

Replicazione del DNA

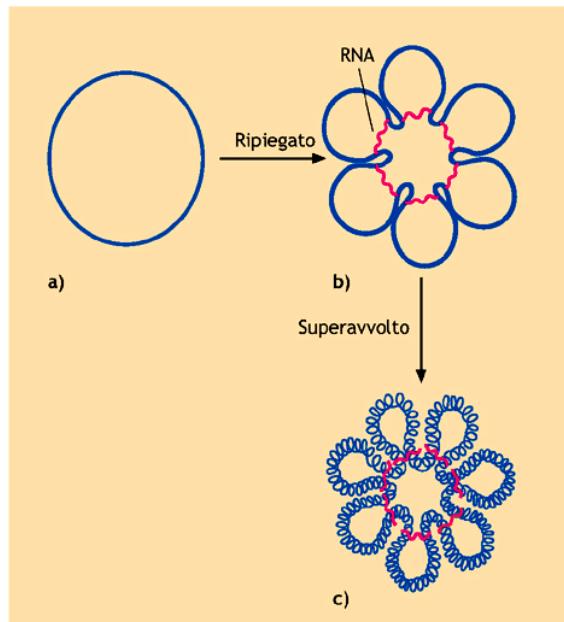
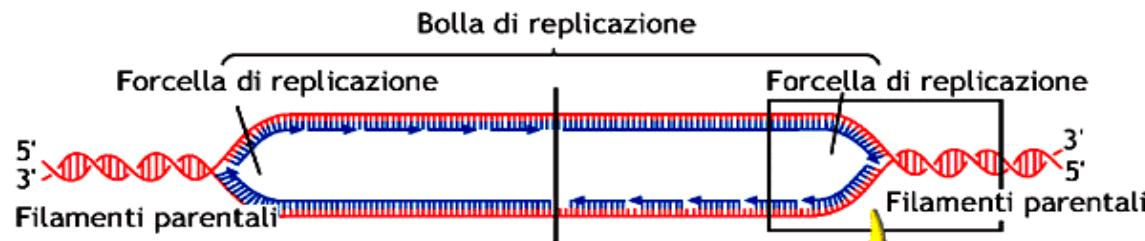


Enzimi coinvolti della duplicazione del DNA (procarioti)

- Elicasi
- Topoisomerasi
- Primasi (RNA polimerasi)
- DNA Polimerasi III
- DNA Polimerasi I
- Ligasi

Repli**c**azione del DNA: procarioti

L' **inizio della replicazione** avviene in una regione chiamata **oriC** riconosciuta dalla proteina **DnaA**. L'interazione richiama l'**'elicasi** in un sito adiacente ricco di AT: apertura della doppia elica.

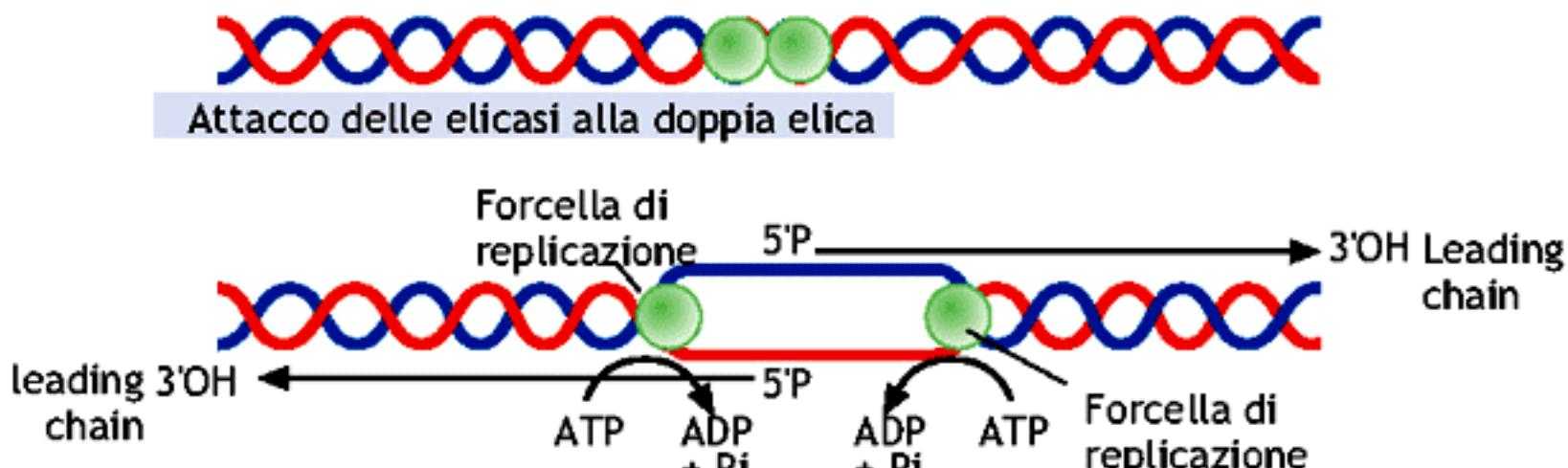


Il DNA dei procarioti

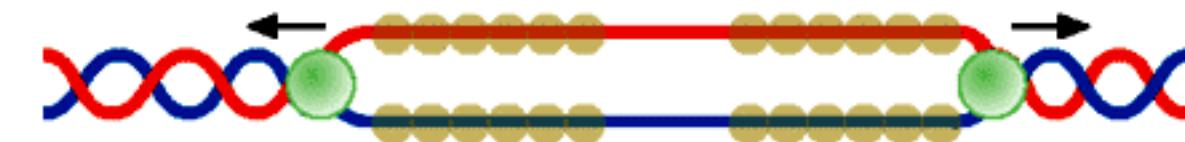
Figura 1.58 Compattamento del DNA di *E. coli*. DNA circolare nudo (a); DNA organizzato in anse (circa 50) la fibra presenta uno spessore di 2 nm, le anse sono mantenute alla base da brevi segmenti di RNA (b); le fibre che costituiscono le anse sono superavvolte intorno proteine di tipo istonico, HLP, a formare una fibra di 12 nm di spessore.



Enzimi nella replicazione del DNA: elicasi



1 molecola di ATP/giro d'elica



Attacco delle proteine ai filamenti singoli per mantenerli separati

- Elicasi, proteine che si attaccano alla doppia elica e la aprono
- Proteine di srotolamento, che destabilizzano l'elica dopo essersi attaccate ai filamenti singoli
- Direzione di avanzamento

Figura 4.5 Apertura della doppia elica e mantenimento dei filamenti separati nella formazione della bolla di replicazione.

Replicazione del DNA: topoisomerasi

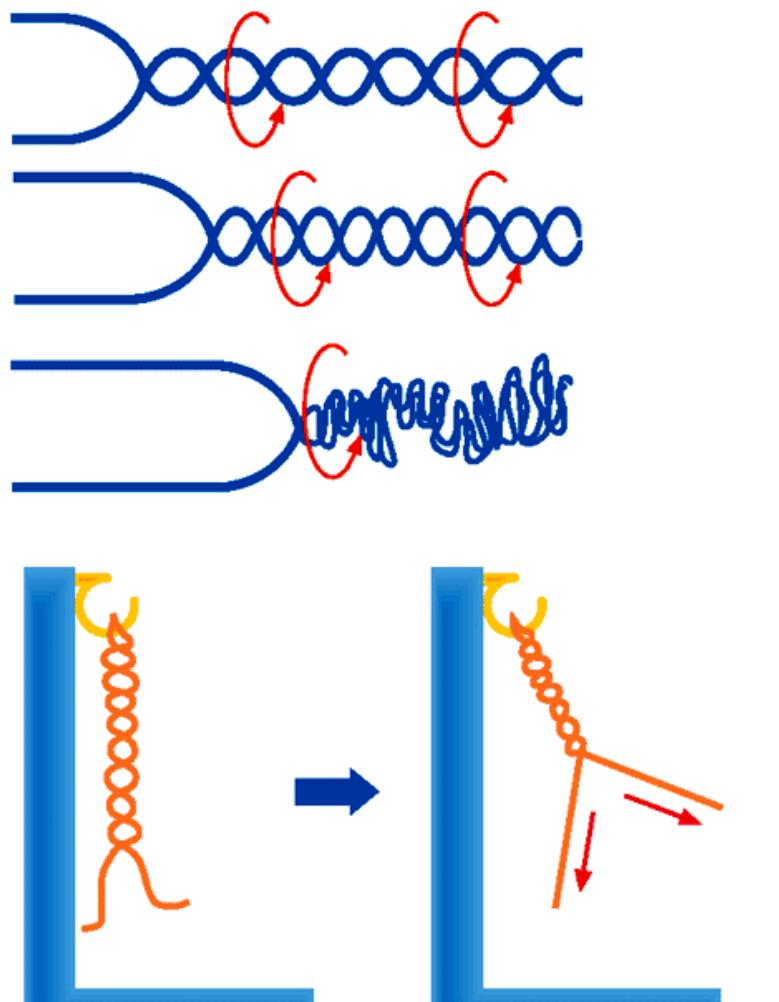


Figura 4.6 Il procedere della forcella di replicazione provoca un movimento di torsione della molecola del DNA e quindi il suo superavvolgimento come quando si vuole svolgere una corda a due capi con una delle estremità attaccata ad un uncino.

