

## LA REPLICAZIONE DEL DNA

Il DNA ha i requisiti adatti per funzionare come materiale genetico:

- Il DNA è **variabile** tra le diverse specie
- Il DNA è **costante** all'interno di una stessa specie
- Il DNA è in grado di **duplicarsi** con grande precisione durante la divisione cellulare
- Il DNA è in grado di **custodire le informazioni** che fanno una specie diversa dall'altra
- Il DNA è **soggetto a rari cambiamenti**, chiamate mutazioni, che forniscono la variabilità genetica che permette agli organismi di evolversi nel tempo

È fondamentale che ad ogni divisione cellulare il DNA venga copiato in modo che ogni cellula figlia abbia un corredo genetico identico a quello della cellula progenitrice.

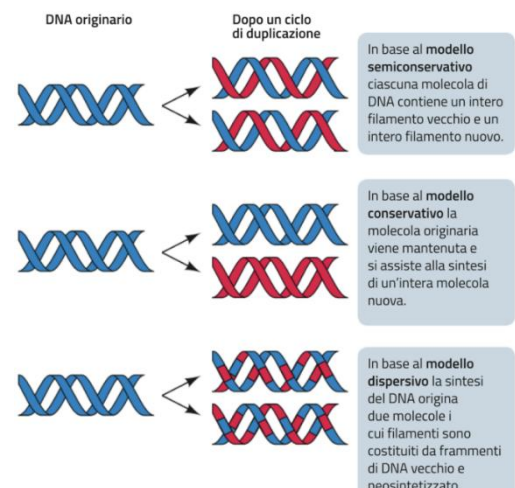
La conseguenza principale della scoperta della struttura del DNA, ad opera di Watson e Crick, è stata la comprensione dei meccanismi di replicazione del DNA.

Sono stati ipotizzati tre diversi tipi di replicazione del DNA:

**Semiconservativa:** ogni molecola di DNA è formata da un filamento originale, detto stampo o parentale, e da un filamento nuovo o figlio.

**Conservativa:** una molecola figlia a doppio filamento costituita da DNA nuovo, mentre la doppia elica originale di DNA parentale viene conservata.

**Dispersiva:** alcune parti dell'elica sono conservate e altre no, per cui le molecole figlie consistono in parte di DNA stampo e in parte di DNA di nuova sintesi



## ESPERIMENTO DI MESELSON E STAHL

Meselson e Stahl procedettero con la dimostrazione della validità del modello di duplicazione semiconservativa, incubando una coltura di *Escherichia coli* in terreno contenente solo azoto pesante (fornito in forma di cloruro di ammonio).

Dopo una generazione, estrassero il DNA (contenente solo  $^{15}\text{N}$ ) e lo centrifugarono insieme a cloruro di cesio, constatando che formava un'unica banda.

Successivamente, l'incubazione venne fatta in un terreno contenente esclusivamente  $^{14}\text{N}$ .

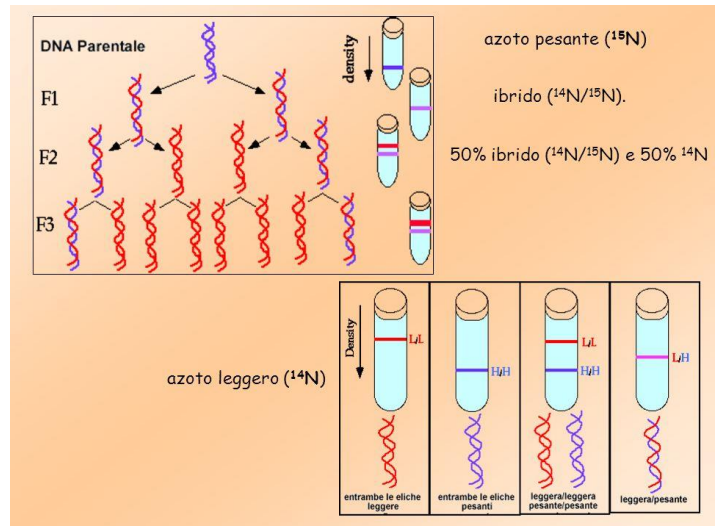
Il DNA estratto e sottoposto a centrifugazione dopo il primo ciclo di replicazione in presenza di solo azoto leggero, formava un'unica banda, meno densa rispetto alla precedente, lasciando supporre che tutte le molecole di DNA fossero per metà costituite da azoto pesante e per metà da azoto leggero.

Questi risultati consentivano di escludere il modello conservativo (si sarebbero dovute osservare due bande, una corrispondente al DNA parentale, contenente solo azoto pesante, l'altra alle molecole figlie fatte di solo azoto leggero).

Dopo la seconda replicazione comparivano due bande, una corrispondente alla precedente e una di densità minore, corrispondente al DNA con solo  $^{14}\text{N}$ .

