

# ***Replicazione del DNA***

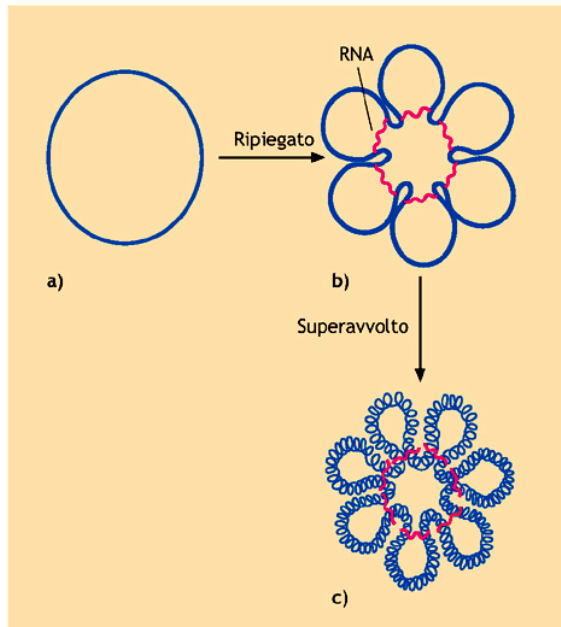
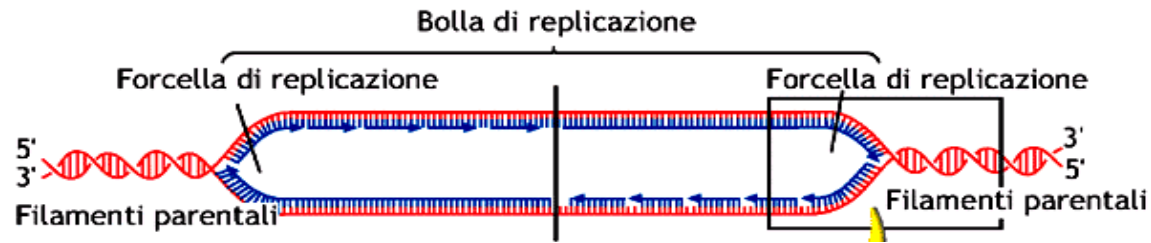


# **Enzimi coinvolti della duplicazione del DNA (procarioti)**

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

# Replicazione del DNA: procarioti

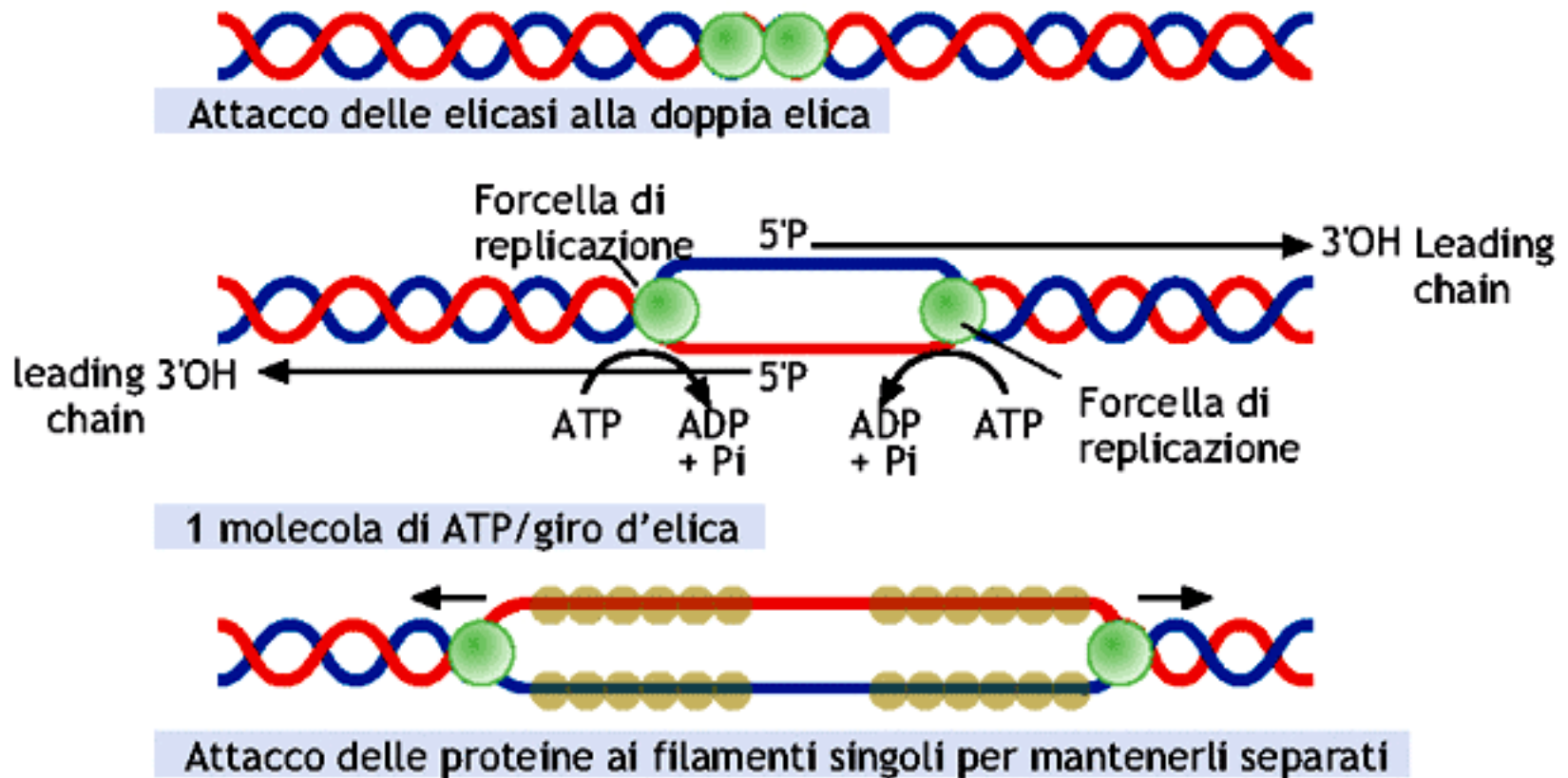
L'inizio della replicazione avviene in una regione chiamata **oriC** riconosciuta dalla proteina **DnaA**. L'interazione richiama l'**elicasi** in un sito adiacente ricco di AT: apertura della doppia elica.



## 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 a proteine di tipo istonico, HLP, a formare una fibra di 12 nm di spessore.

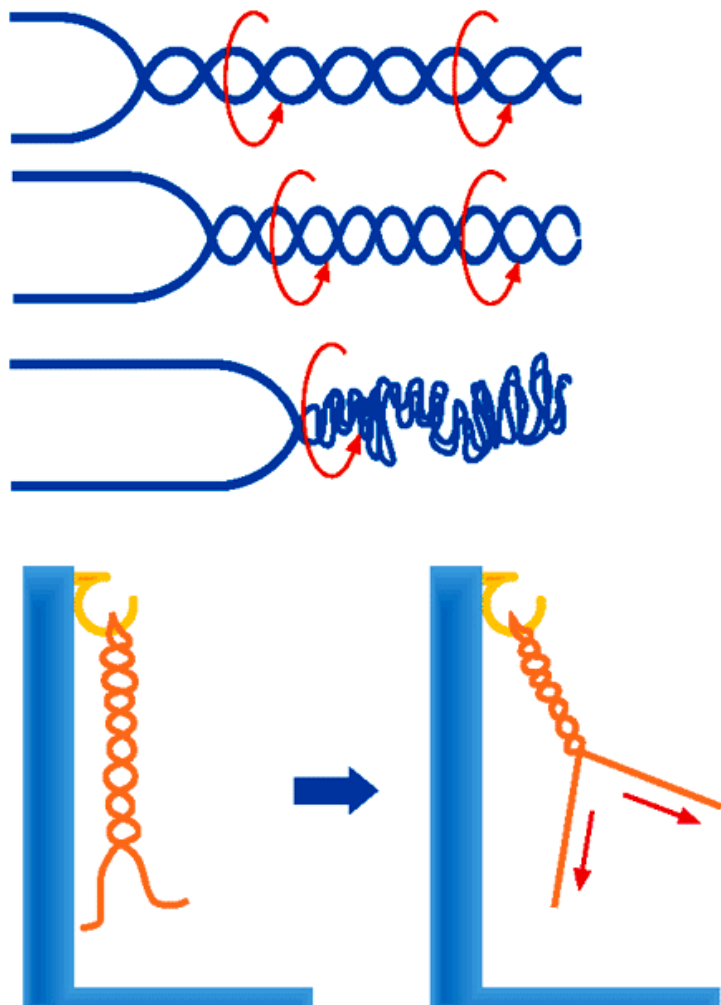
## Enzimi nella replicazione del DNA: elicasi