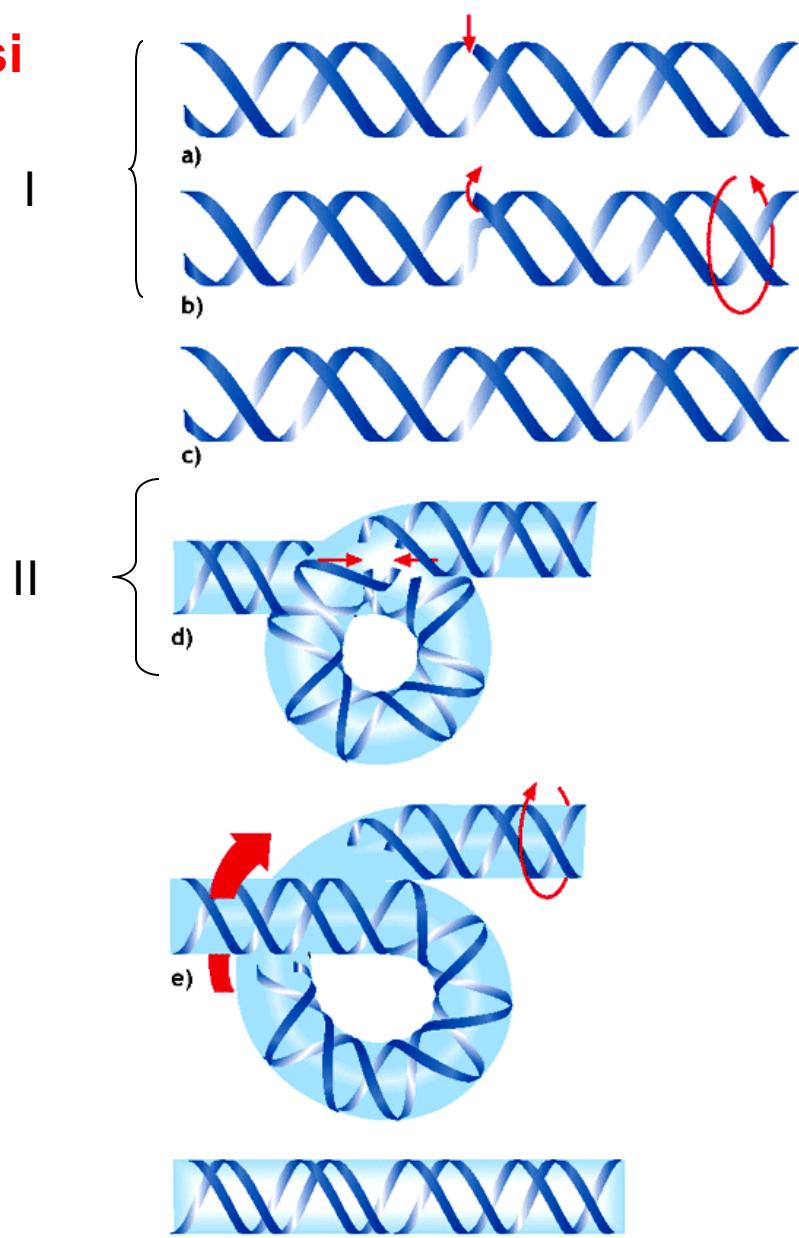


Figura 4.7 (a-b-c) L'azione della topoisomerasi I: l'enzima introduce un singolo taglio, in seguito la molecola viene risaldato. (d-e-f) L'azione della topoisomerasi II: l'enzima introduce una rotura in entrambi i filamenti, in seguito la molecola viene risaldato.

L'enzima coinvolto nella replicazione del DNA è la DNA polimerasi



Filamento vecchio usato come stampo Filamento nuovo che viene polimerizzato

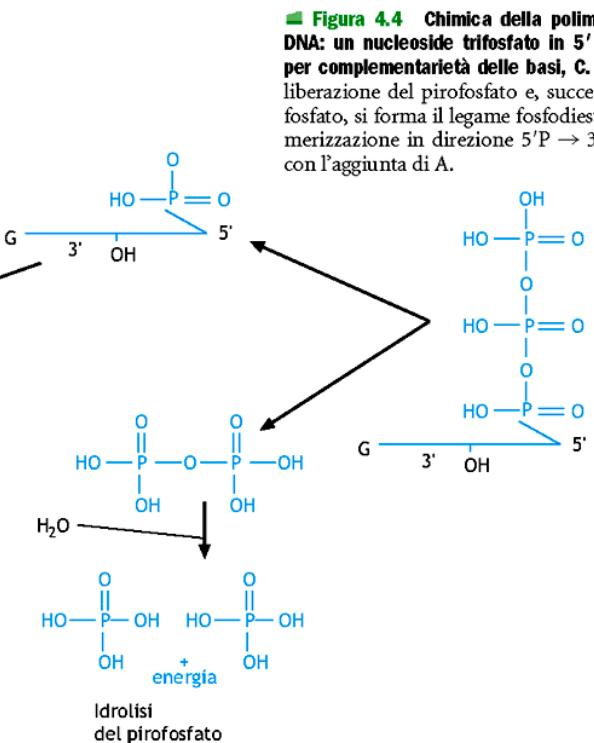
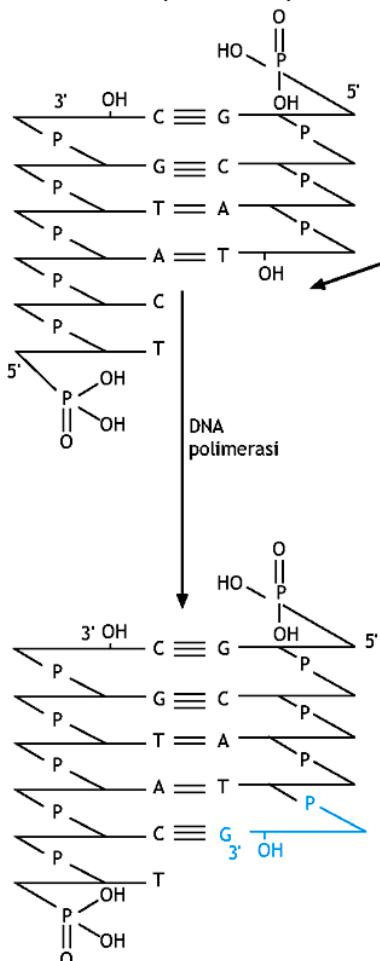


Figura 4.4 Chimica della polimerizzazione del DNA: un nucleoside trifosfato in 5' (G) riconosce, per complementarietà delle basi, C. In seguito alla liberazione del pirofosfato e, successivamente del fosfato, si forma il legame fosfodiesterico. La polimerizzazione in direzione 5'P → 3'OH continua con l'aggiunta di A.

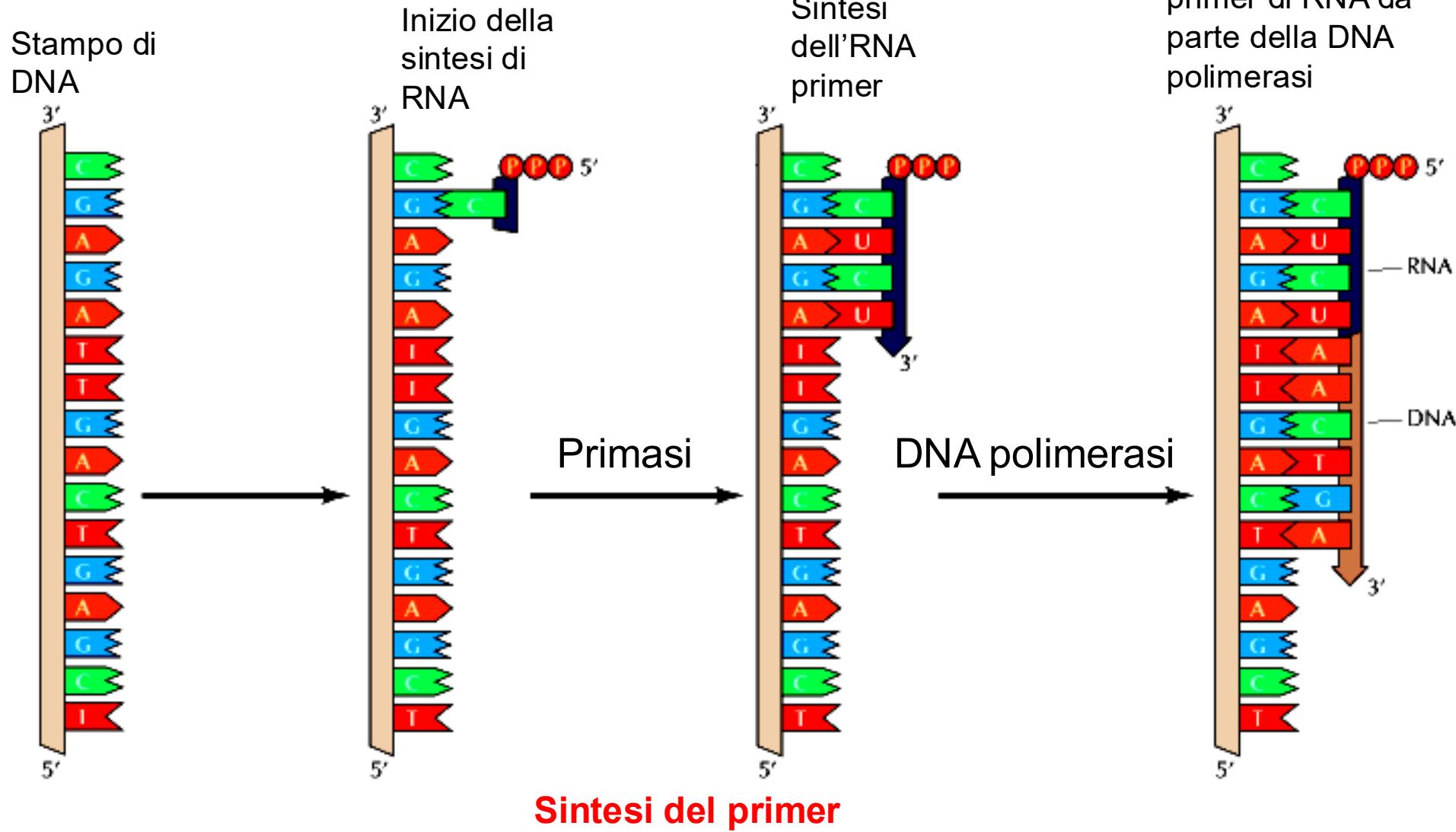
Tutte le DNA polimerasi note hanno due proprietà fondamentali in comune che hanno implicazioni fondamentali per la replicazione del DNA:

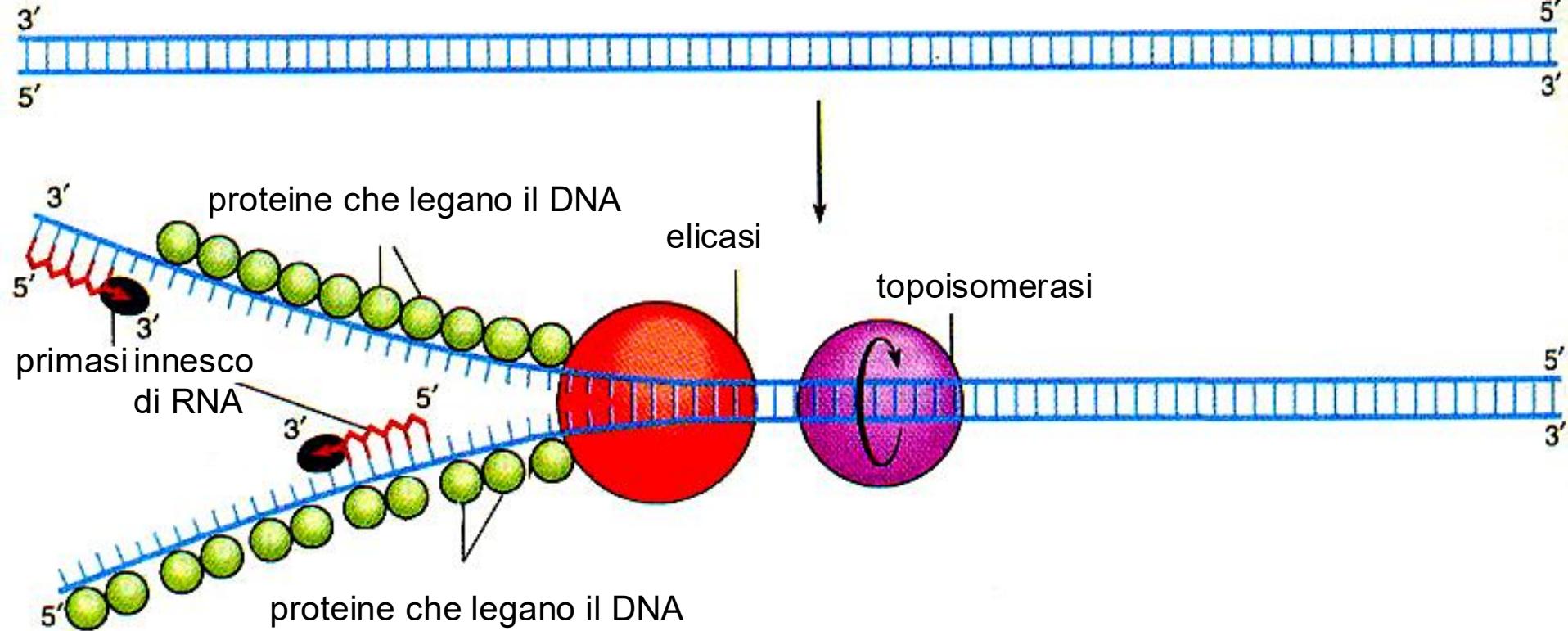
1. sintetizzano DNA soltanto in direzione 5'-3', aggiungendo dNTP al gruppo 3' ossidrile di una catena in crescita;
2. non sono capaci di iniziare la sintesi di DNA catalizzando la polimerizzazione di dNTP liberi ma hanno bisogno di un filamento primer preformato che forma legami idrogeno con lo stampo.

Replicazione del DNA: DNA primasi (RNA polimerasi)

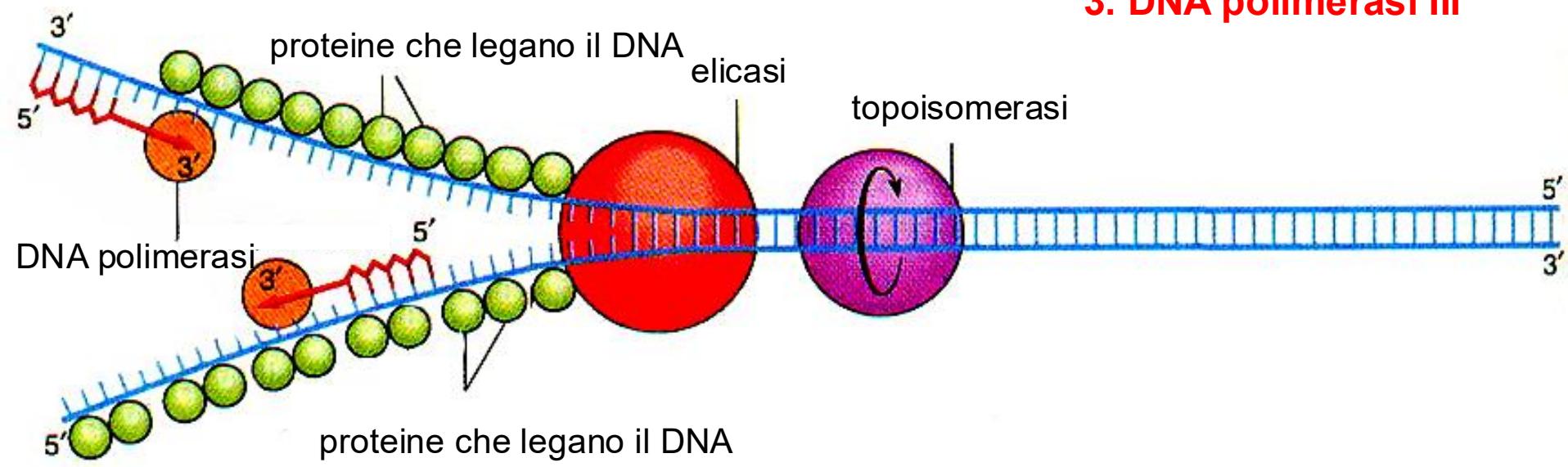
Quando il DNA si srotola, la DNA primasi sintetizza **un breve innesco di RNA** composto da circa 5-10 nucleotidi

Estensione del primer di RNA da parte della DNA polimerasi





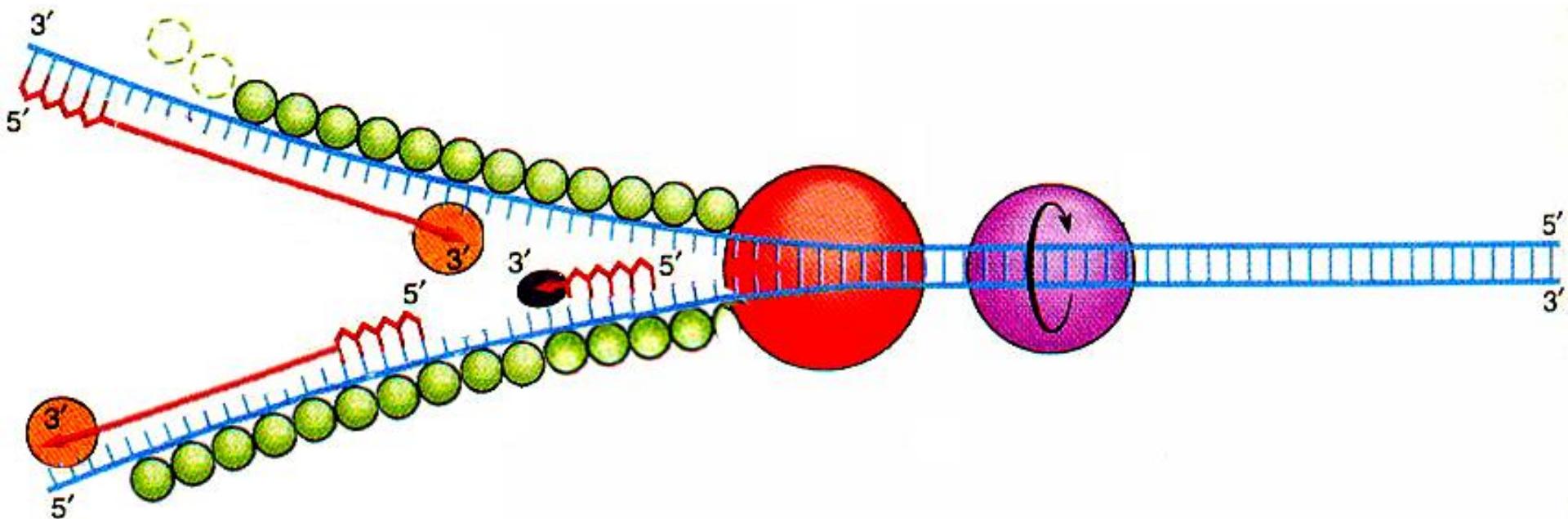
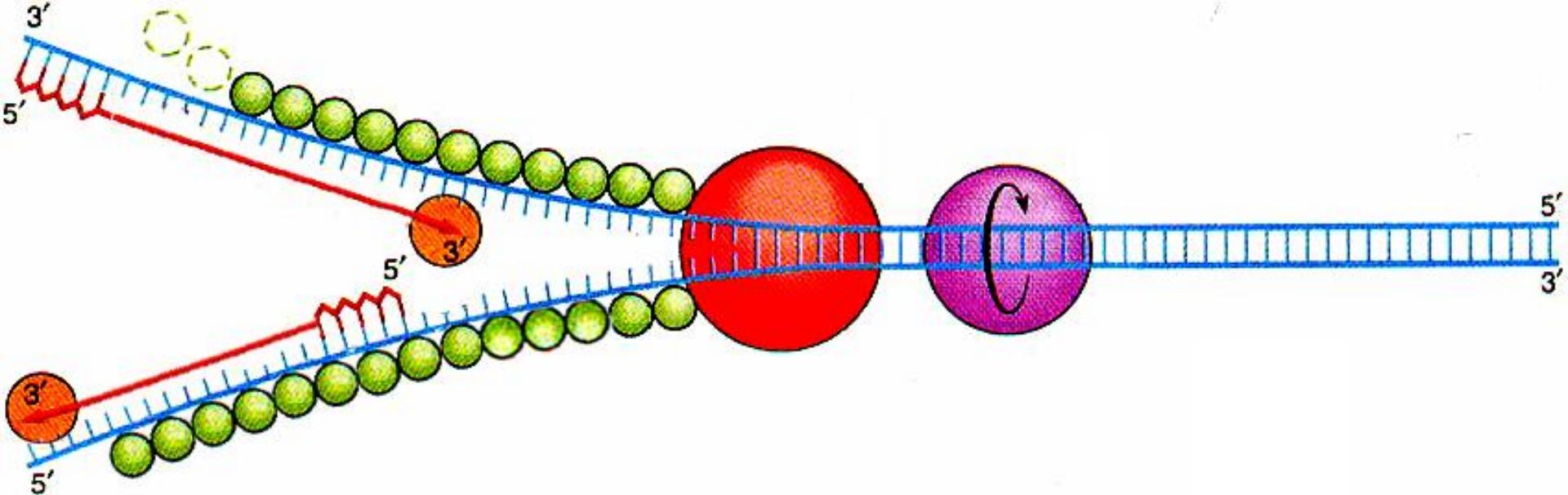
3. DNA polimerasi III