In quest'ultimo caso si poteva escludere il modello dispersivo, che avrebbe invece portato ad osservare, in seguito a centrifugazione, un'unica banda, di generazione in generazione sempre più leggera per via della progressiva diminuzione del contenuto di azoto pesante.

Dimostrazione della replicazione semiconservativa del DNA, grazie all'esperimento di Meselson e Stahl.



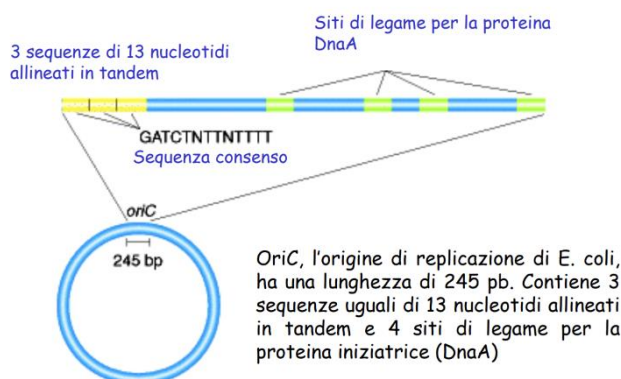
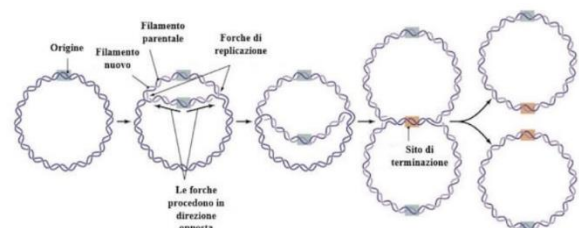
## REPLICAZIONE SEMICONSERVATIVA:

Ogni filamento di DNA contiene una sequenza nucleotidica esattamente complementare a quella del filamento opposto: per questo ognuno di essi può fare da stampo per la sintesi di un altro filamento complementare. La copiatura deve essere veloce ed accurata: una cellula in replicazione riproduce in 8 ore l'equivalente di 1000 libri sbagliando in media non più di 1 o 2 lettere.

## REPLICAZIONE DEL DNA NEI PROCARIOTI (BATTERIO E.COLI)

La replicazione inizia da un punto di origine detto *Oric* e procede in modo **bidirezionale**. Il genoma batterico contiene **due forcelle di replicazione** che si dirigono in direzioni opposte, che rappresentano le regioni di sintesi attiva del DNA.

**Modello del replicone:** Il processo replicativo del DNA viene innescato da proteine e iniziatrici (DnaA) che si legano al DNA e distanziano le catene rompendo i legami a idrogeno tra le basi in modo che le basi disaccoppiate si possono utilizzare da stampo.

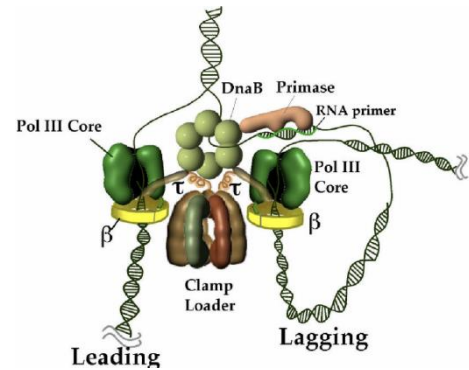


Il genoma batterico è costituito da una molecola circolare dove vi è una sola origine di replicazione.

**Oric** → l'origine di replicazione di E.coli

## Macchina replicatrice: REPLISOMA BATTERICO

Nella replicazione del DNA intervengono tutta una serie di proteine che sono aggregate in un grande complesso multienzimatico (replisoma batterico) che si sposta in blocco lungo il DNA, in modo da sintetizzare la nuova molecola su ciascuno dei filamenti originali con un'azione coordinata.



### Svolgimento del DNA: **elicasi**

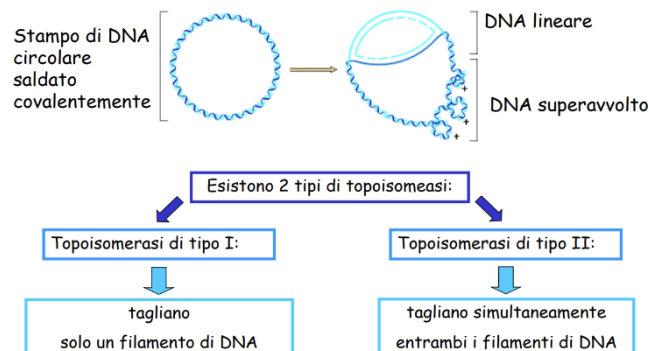
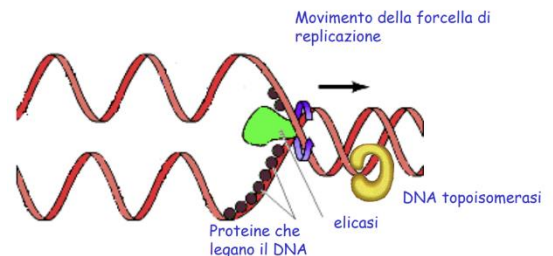
- Il processo replicativo del DNA prevede che i filamenti della doppia elica vengono slegati e distanziati
- Questo implica che la doppia elica debba subire uno srotolamento
- Lo srotolamento dipende dall'enzima elicasi (DnaB) che catalizza lo svolgimento del DNA parentale davanti alla forcella di replicazione
- L'elicasi, grazie alla propria forma ad anello avvolge il filamento discontinuo e utilizza una molecola di ATP per svolgere il DNA a doppio filamento.
- Muovendosi lungo uno dei filamenti, l'elicasi agisce come un cuneo che separa la doppia elica.