- 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

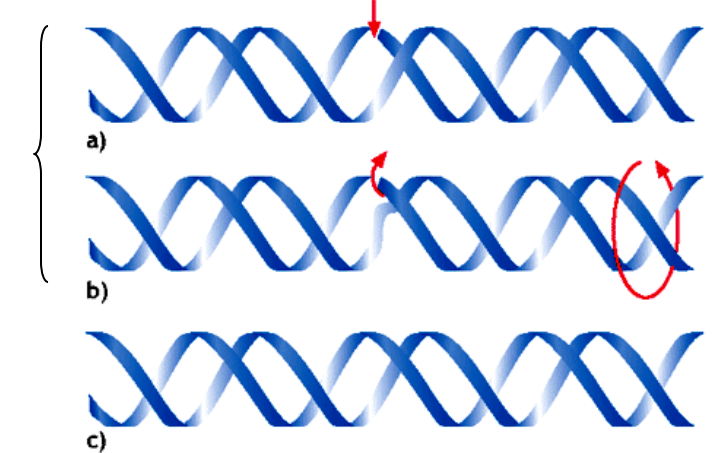
**Figura 4.5** Apertura della doppia elica e mantenimento dei filamenti separati nella formazione della bolla di replicazione.

# Replicazione del DNA: topoisomerasi

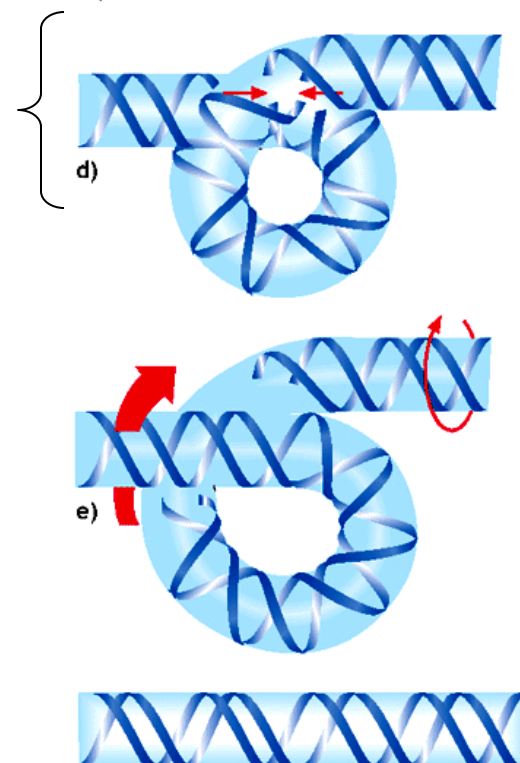


**Figura 4.6** Il procedere della forcella di replicazione provoca un movimento di torsione della molecola del DNA e quindi il suo superavvolgimento come quando si vuole svolgere una corda a due capi con una delle estremità attaccata ad un uncino.

I



II



f)

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



The diagram illustrates the mechanism of DNA polymerase. It shows a DNA double helix with a template strand (3' to 5') and a complementary strand (5' to 3'). A dNTP (dGTP) is shown entering the active site. The bottom part shows the incorporation of the dNTP into the growing strand, forming a phosphodiester bond and releasing a pyrophosphate (PPi).

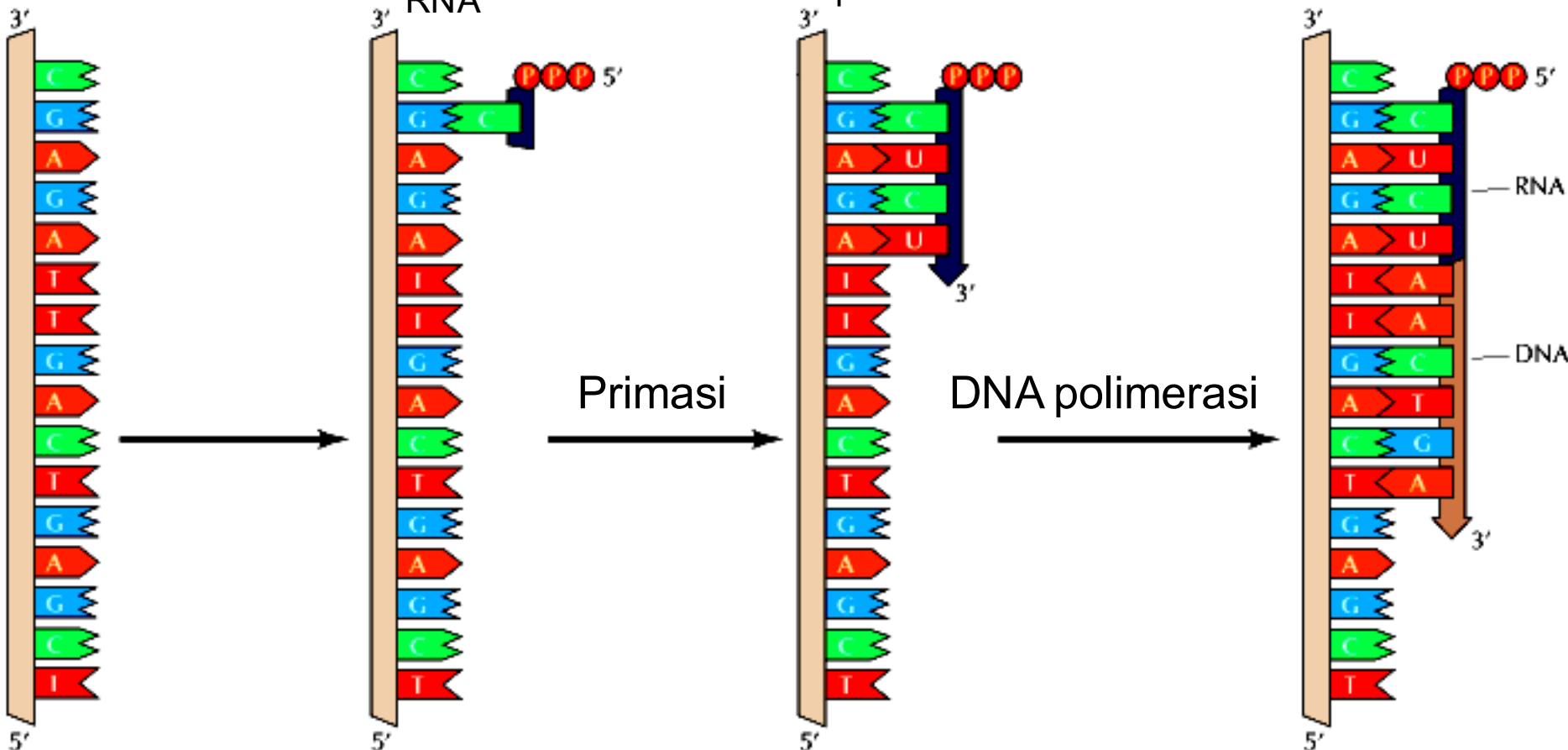
Idrolisi del pirofosfato

- 1. sintetizzano DNA soltanto in direzione 5'-3', aggiungendo dNTP al gruppo 3' ossidrilico 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)