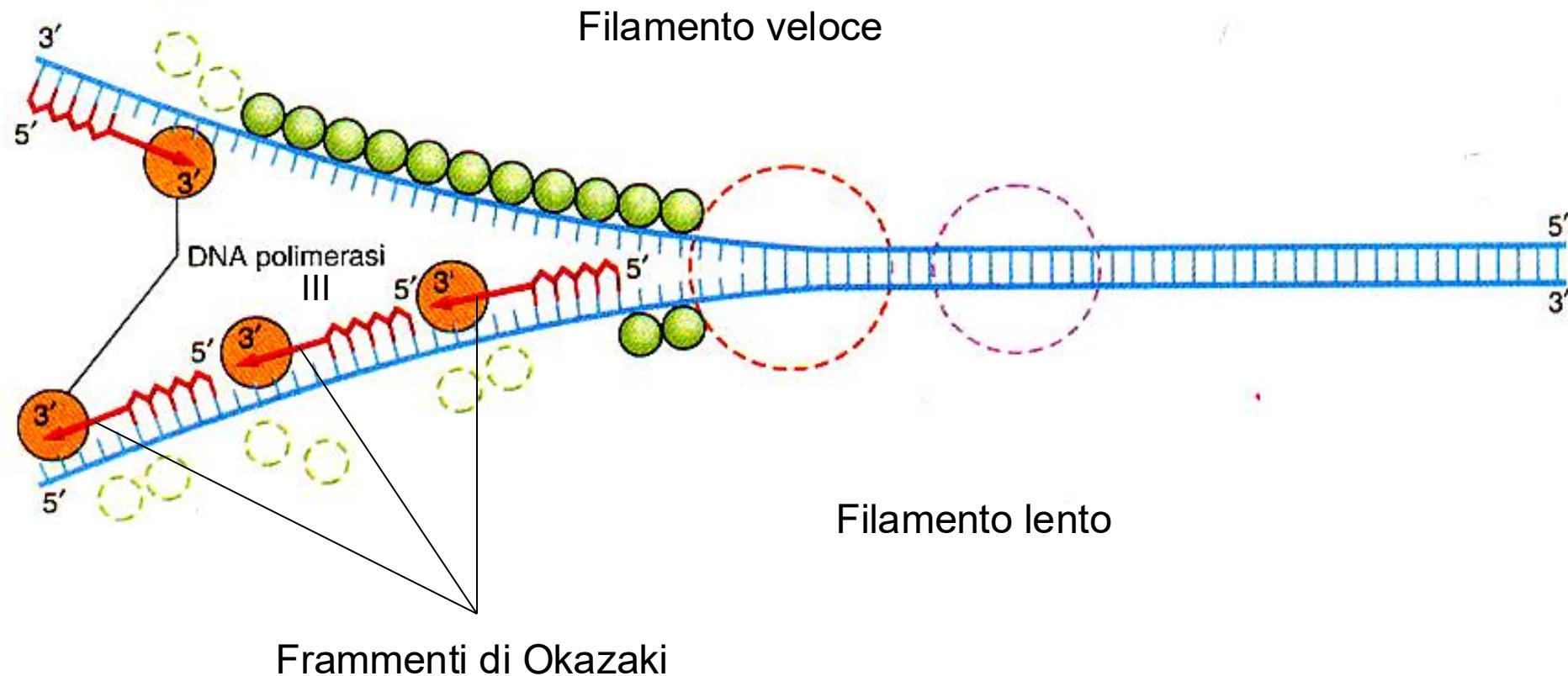
Replicazione del DNA- enzima DNA polimerasi

DNA Polimerasi procariotiche ed eucariotiche

Enzimi	Direzione della sintesi	Attività esonucleasica	Funzioni possibili
Procarioti			
Polimerasi I	$5' \rightarrow 3'$	$5' \rightarrow 3'$ $3' \rightarrow 5'$	riempimento dei "gap" lasciati dalla rimozione dell'innesco; riparazione del DNA
Polimerasi II	$5' \rightarrow 3'$	$5' \rightarrow 3'$ $3' \rightarrow 5'$	riempimento dei "gap" lasciati dalla rimozione dell'innesco; riparazione del DNA
Polimerasi III	$5' \rightarrow 3'$	$3' \rightarrow 5'$	enzima principale della replicazione
Eucarioti			
Polimerasi α	$5' \rightarrow 3'$	$5' \rightarrow 3'$	enzima principale della replicazione (con la Polimerasi δ); riparazione del DNA
Polimerasi β	$5' \rightarrow 3'$	nessuna	riparazione del DNA
Polimerasi γ	$5' \rightarrow 3'$	$3' \rightarrow 5'$	enzima principale della repl. nei mitocondri e cloroplasti
Polimerasi δ	$5' \rightarrow 3'$	$3' \rightarrow 5'$	enzima principale della replicazione (con la Polimerasi α)
Polimerasi ϵ	$5' \rightarrow 3'$	$3' \rightarrow 5'$	riparazione del DNA ; può cooperare con le Polimerasi α e δ nei meccanismi principali della replicazione



Frammenti di Okazaki



DNA polimerasi I: rimozione del primer

Dopo aver svolto la loro funzione gli inneschi vengono rimossi da parte di polimerasi che hanno attività exonucleasica 5'-3' e i "gap" lasciati dalle rimozioni vengono riempiti dalla stessa polimerasi.