### Svolgimento del DNA: **SSBP**

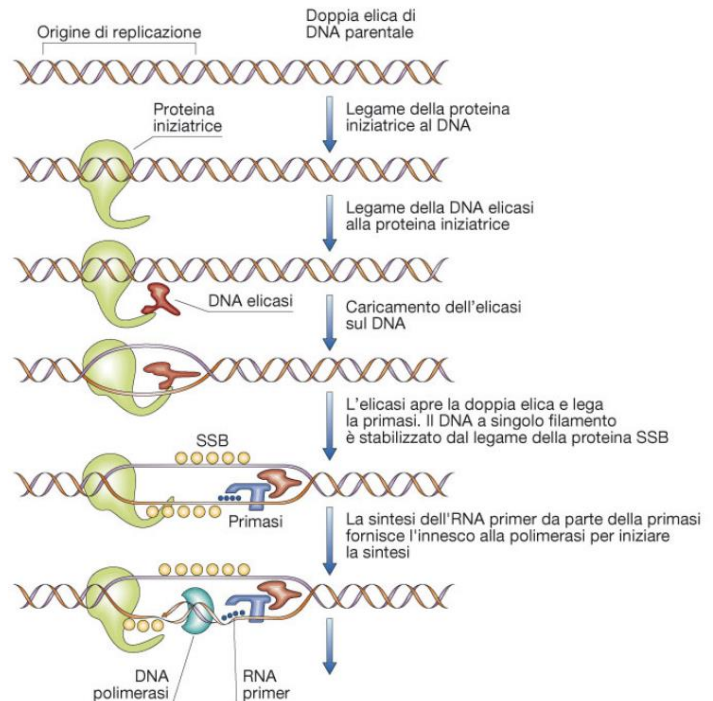
- Mentre l'elicasi svolge il DNA parentale, il singolo filamento è legato da proteine che legano il DNA a singolo filamento (SSBP), che lo proteggono dall'attacco delle nucleasi
- Le SSBP stabilizzano lo stampo di DNA svolto mantenendolo in una conformazione distesa a singolo filamento così che possa essere copiato dalla polimerasi

### Svolgimento del DNA: **Topoisomerasi**

- 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
- Questo problema è risolto dalle topoisomerasi, enzimi che catalizzano la rottura e la riunione e le riunioni reversibili dei filamenti di DNA
- I tagli indotti dalle topoisomerasi servono da perni che permettono ai due filamenti del DNA stampo di ruotare liberamente l'uno intorno all'altro in modo tale che la replicazione proceda senza arrotolare il DNA davanti alla forcella
- Le topoisomerasi II sono necessarie anche per separare molecole di DNA circolare appena sintetizzate che si intrecciano tra di loro



Sulla destra uno schema riassuntivo della successione di eventi che portano all'inizio della replicazione del DNA nei procarioti con indicate alcune delle principali proteine coinvolte



## INIZIO DELLA REPLICAZIONE:

1. La DNA A si attacca alle ripetizioni di 9 bp: la proteina si lega in modo cooperativo formando una specie di nucleo centrale proteico intorno al quale si avvolge il DNA di OriC. L'ATP interviene regolando l'attività della proteina, fa in modo che la proteina interagisca con la regione di 13 bp, si apre la doppia elica, che permette l'assemblaggio di altre proteine replicative
2. Grazie all'ATP si viene a formare una bolla di denaturazione e si ha il caricamento della DnaB (elicasi) e DnaC a livello della stessa bolla, dando origine a un complesso proteico denominato complesso di pre-innescio della sintesi del DNA. La proteina DnaC catalizza l'apertura dell'anello DnaB in modo che si possa legare al filamento di DNA. Successivamente la DnaA e la DnaC si staccano.
3. Lo svolgimento del DNA genera una tensione torsionale che è risolta dalle topoisomerasi in grado di modificare la topologia del DNA
4. La bolla di denaturazione creatasi tende a rinaturare: per evitare ciò, il DNA a singolo filamento viene stabilizzato dal legame dalle proteine SSBP
5. Infine ciascun elicasi richiama la DNA primasi (primer di RNA)
6. A questo punto agisce la DNA polimerasi