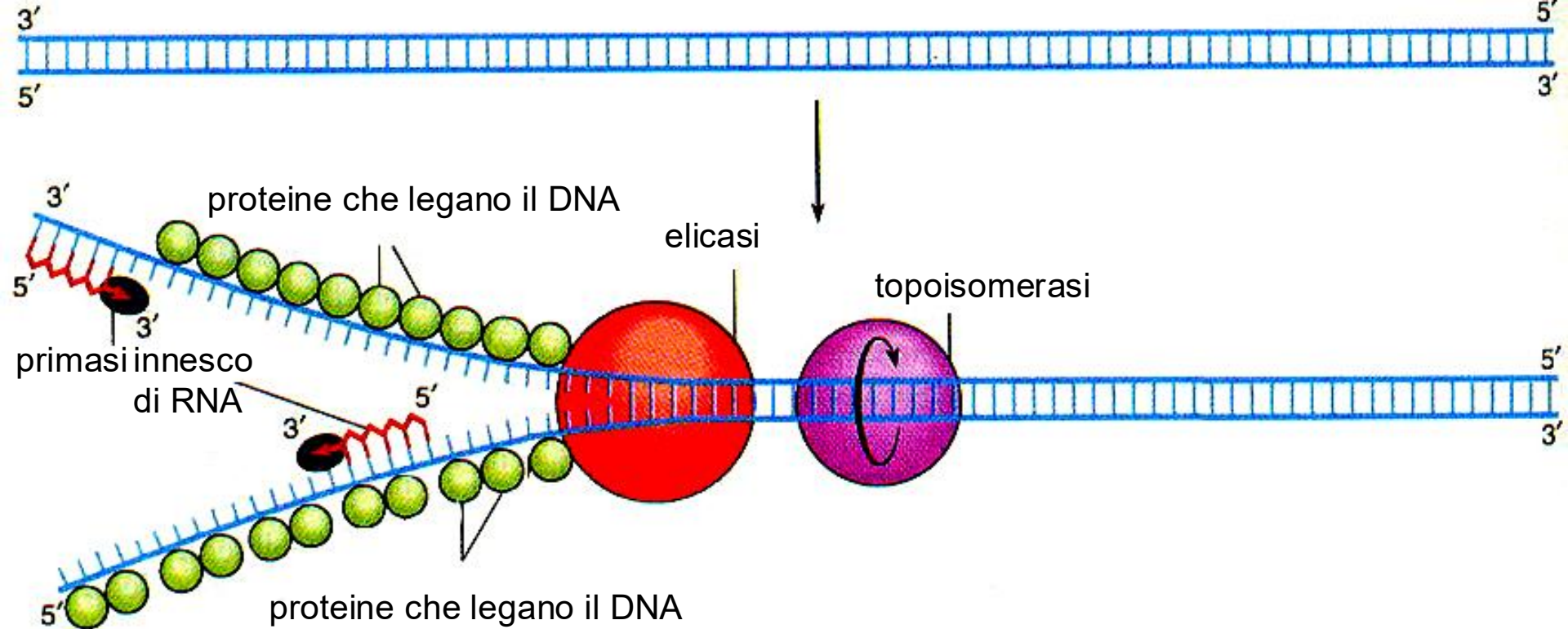
Quando il DNA si srotola, la DNA primasi sintetizza **un breve innesco di RNA** composto da circa 5-10 nucleotidi

Stampo di DNA

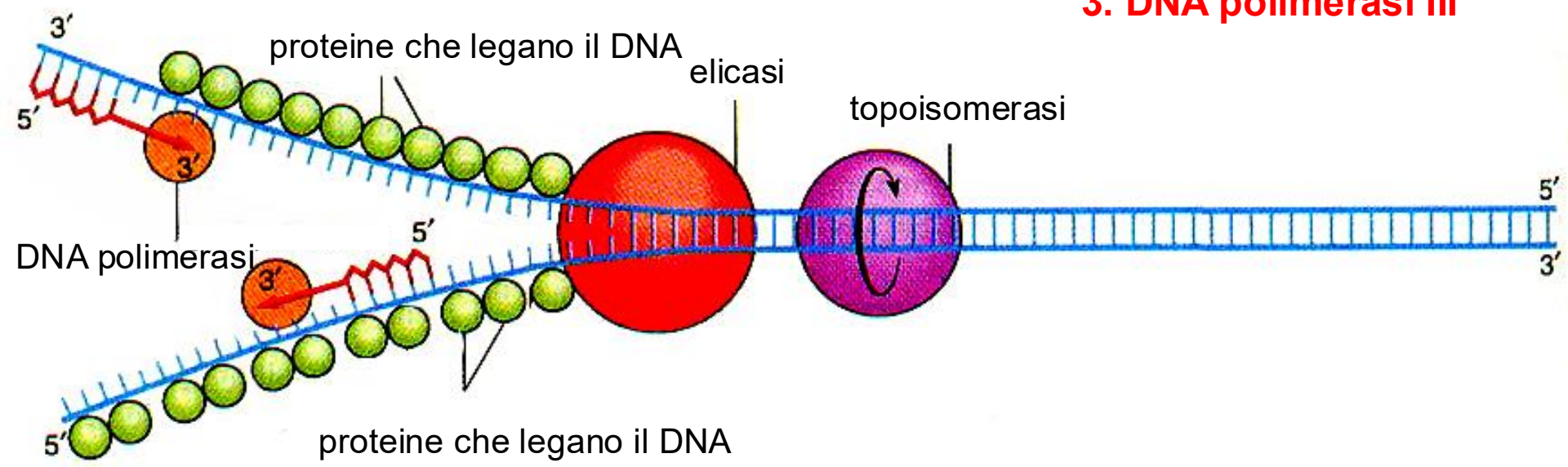


**Sintesi del primer**





### 3. DNA polimerasi III

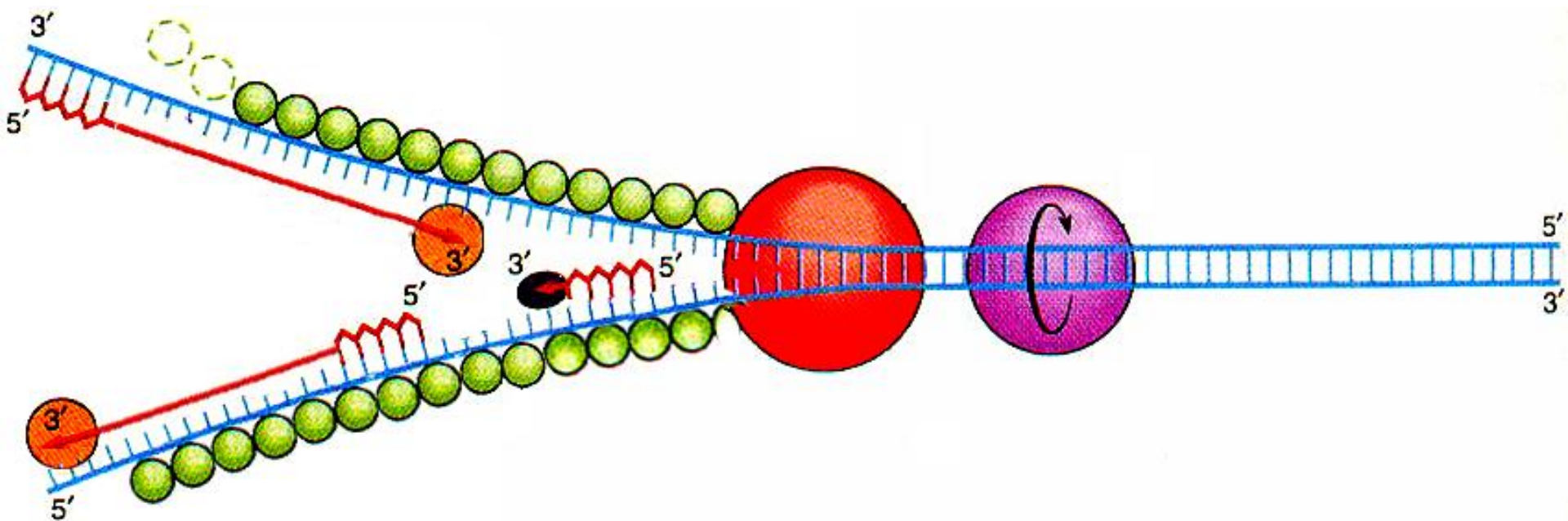
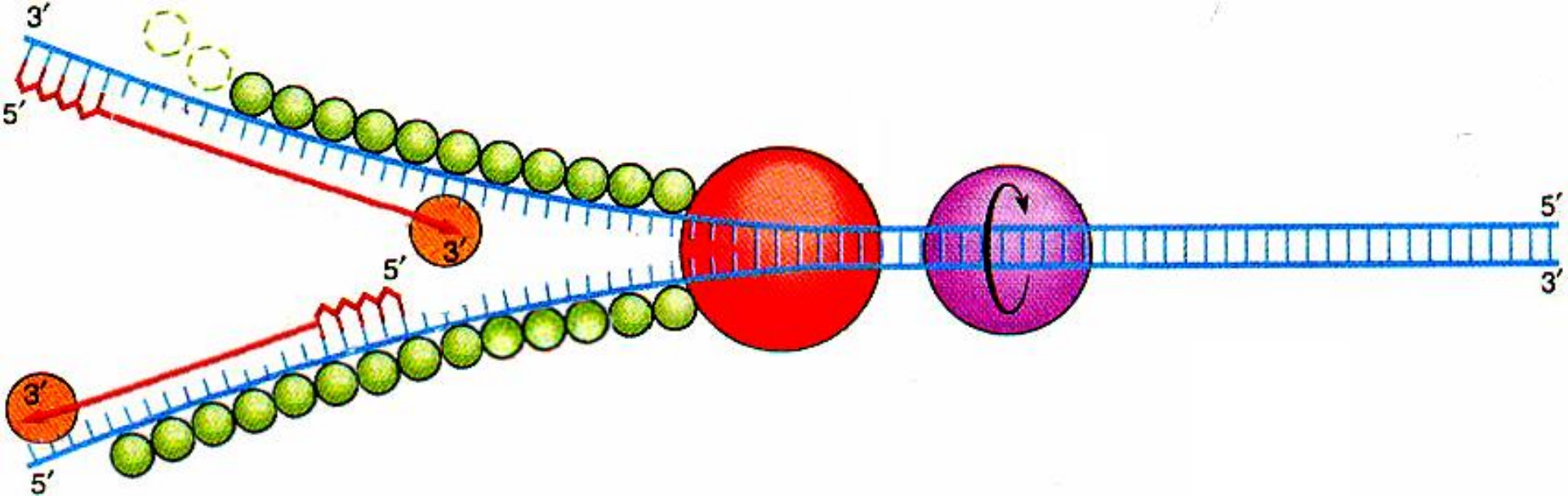




