoscono una specifica base deaminata e la rimuovono dalla molecola di DNA tagliando il legame che la tiene unita allo zucchero.
2. Lo zucchero a cui manca la base viene riconosciuto da un'ENDONUCLEASI DI RIPARAZIONE che
3. individua le depurinazioni, rompe il legame fosfodiesterico a un lato dello zucchero a cui manca la base e un secondo enzima completa la rimozione dell'unità zucchero fosfato
4. La DNA polimerasi utilizza poi in filamento complementare intatto per sintetizzare una nuova base utilizzando il 3' -OH creato nel passaggio precedente
5. Infine, la DNA ligasi salda le estremità del DNA per completare la riparazione



L'APOPTOSI è il suicidio, morte organizzata di una cellula, quando il suo DNA è troppo danneggiato per essere riparato.

--- Elicasi è l'enzima che consente l'apertura della doppia elica, è una proteina con struttura quaternaria. Le proteine non hanno mai una sola struttura, ma devono avere una capacità intrinseca di andare in contro a modifiche della propria struttura in base alla necessità e alla funzione. Queste minuscole alterazioni sono alla base dell'attività enzimatica dell'enzima stesso. Anche nella DNA polimerasi i suoi domini si muovono.

Il dominio di una proteina è una particolare regione di una proteina che ha una funzione propria diversa dalle altre regioni da cui è composta la proteina. ---