

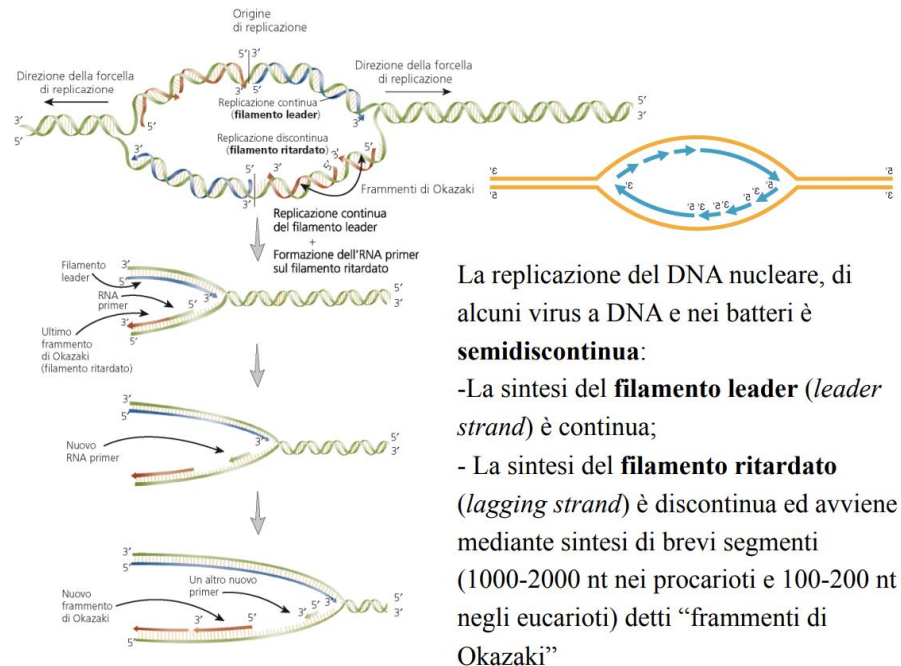
LEZIONE 7 ~ 29/03/2023

Forcelle di replicazione:

ad ogni origine di replicazione si formano due forcelle replicative che scorrono in direzione opposte rispetto all'origine aprendo man mano il DNA.

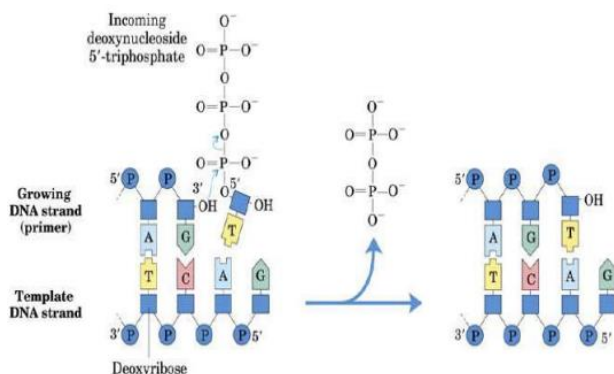
DNA polimerasi: necessita di uno stampo e di un innesco (primer).

Complesso innesco-stampo: una regione a doppio filamento tra lo stampo e l'innesco.



La replicazione del DNA nucleare, di alcuni virus a DNA e nei batteri è **semidiscontinua**:

- La sintesi del **filamento leader** (*leader strand*) è continua;
- La sintesi del **filamento ritardato** (*lagging strand*) è discontinua ed avviene mediante sintesi di brevi segmenti (1000-2000 nt nei procarioti e 100-200 nt negli eucarioti) detti "frammenti di Okazaki"



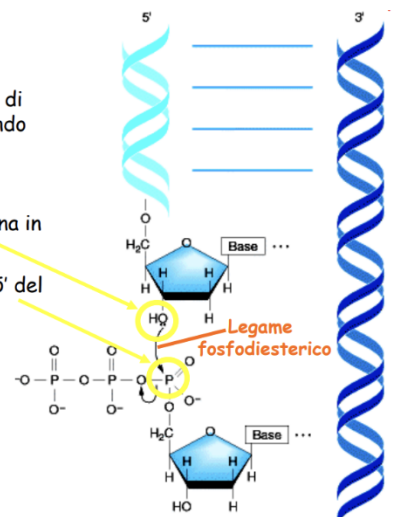
La DNA polimerasi aggiunge un nuovo nucleotide catalizzando la formazione di un legame fosfodiesterico nel rispetto della regola della complementarità tra le basi del filamento stampo.