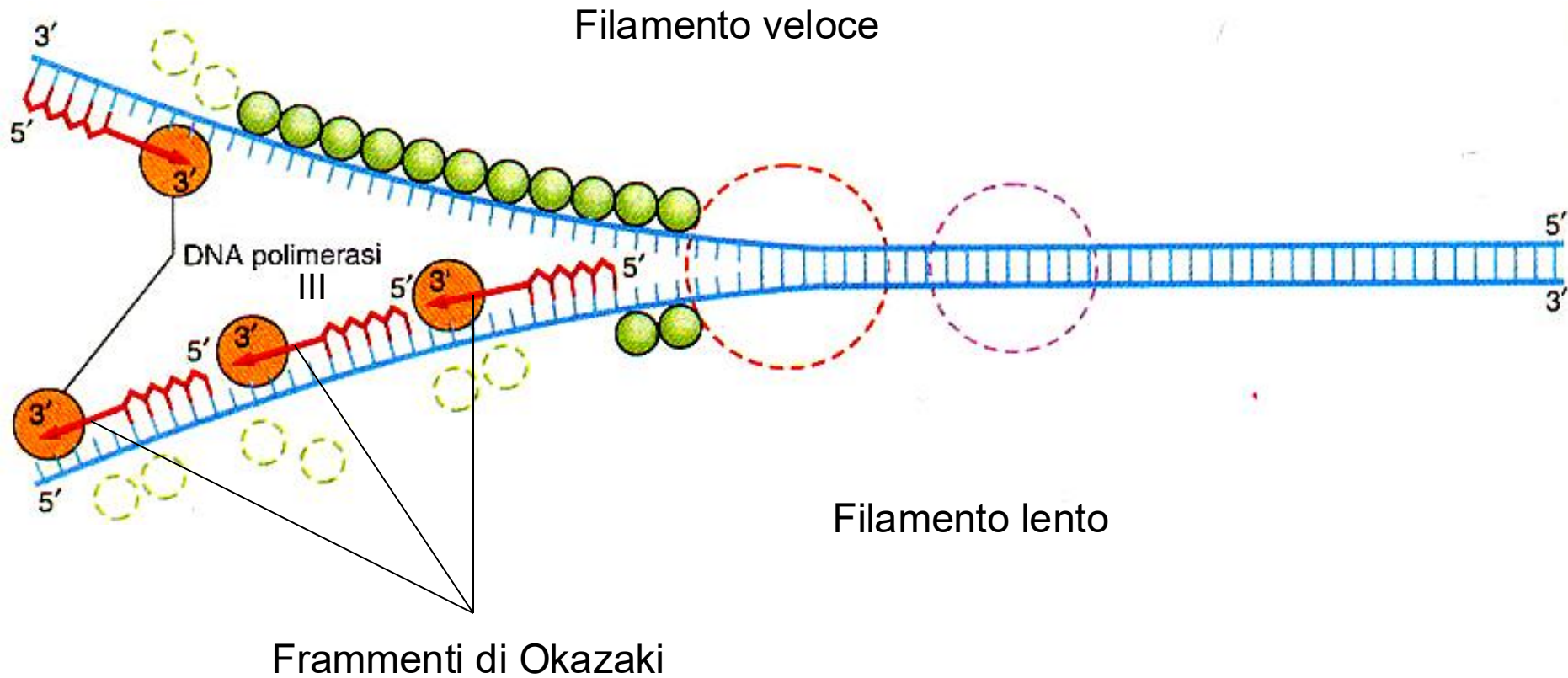
# Replicazione del DNA- enzima DNA polimerasi

## DNA Polimerasi procariotiche ed eucariotiche

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

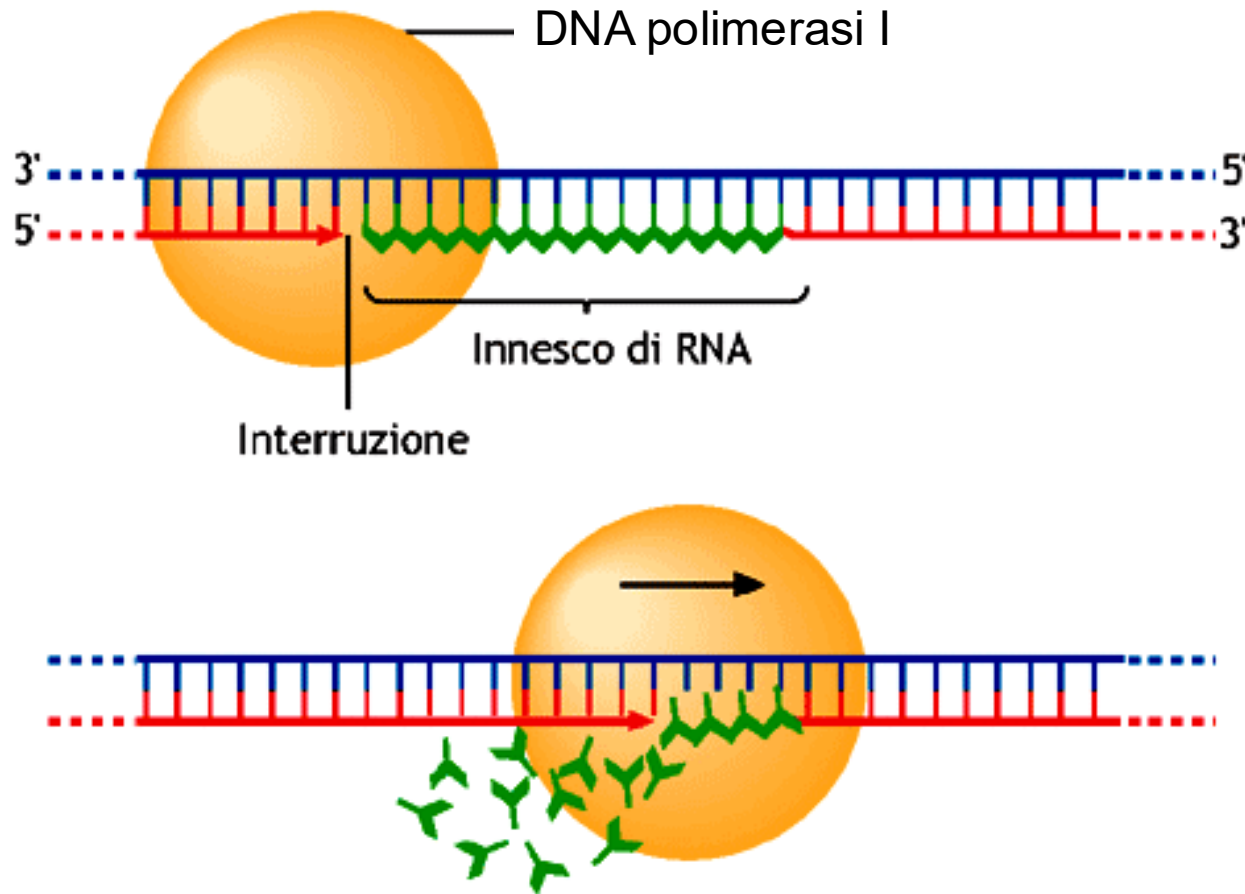


# Frammenti di Okazaki



# DNA polimerasi I: rimozione del primer

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

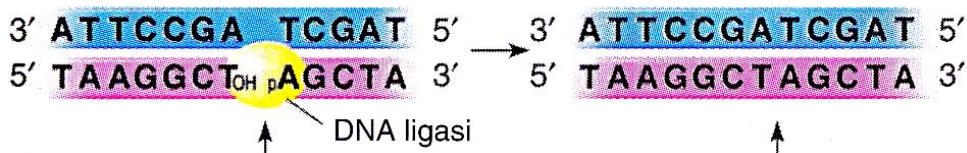


**Figura 4.9** Innesco di RNA per l'inizio della replicazione del DNA. L'innesco sarà rimosso dall'attività esonucleasica della DNA polimerasi I. La ligasi, infine, salderà i frammenti.