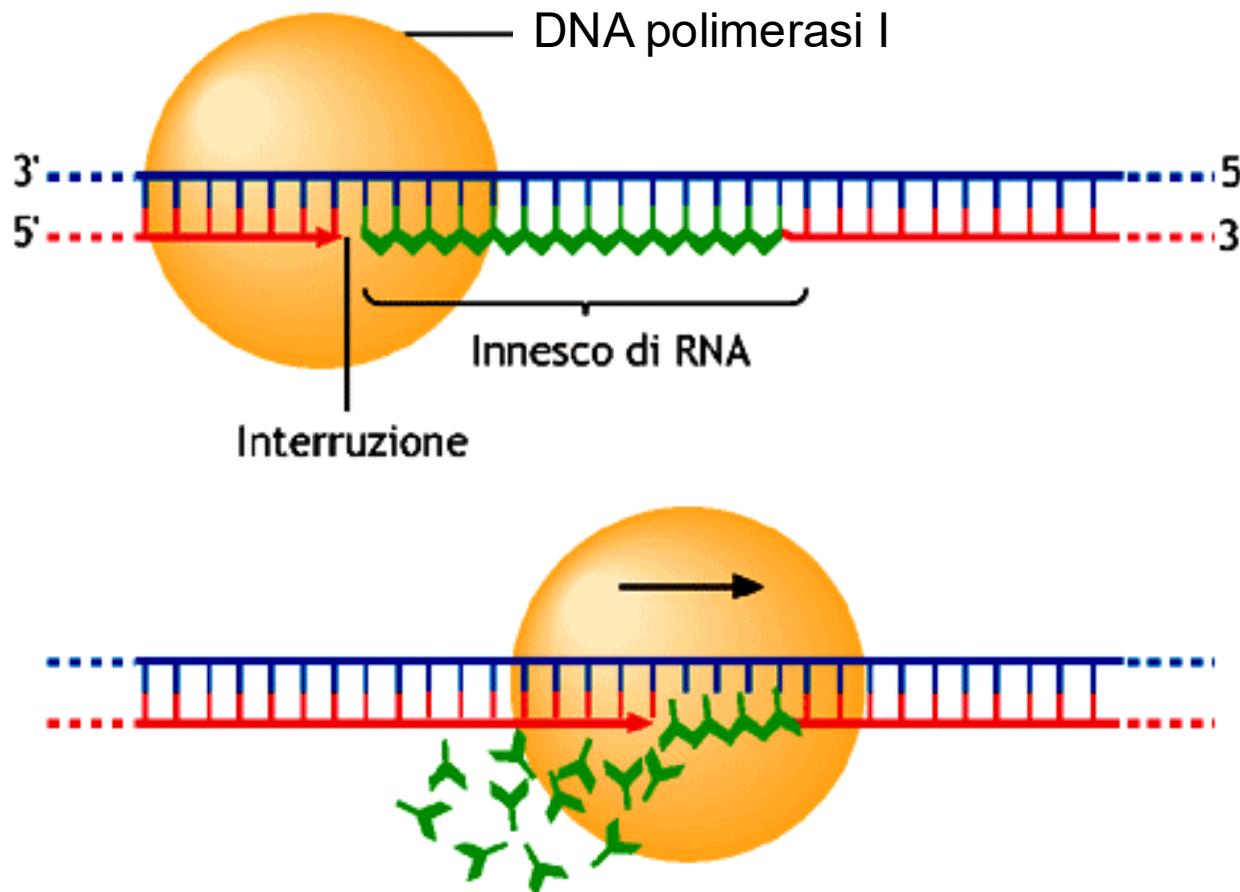


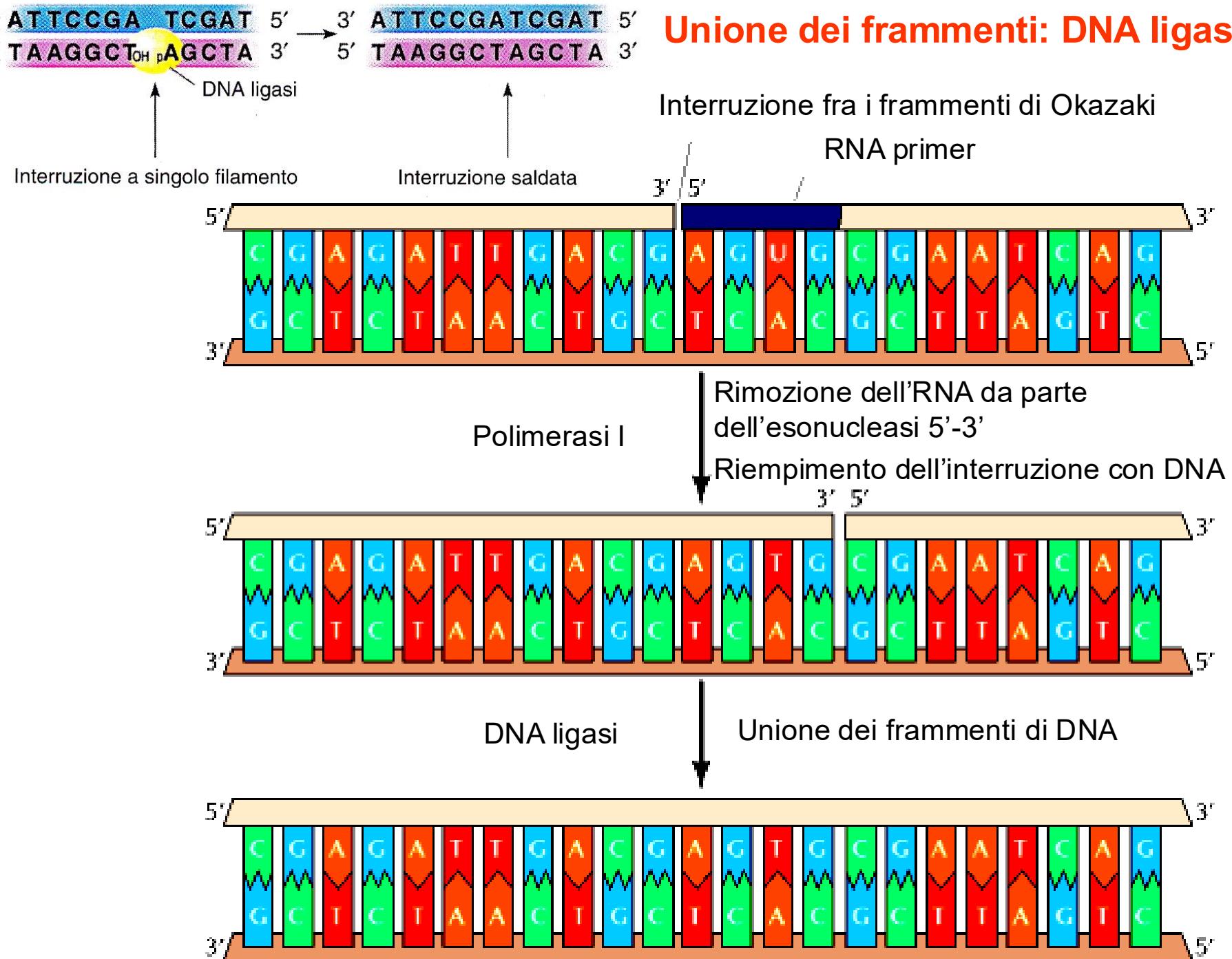
Figura 4.9 Innisco di RNA per l'inizio della replicazione del DNA.
L'innisco sarà rimosso dall'attività exonucleasica della DNA polimerasi I. La ligasi, infine, salderà i frammenti.

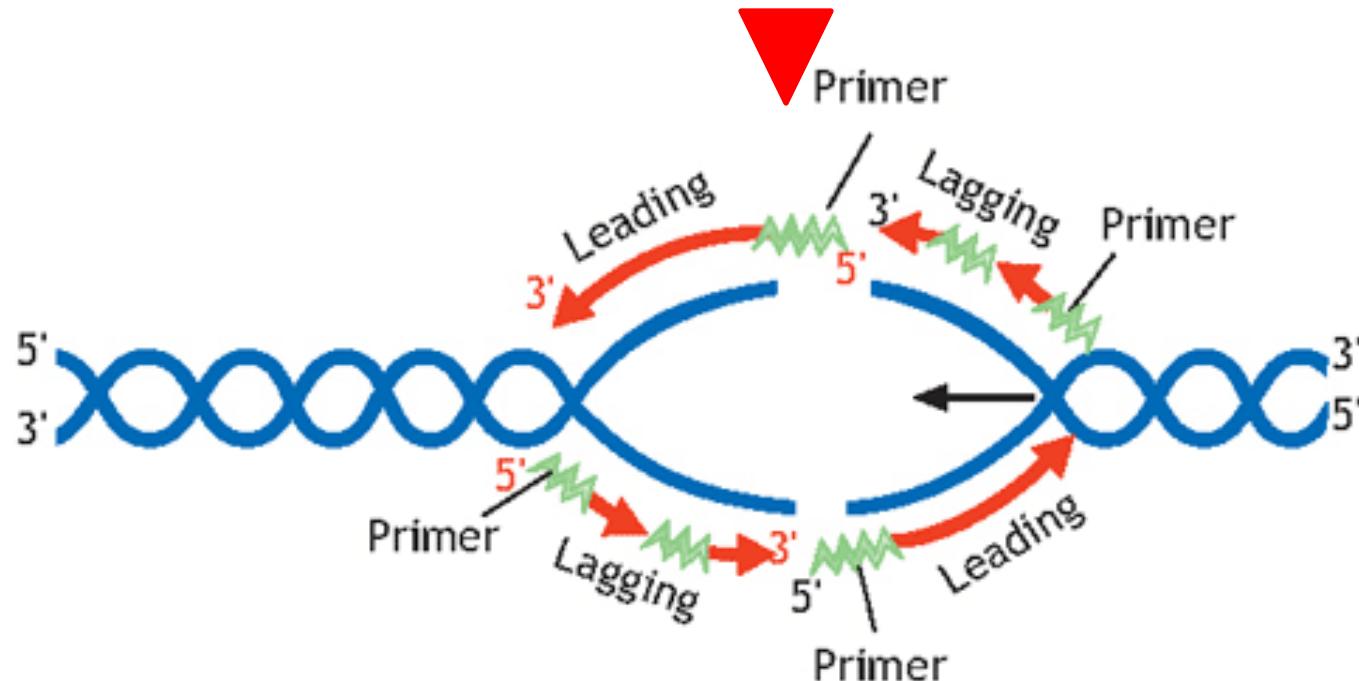
Replicazione del DNA- enzima DNA polimerasi

DNA Polimerasi procariotiche ed eucariotiche

Enzimi	Direzione della sintesi	Attività esonucleasica	Funzioni possibili
Procarioti			
Polimerasi I	$5' \rightarrow 3'$	$5' \rightarrow 3'$ $3' \rightarrow 5'$	riempimento dei "gap" lasciati dalla rimozione dell'innesto; riparazione del DNA
Polimerasi II	$5' \rightarrow 3'$	$5' \rightarrow 3'$ $3' \rightarrow 5'$	riempimento dei "gap" lasciati dalla rimozione dell'innesto; riparazione del DNA
Polimerasi III	$5' \rightarrow 3'$	$3' \rightarrow 5'$	enzima principale della replicazione
Eucarioti			
Polimerasi α	$5' \rightarrow 3'$	$5' \rightarrow 3'$	enzima principale della replicazione (con la Polimerasi δ); riparazione del DNA
Polimerasi β	$5' \rightarrow 3'$	nessuna	riparazione del DNA
Polimerasi γ	$5' \rightarrow 3'$	$3' \rightarrow 5'$	enzima principale della repl. nei mitocondri e cloroplasti
Polimerasi δ	$5' \rightarrow 3'$	$3' \rightarrow 5'$	enzima principale della replicazione (con la Polimerasi α)
Polimerasi ϵ	$5' \rightarrow 3'$	$3' \rightarrow 5'$	riparazione del DNA; può cooperare con le Polimerasi α e δ nei meccanismi principali della replicazione

Unione dei frammenti: DNA ligasi





■ **Figura 4.11** Durante la replicazione ogni catena leading è “inseguita” da una catena lagging.