Reazione di ALLUNGAMENTO della catena di DNA catalizzata dalla DNA Polimerasi:

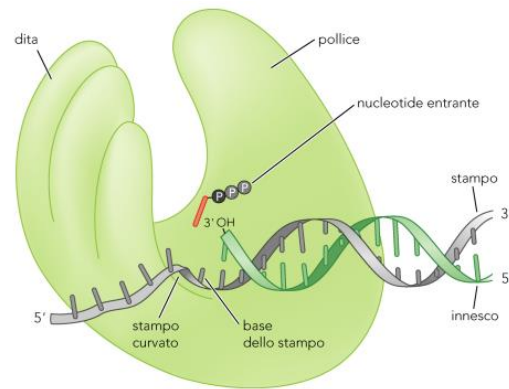
La DNA polimerasi catalizza l'aggiunta di nucleotidi all'estremità 3' di una catena di DNA in allungamento. Formando legami fosfodiesterici tra l'OH legato al C3' dell'ultimo nucleotide già unito alla catena in allungamento e il gruppo fosfato legato al C5' del nucleotide aggiuntivo.

La DNA polimerasi non si dissocia dal DNA ogni volta che aggiunge un altro nucleotide alla catena ma vi resta attaccata e vi scorre sopra continuando a catalizzare la sintesi di un nuovo polimero.

La DNA polimerasi catalizza l'aggiunta di nucleotidi all'estremità 3' di una catena di DNA in allungamento, formando legami fosfodiesterici tra l'OH legato al C3' dell'ultimo nucleotide già unito alla catena in allungamento e il gruppo fosfato legato al C5' del nucleotide aggiuntivo



Poi vi è un sito esonucleasico 3'-5' il quale permette la rimozione degli errori che la DNA polimerasi commette.



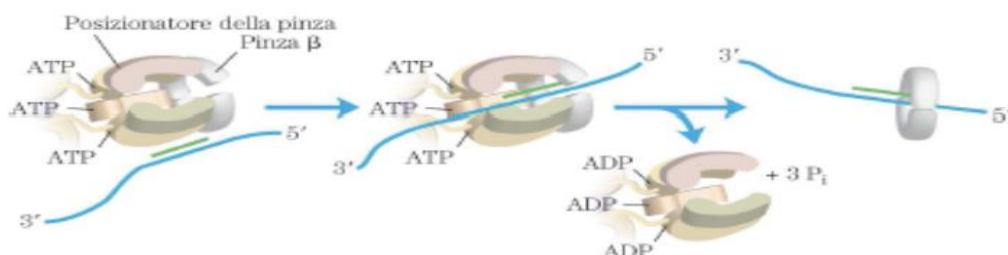
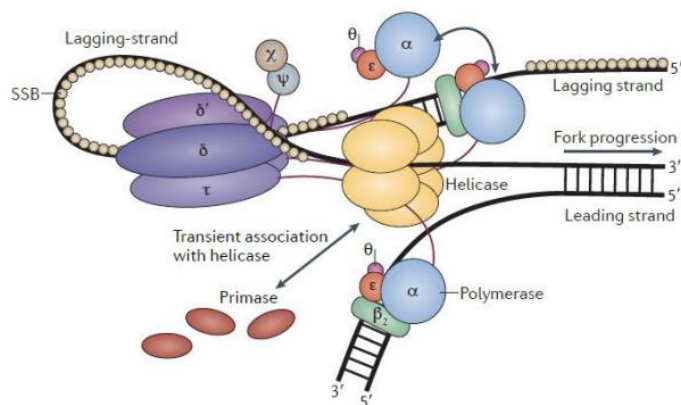
Nella funzione proofreading (o funzione di correzione) prima di tutto abbiamo l'idrolisi del nucleotide sbagliato e successivamente viene riposizionato l'OH libero e viene inserito il nucleotide complementare.