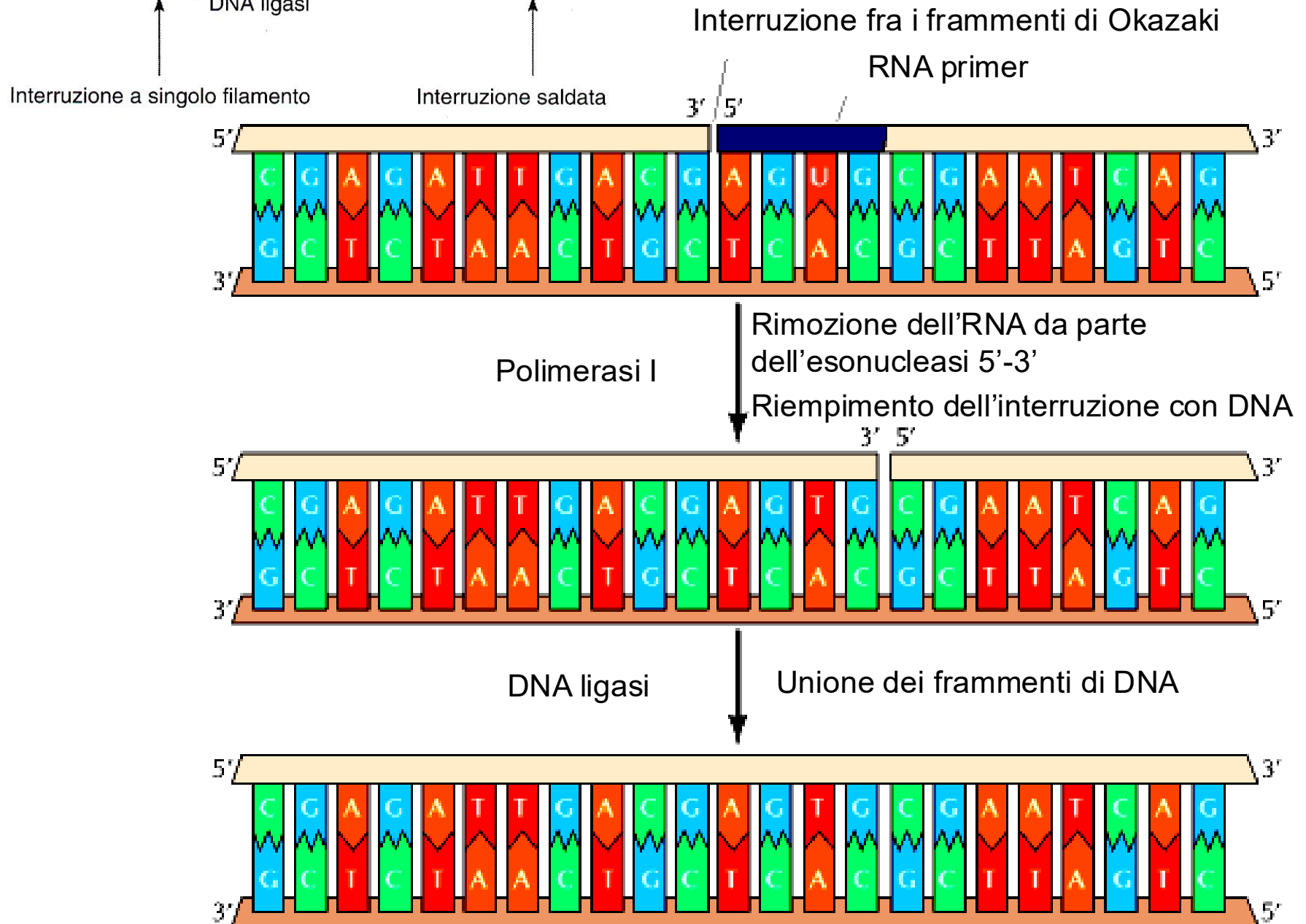
# Replicazione del DNA- enzima DNA polimerasi

## DNA Polimerasi procariotiche ed eucariotiche

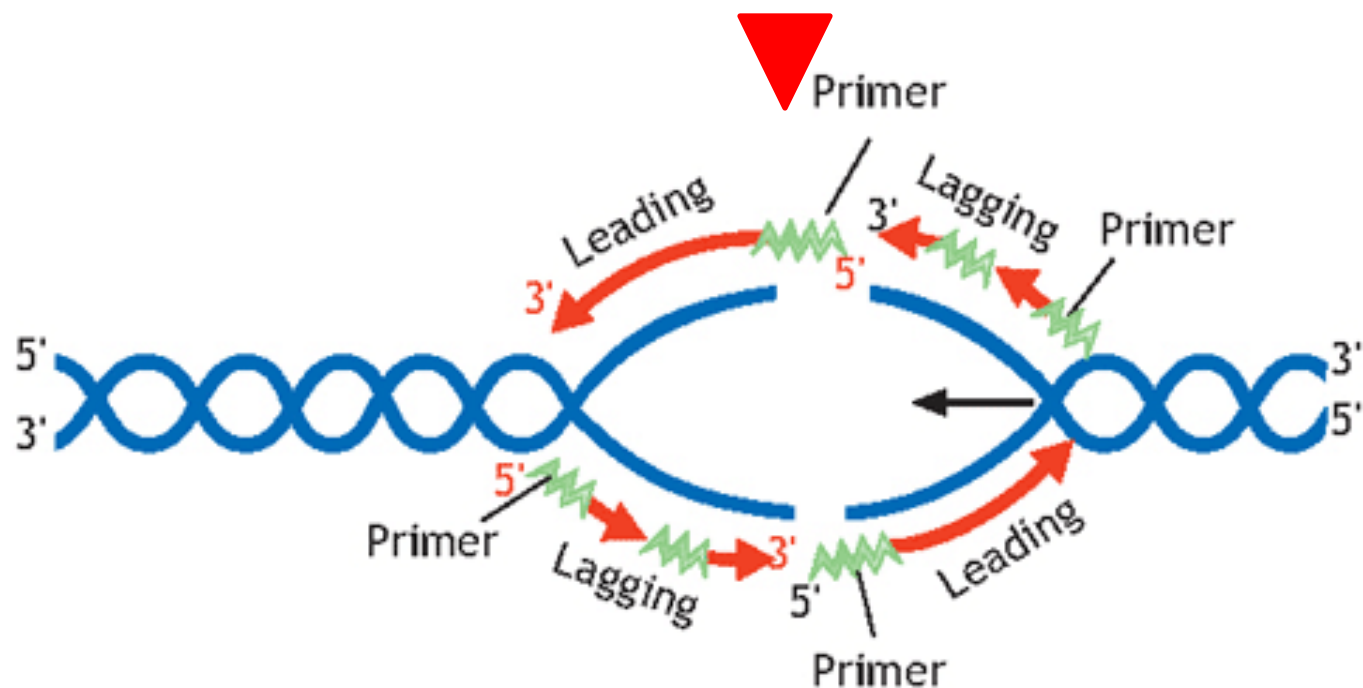
Enzimi	Direzione della sintesi	Attività esonucleasica	Funzioni possibili
<b>Procarioti</b>			
<b>Polimerasi I</b>	<b>5' → 3'</b>	<b>5' → 3'</b> <b>3' → 5'</b>	<b>riempimento dei "gap" lasciati dalla rimozione dell'innesco;</b> <b>riparazione del DNA</b>
<i>Polimerasi II</i>	<i>5' → 3'</i>	<i>5' → 3'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



## Unione dei frammenti: DNA ligasi





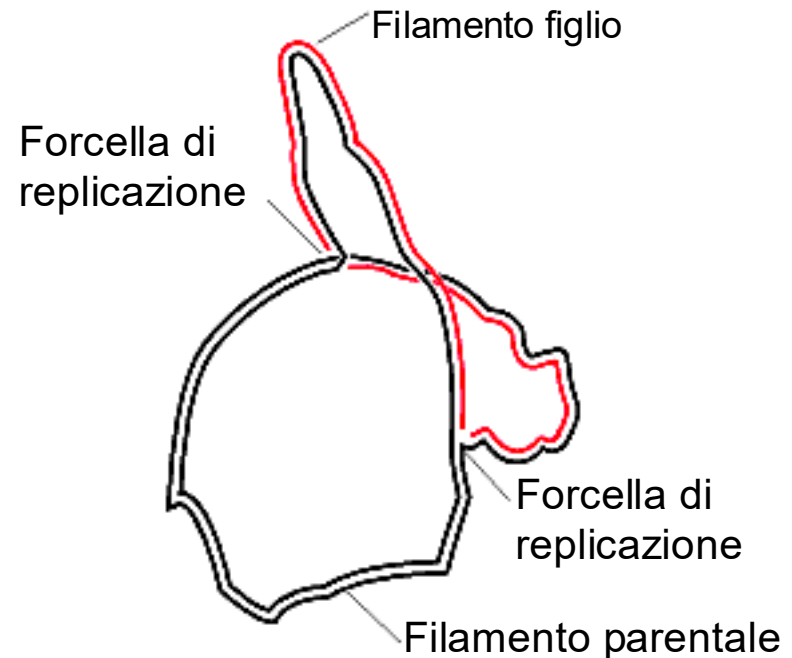


■ **Figura 4.11** Durante la replicazione ogni catena leading è “inseguita” da una catena lagging.