La replicazione del DNA nei procarioti avviene velocemente

(1000 nt al secondo rende possibile la divisione ogni in 30 min)

Molecole di DNA durante il processo di replicazione furono analizzate per la prima volta da John Cairns (1962) in esperimenti in cui *E. coli* veniva coltivato in presenza di **timidina radioattiva**, che permetteva la successiva visualizzazione del DNA appena replicato mediante autoradiografia.



Queste molecole di DNA contenevano **due forcelle di replicazione**, che rappresentavano le regioni di sintesi attiva del DNA. A livello di ciascuna forcella i filamenti parentali del DNA si separavano e venivano sintetizzati due filamenti figli.



Molteplici forcelle di replicazione negli eucarioti

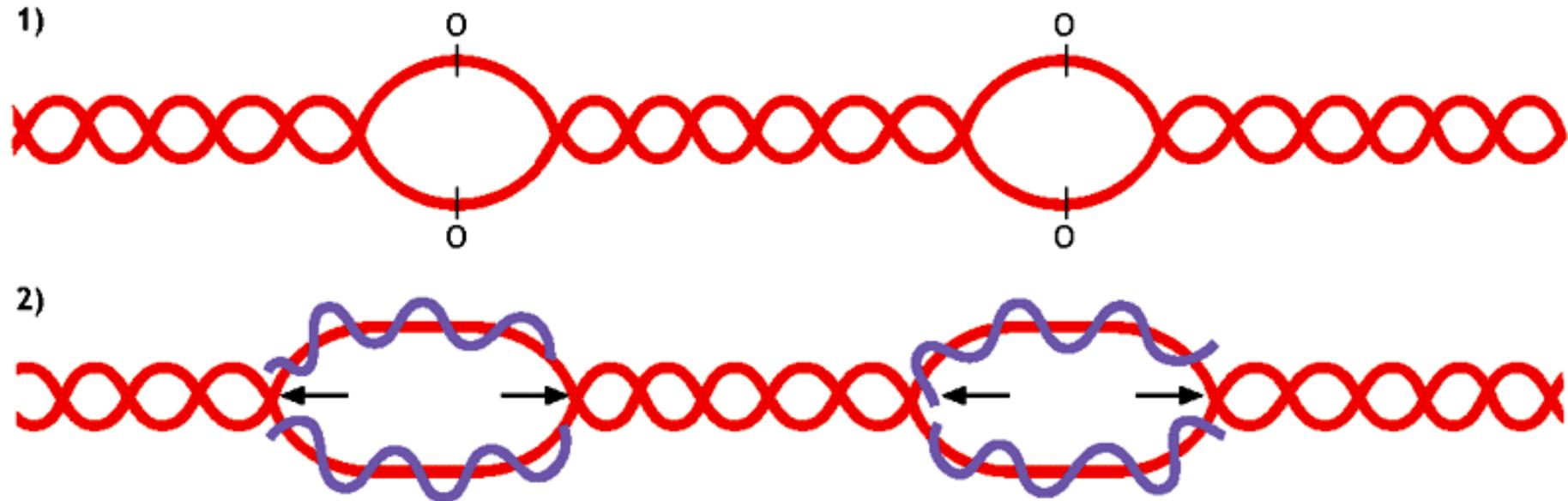


Figura 4.14 Replicazione del cromosoma degli eucarioti mediante molteplici forcelle di replicazione. **1)** In punti diversi del cromosoma, distanti circa 30.000-40.000 paia di basi, in corrispondenza delle origini di replicazione (O) si aprono i due filamenti, formando le “bolle di replicazione”. **2)** Si formano due forcelle di replicazione che procedono in senso centrifugo rispetto all’origine di replicazione, fino ad incontrarsi.

Replicazione del DNA negli eucarioti

Formazione del primer e
sintesi di DNA

Il complesso
primasi/polimerasi
viene spiazzato dal
PCNA

Assemblaggio del PCNA
intorno al primer

Legame della polimerasi δ
e sintesi del DNA

Rimozione dell'RNA primer da
parte di Fen-1 e dell'RNAasi H;
il vuoto lasciato dal primer
viene riempito

Congiungimento dei frammenti
da parte della ligasi

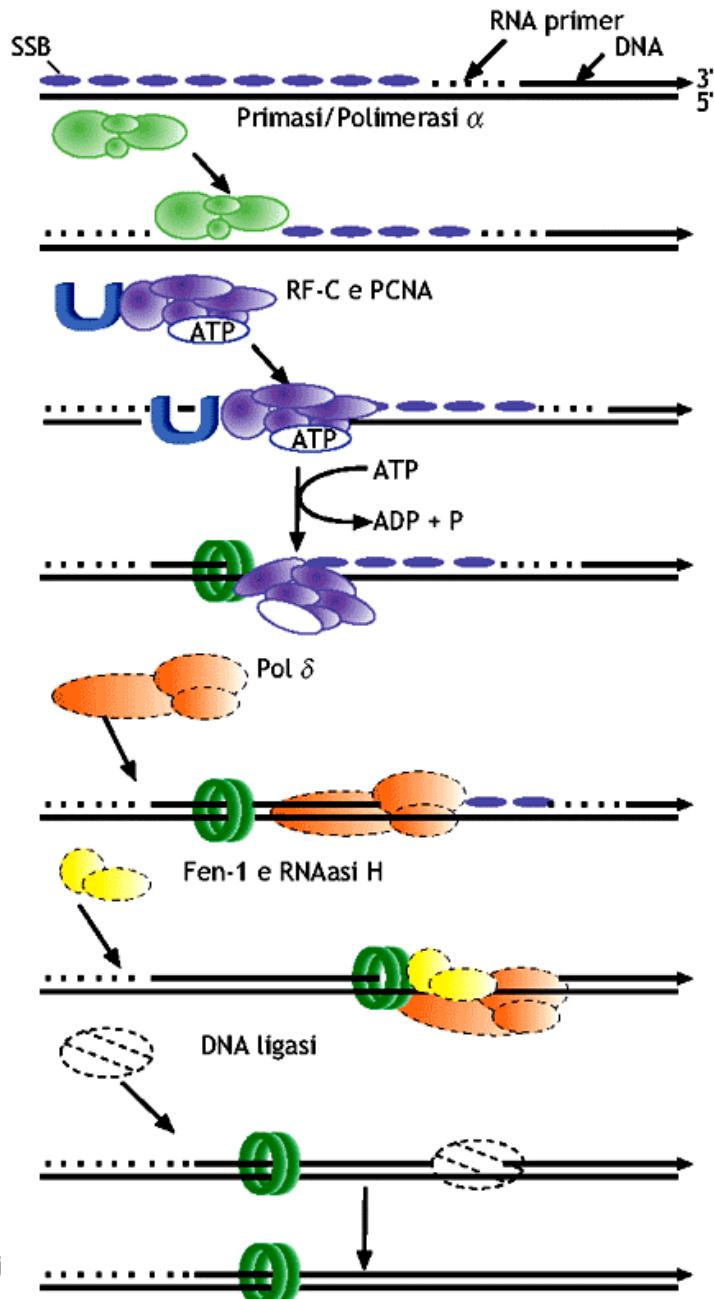
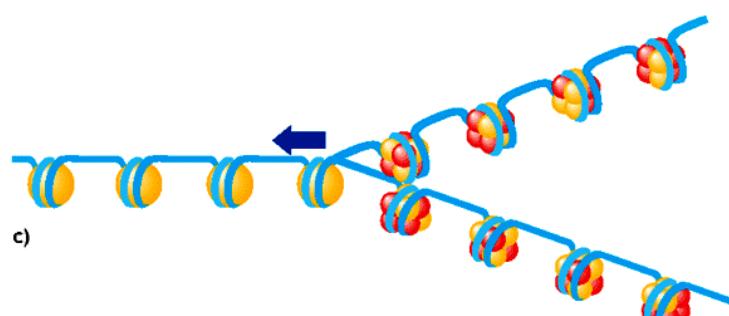
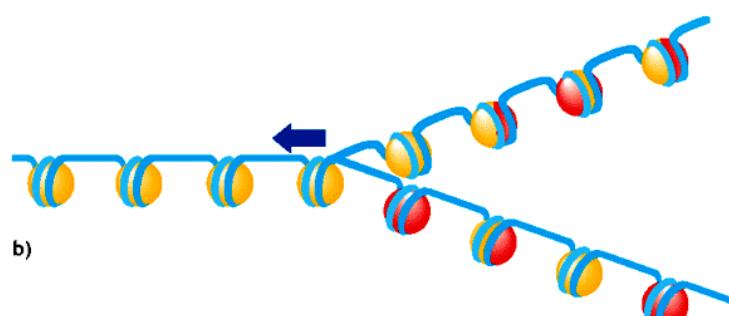
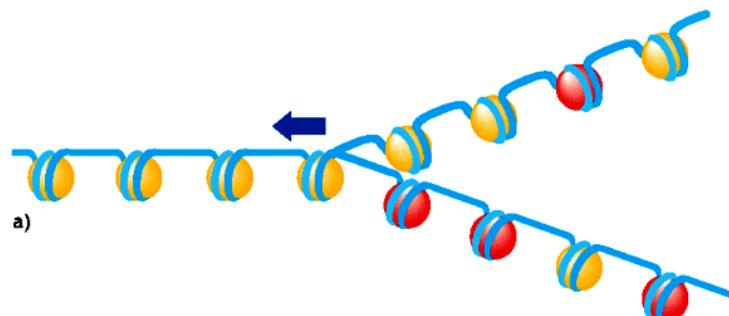


Figura 4.15 Sintesi di frammenti di Okazaki sulla lagging chain. La leading chain è sintetizzata in modo continuo dal PCNA e dalla polimerasi δ (omesso per semplicità della figura).