Nei procarioti vi sono varie DNA polimerasi ed in particolar modo in Escherichia Coli tre sono le più importanti:

- La DNA polimerasi I è costituita da un'unica subunità, ha una processività (aggiunta di nucleotidi prima che la DNA polimerasi si dissocia dal filamento) 3-200.
- La DNA polimerasi II è coinvolta nei processi riparativi e ha una processività di 1500.
- La DNA polimerasi III è il vero enzima che catalizza l'allungamento del filamento, infatti ha una processività maggiore di 500 mila.

La DNA polimerasi III è la “vera” polimerasi in E.Coli e ha almeno 10 differenti subunità proteiche, assemblate in tre distinti sub-complessi (nucleo centrale, complesso γ e complesso β):

1. Il nucleo centrale o (sub-complesso catalitico) ha tre subunità: α , ε , θ
 - La subunità α è quella polimerasica
 - La subunità ε è la 3'-esonucleasi
2. Poi vi è il complesso γ o **complesso di caricamento della pinza** è composto da 5 subunità: Il complesso γ è formato da proteine diverse e svolge la funzione di caricare il complesso β e coordinare la funzionalità dei due complessi catalitici tramite le subunità τ



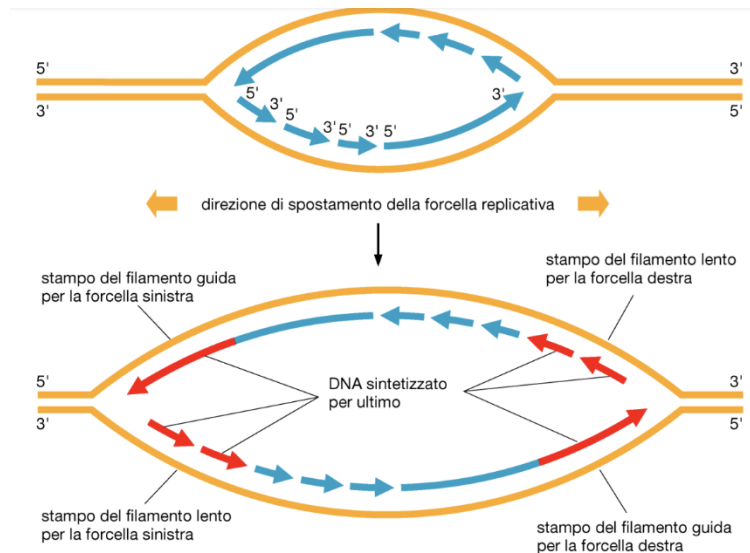
3. Poi vi è il complesso β cioè la pinza: La pinza scorrevole è costituita da proteine che mantengono la DNA polimerasi agganciata al filamento di DNA da replicare, con un modello di funzionamento che viene definito a pinza scorrevole. Due pinze scorrevoli, Sliding clamps, a forma di anello, che agiscono come dei ganci mobili, vengono caricate sul DNA sotto forma di omodimeri per azione di

un macchinario specializzato detto “caricatore della pinza”. Il caricatore della pinza è dotato di attività ATP-asi e utilizza l'energia dell'idrolisi della ATP per aprire e chiudere le pinze scorrevoli attorno al DNA.

Il meccanismo di polimerizzazione 5'-3' pone un problema alla forcella replicativa; di conseguenza alla forcella replicativa un filamento viene sintetizzato su uno stampo che va da 3' a 5', mentre l'altro filamento si forma su uno stampo che va in verso opposto, da 5' a 3'. Per questo la forcella non è simmetrica. A causa della asimmetria della forcella replicativa, la replicazione risulta semplice per uno dei due filamenti ma l'altro, sembra debba crescere nella direzione opposta.