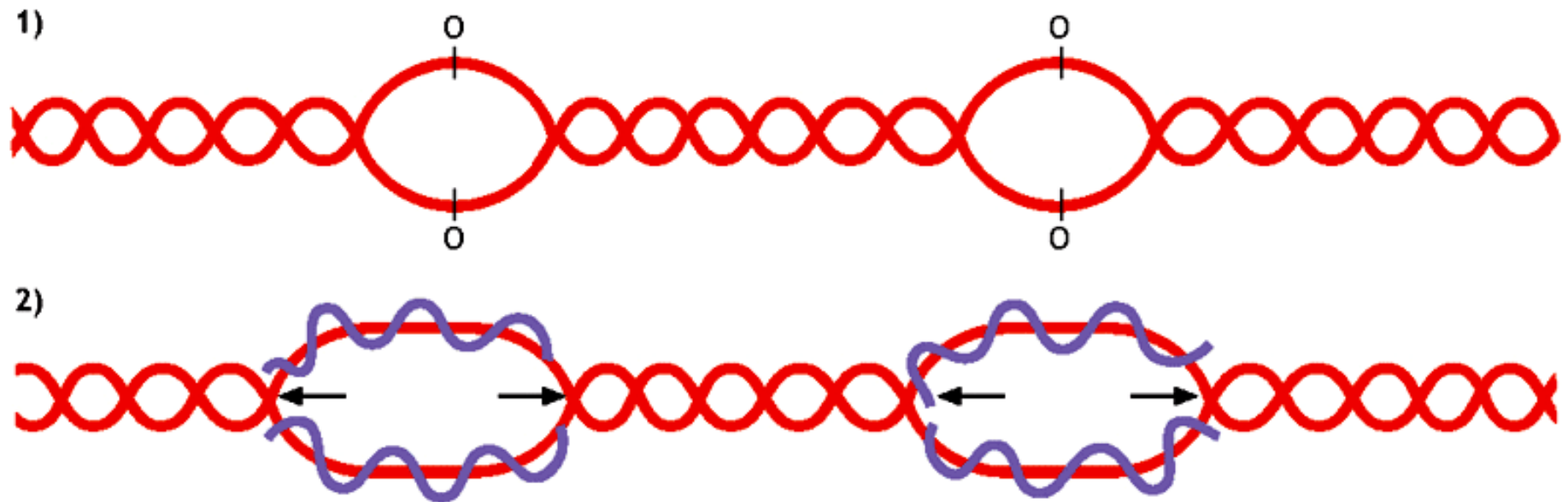
## La replicazione del DNA nei procarioti avviene velocemente (1000 nt al secondo rende possibile la divisione ogni in 30 min)

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.



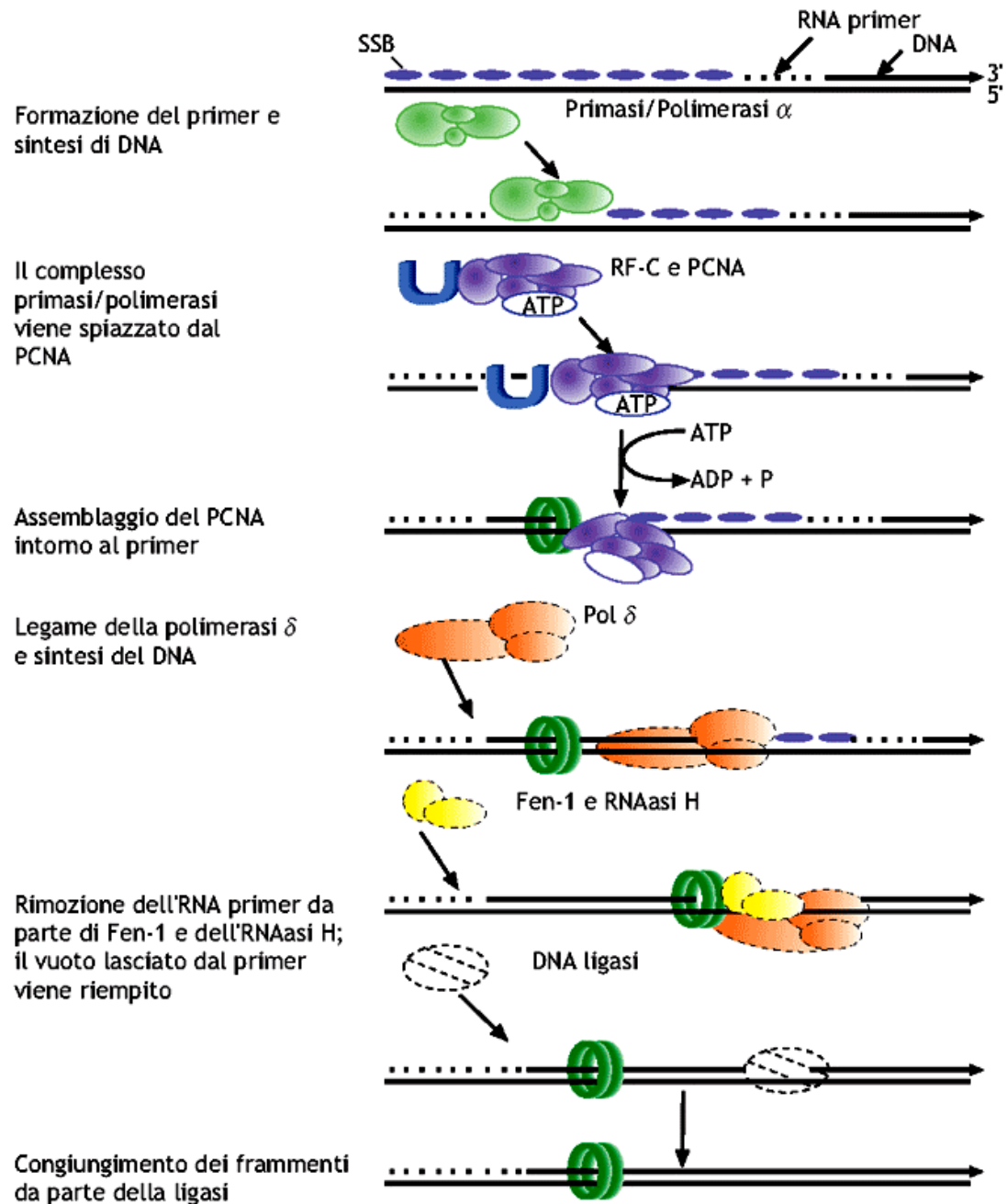
## Molteplici forcelle di replicazione negli eucarioti



**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

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



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

Enzima / Complesso

**Primasi / Pol  $\alpha$**

**RF-C**

**PCNA**

**Pol  $\delta$**

**Fen-1 e RNasi H**

**DNA ligasi I**

Funzione principale

Sintesi del primer RNA + breve DNA iniziale

Caricatore di PCNA (usa ATP)

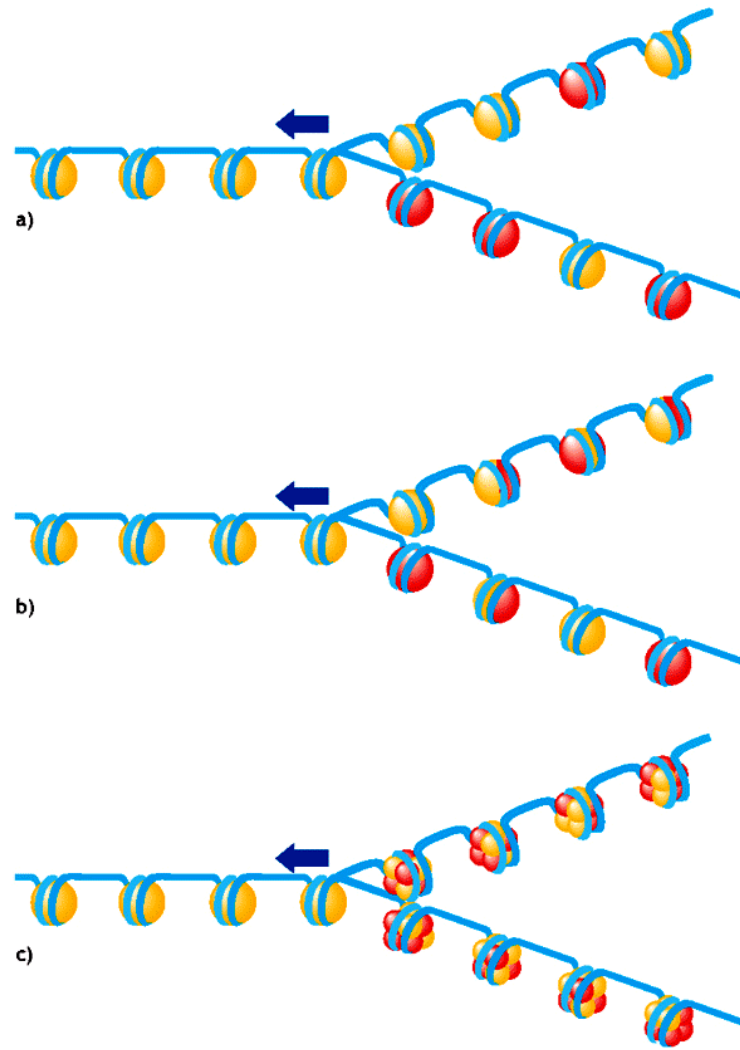
Clamp scorrevole: mantiene la polimerasi  $\delta$  ancorata al DNA