- RF-C replication factor C
- PCNA antigene nucleare
- proliferazione cellulare
- Fen1
- RNAasi H

Enzima / Complesso	Funzione principale
Primasi / Pol α	Sintesi del primer RNA + breve DNA iniziale
RF-C	Caricatore di PCNA (usa ATP)
PCNA	Clamp scorrevole: mantiene la polimerasi δ ancorata al DNA
Pol δ	Sintesi processiva del DNA
Fen-1 e RNasi H	Rimozione del primer di RNA
DNA ligasi I	Sigilla i frammenti di Okazaki

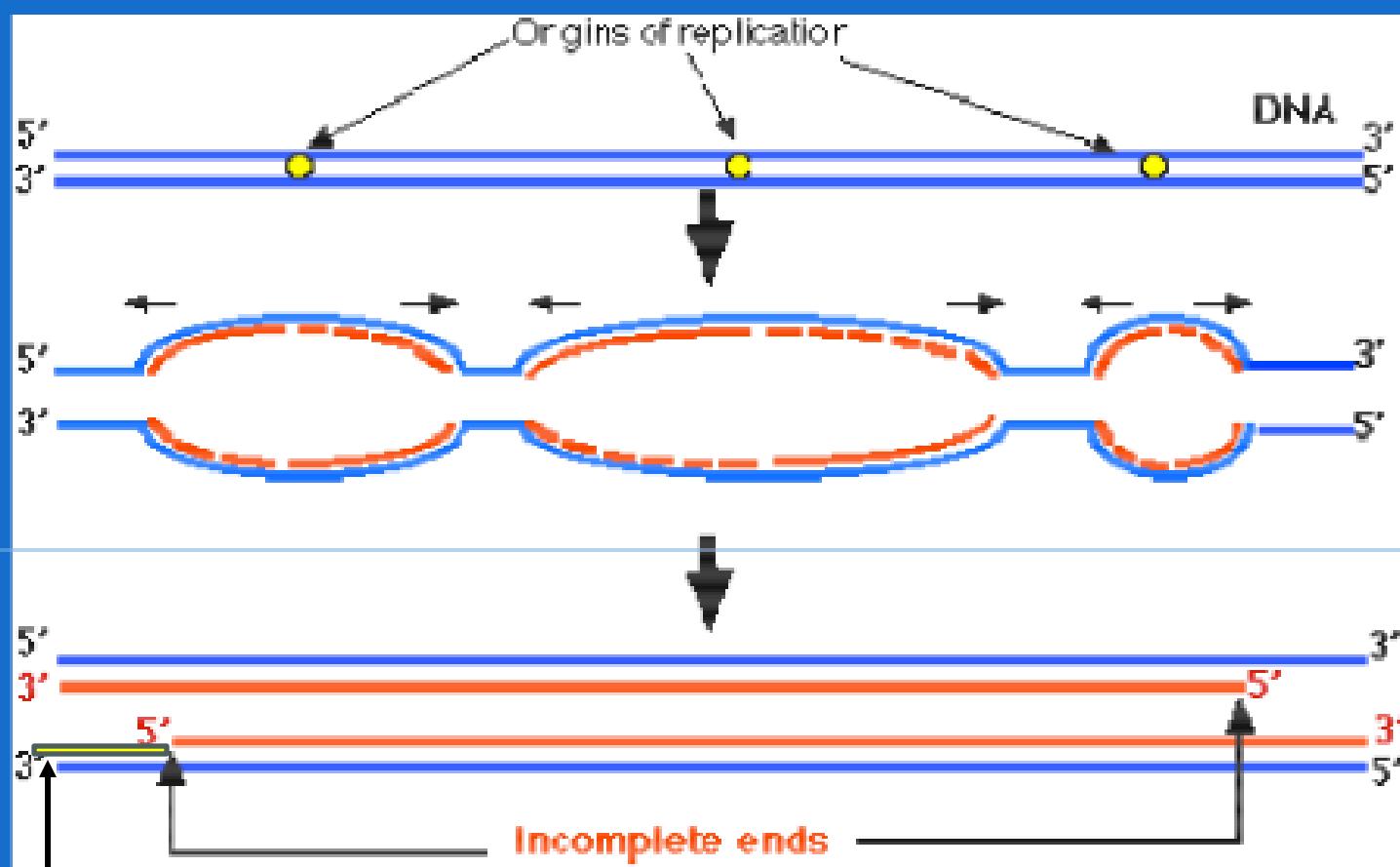
Negli eucarioti i nucleosomi si duplicano secondo una modalità conservativa degli ottameri



■ **Figura 4.16 Modalità di ripetizione dei nucleosomi.**
(a) Conservazione degli ottameri. **(b)** Conservazione di tetrameri. **(c)** Distribuzione casuale.



Accorciamento delle estremità nei cromosomi lineari



Primer (innesco) che viene rimosso

Accorciamento dei telomeri

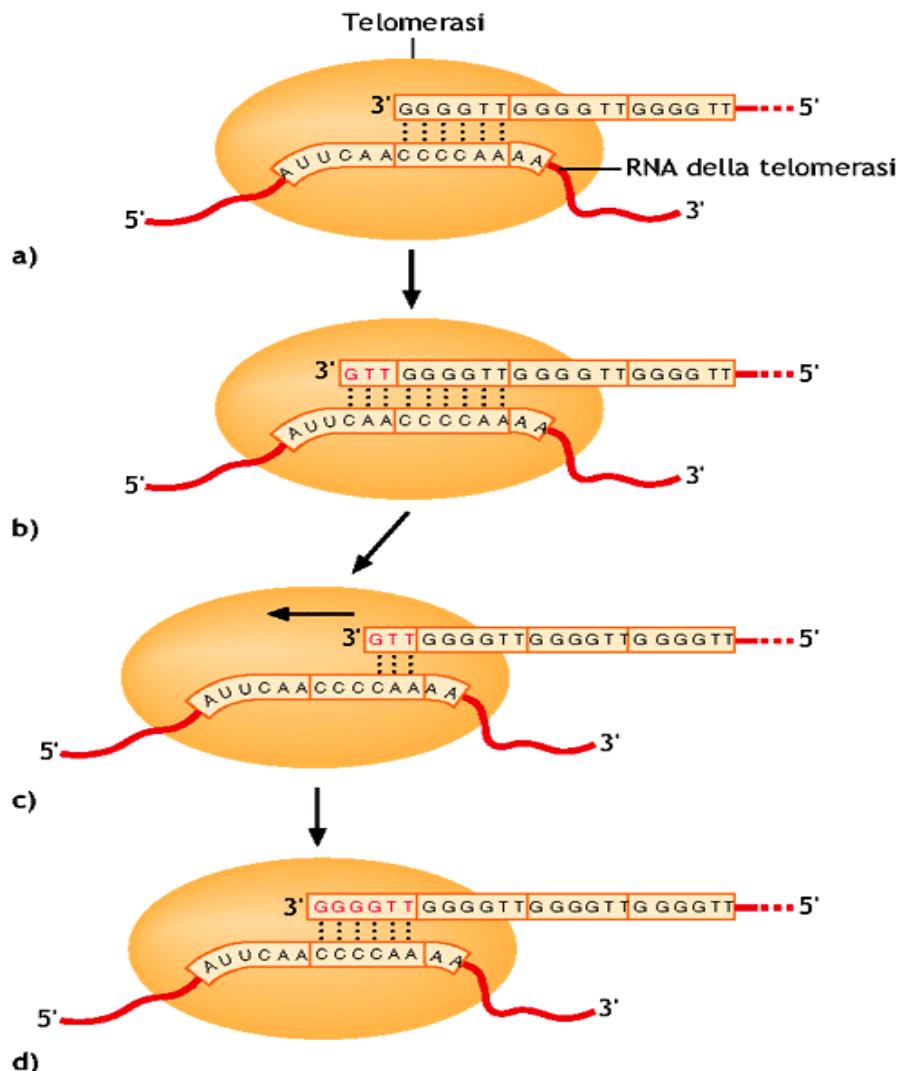
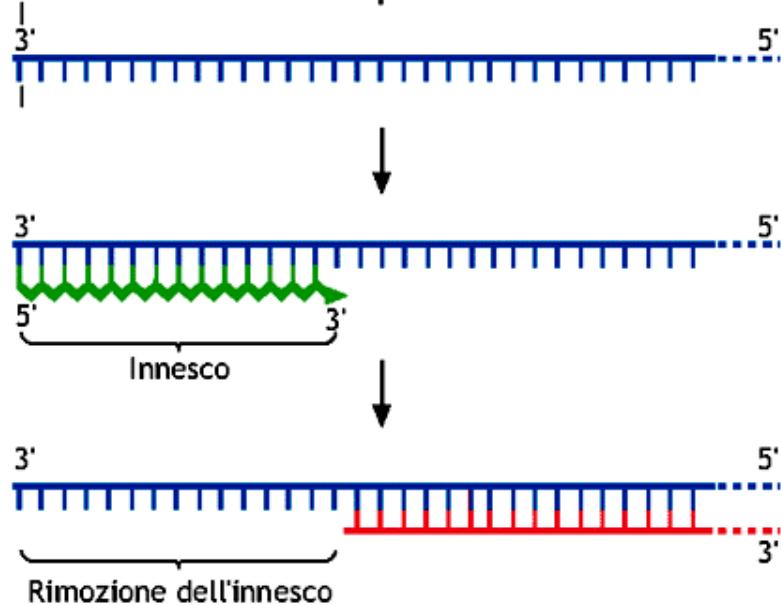


Telomero (unità di DNA ripetute in tandem del **minisatellite** AGGGTT). Lunghezza di diverse kb.