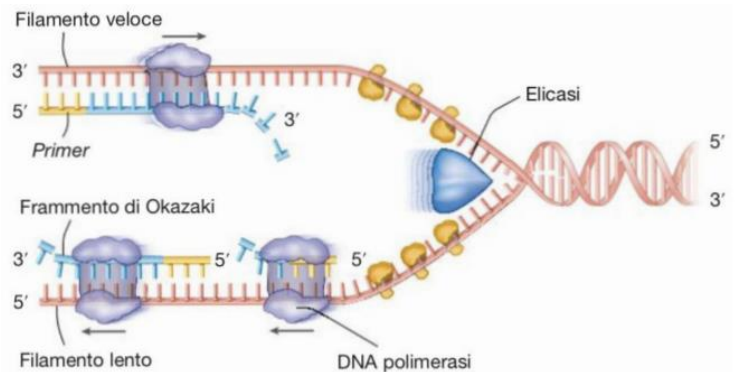
Quindi si verrà a formare:

- un **Filamento lento o ritardato**: sintetizzato in modo discontinuo
- un **Filamento guida o leader** senza interruzioni



FRAMMENTO DI OKAZAKI: Il filamento di DNA che deve allungarsi alle estremità 5' viene sintetizzato in modo discontinuo, in brevi tronconi successivi dalla DNA polimerasi che si muove all'indietro rispetto alla forcella quindi in direzione 5'-3' per ogni troncone.

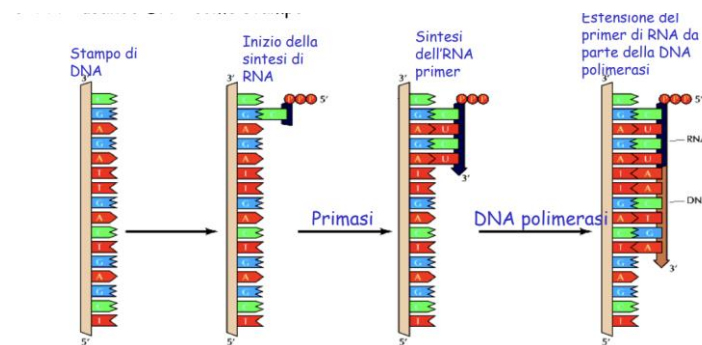
Sintesi dei frammenti di Okazaki: L'apparato replicativo si muove sempre e solo nella direzione di apertura della forcella. Si ipotizza che il filamento ritardato formi un'ansa, in questo modo la DNA polimerasi III si muove nella stessa direzione e polimerizza i nuovi filamenti su entrambi gli stampi in direzione 5' - 3'.



L'elicasi DnaB apre il DNA e interagisce con una subunità τ , mentre le altre due subunità τ connettono i due complessi catalitici tenuti sul DNA dall'interazione con il complesso β .

Il complesso catalitico che sintetizza il filamento continuo rimane associato al DNA, mentre il complesso che sintetizza discontinuamente il filamento lagging si dissocia alla fine della sintesi di ciascun frammento di Okazaki, per poi riassociarsi all'innesto sintetizzato dalla primasi nella regione dell'ansa. Questo modello porta il filamento ritardato ad agire parallelamente a quello continuo ed è chiamato "modello a trombone", per la sua somiglianza con lo strumento musicale.

DNA PRIMASI: è in grado di dare inizio ad una catena polinucleotidica nuova. La primasi sintetizza brevi tratti di RNA usando DNA come stampo. Tali tratti di RNA fanno da innesco o primer per la sintesi di DNA.



- Filamento guida: l'innesco serve solo per cominciare la sintesi all'origine di replicazione
- Filamento lento: la sintesi di DNA è discontinua perciò sono continuamente necessari i nuovi inneschi

Quando alla forcella replicativa si espone un nuovo tratto di basi libere, vengono sintetizzati nuovi inneschi a RNA disseminati lungo il filamento lento: la DNA polimerasi aggiunge un desossiribonucleotide all'estremità 3' di questo innesco, dando inizio a un filamento di DNA e allungandolo finché non si imbatte nell'innesco a RNA successivo