Sintesi processiva del DNA

Rimozione del primer di RNA

Sigilla i frammenti di Okazaki

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

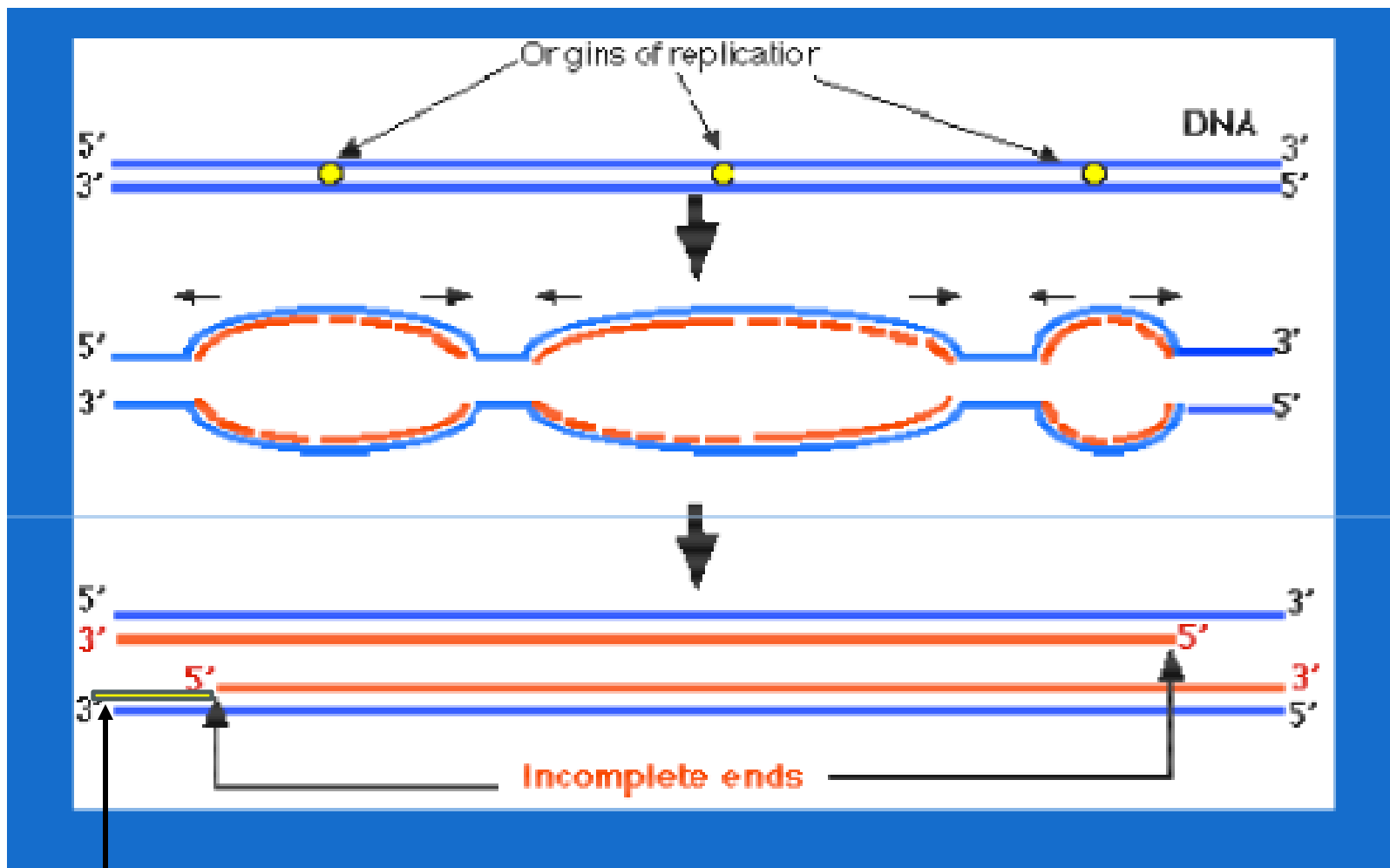


**Figura 4.16** Modalità di ripetizione dei nucleosomi.  
(a) Conservazione degli ottameri. (b) Conservazione di tetrameri. (c) Distribuzione casuale.