Replicazione del DNA negli eucarioti : telomerasi

■ Figura 4.17 Il problema della replicazione dei telomeri: dopo la rimozione dell'innesto chi riempie il "gap"?

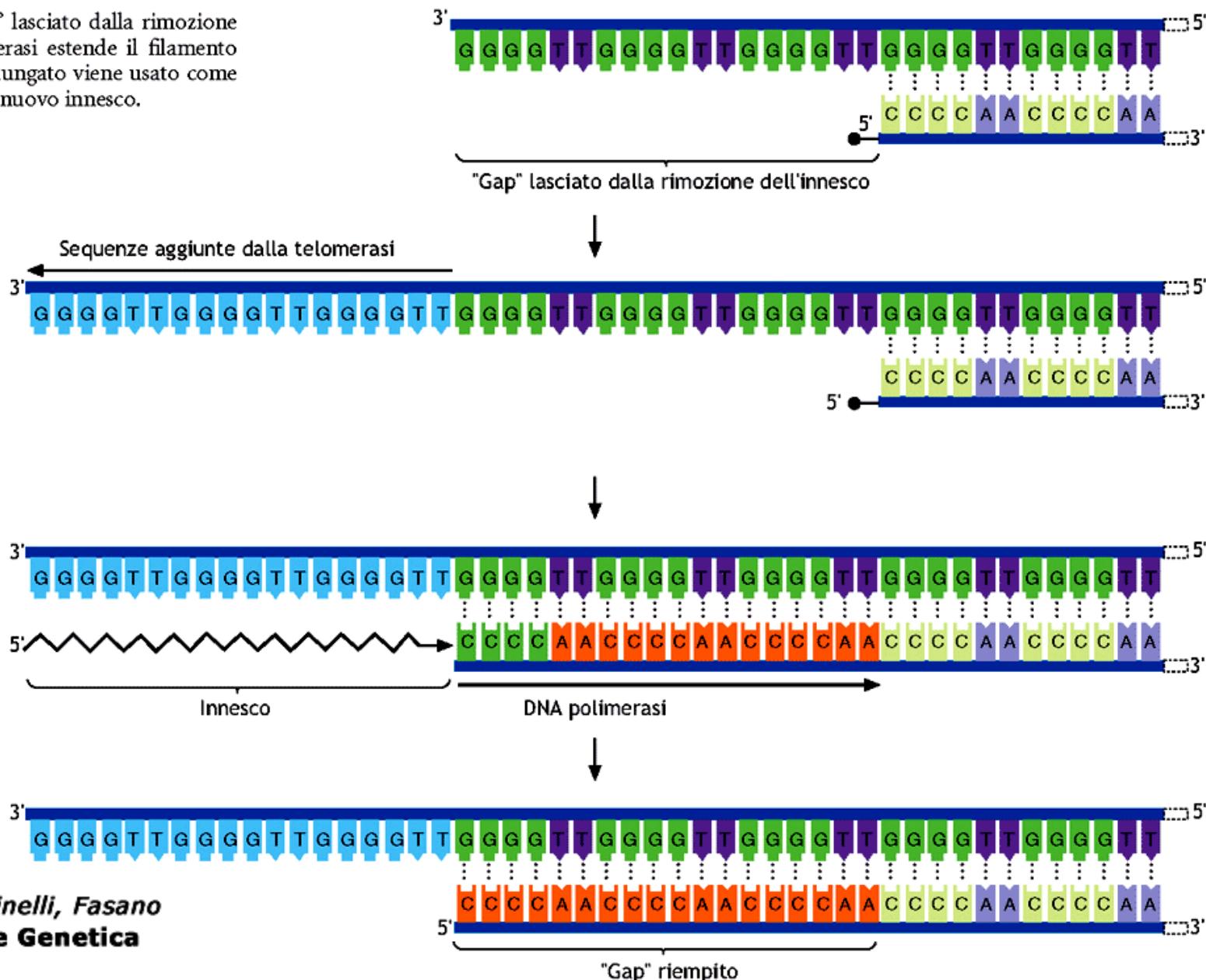
Estremità 3' usata come stampo



■ Figura 4.19 La componente TERC (RNA) della telomerasi serve da stampo per la sintesi del DNA telomerico. (a) RNA della telomerasi lega la sequenza telomerica e (b) vengono subiti aggiunti tre nucleotidi di DNA, TTG, usando come stampo la molecola di RNA. La telomerasi, poi, scivola verso la fine della sequenza telomerica (c) in modo che le sue triplettie AAC si appaiano con le triplettie TTG neosintetizzate. (d) Il ciclo di allungamento continua.

La telomerasi previene l'accorciamento dei telomeri

Figura 4.18 a) "Gap" lasciato dalla rimozione dell'innesto. b) La telomerasi estende il filamento stampo. c) Il filamento allungato viene usato come stampo. d) Rimozione del nuovo innesto.



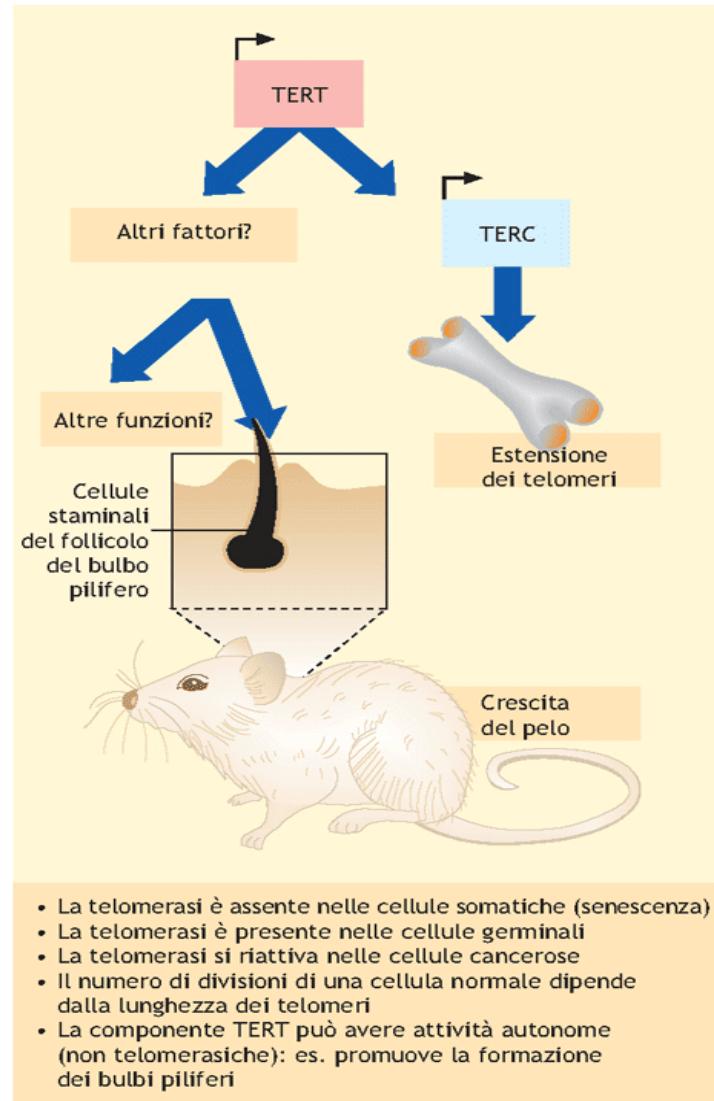


Figura 4.20 La telomerasi.

OPEN

Association between leucocyte telomere length and cardiovascular disease in a large general population in the United States

Cheng Xu^{1,3}, Zhiqi Wang^{1,3}, Xiaoqi Su^{1,3}, Min Da¹, Zhaocong Yang¹, Weiwei Duan^{2*} & Xuming Mo^{1*}

Leucocyte telomere length (LTL) has been reported to be linked to ageing, cancer and cardiovascular disease (CVD). This study aimed to explore the association between LTL and CVD risk in a nationally representative sample of U.S. adults. Complex associations, including nonlinearity and interaction, were also examined. A total of 7,378 subjects from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999–2002 were collected. Telomere length was detected from DNA samples and expressed as the mean T/S ratio (telomere repeats per single-copy gene). We performed multiple logistic regression models and interactive analysis to explore the associations between LTL and CVD risk by adjusting for potential confounders. We also performed a sensitivity analysis to investigate the robustness of our results. Among all participants, LTL was associated with the risk of CVD (OR = 0.79, 95% CI: 0.63–0.98, $P = 0.033$) in a linear manner rather than in a nonlinear manner ($P = 0.874$). Interaction effects of LTL with both education ($P = 0.017$) and hypertension ($P = 0.007$) were observed. Furthermore, using subgroup analyses, protective effects of LTL on CVD risk were found in females and in individuals who were college graduates or above, had serum cotinine >10 ng/ml, did not have hypertension, or had normal white blood cell levels. LTL is linearly inversely associated with CVD risk in the general population of the United States.

Telomeres are repetitive sequences of nucleotides at the ends of chromosomes that play a role in the maintenance of genetic integrity. Telomeres are involved in many physiological processes¹ such as cell senescence² and endometrial regeneration³. Leucocyte telomere length (LTL) is the longest at birth and decreases with age⁴. Moreover, the shortening of LTL affects the progression of diseases, including ageing^{5,6}, immune dysfunction⁷, post-traumatic stress disorder⁸, diabetes⁹, cardiovascular disease (CVD)¹⁰, and cancer^{5,11}.

CVD refers to heart and blood vessel abnormalities and is one of the most common causes of noncommunicable disease mortality¹², accounting for approximately 17.5 million deaths worldwide¹³. The United States has the