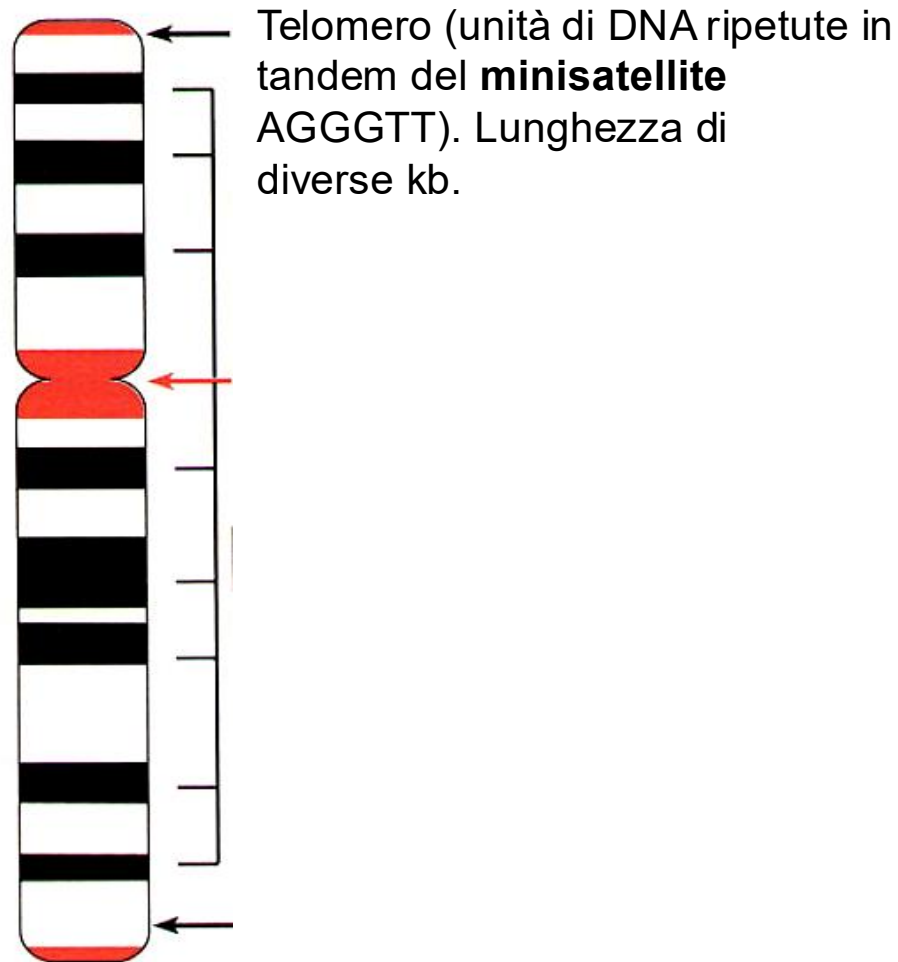


## Accorciamento delle estremità nei cromosomi lineari



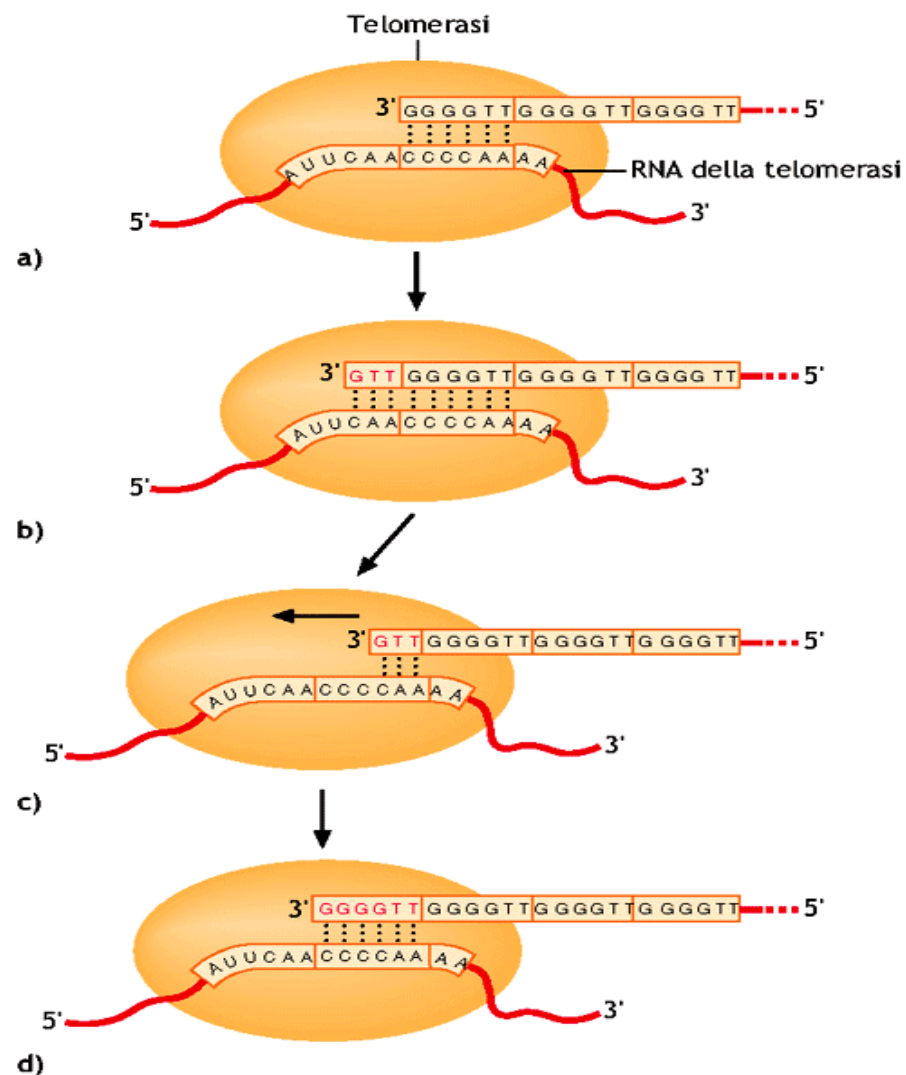
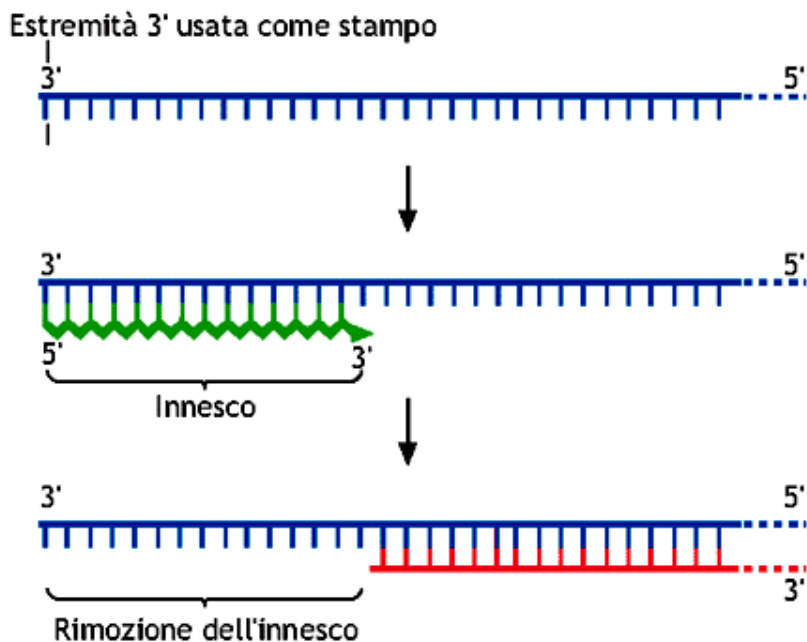
Primer (innescò) che viene rimosso

## Accorciamento dei telomeri



# Replicazione del DNA negli eucarioti : telomerasi

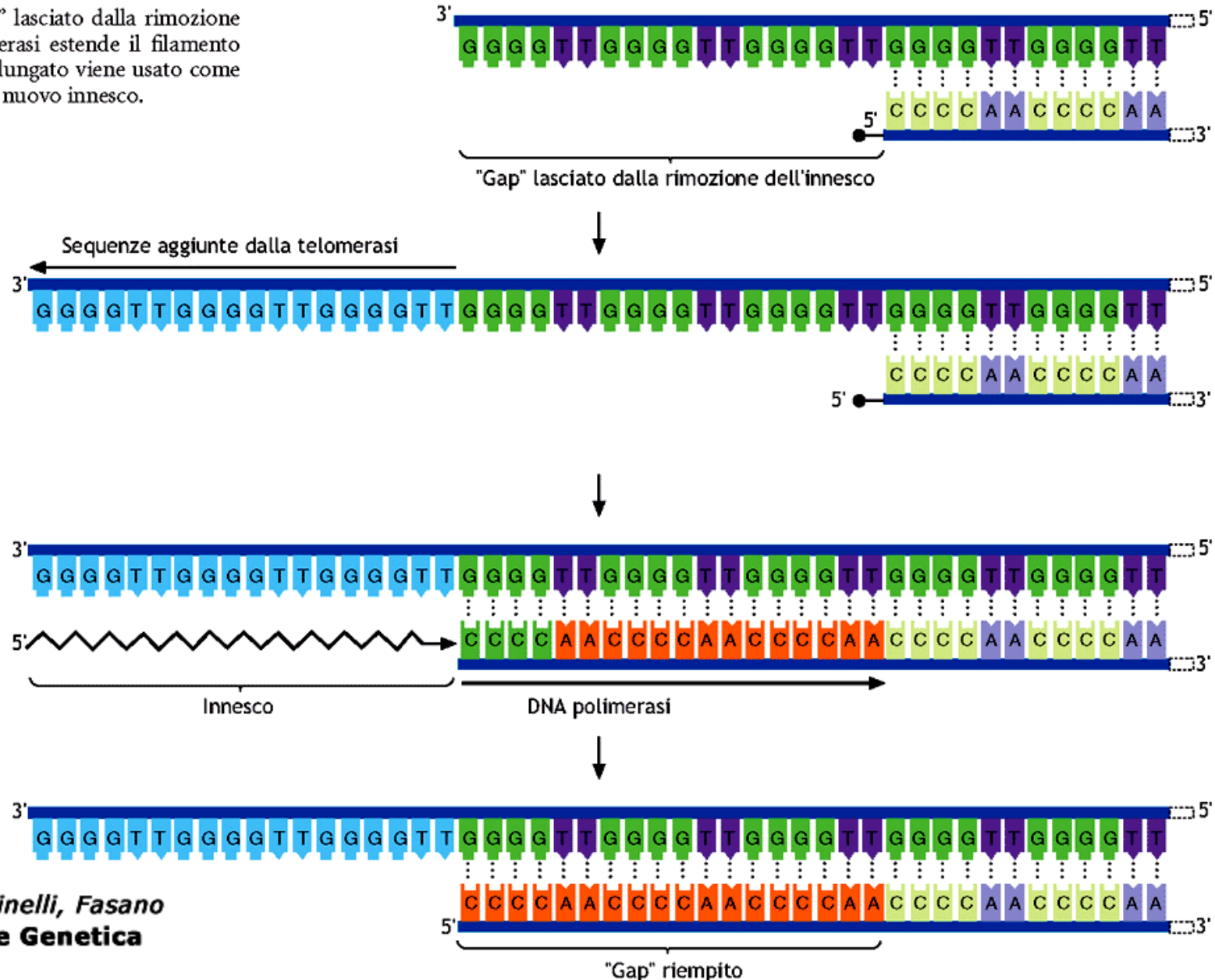
**Figura 4.17** Il problema della replicazione dei telomeri: dopo la rimozione dell'innesco chi riempie il "gap"?



**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 subito 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 triplette AAC si appaiano con le triplette TTG neosintetizzate. (d) Il ciclo di allungamento continua.

## La telomerasi previene l'accorciamento dei telomeri

**Figura 4.18** a) “Gap” lasciato dalla rimozione dell’innesco. b) La telomerasi estende il filamento stampo. c) Il filamento allungato viene usato come stampo. d) Rimozione del nuovo innesco.



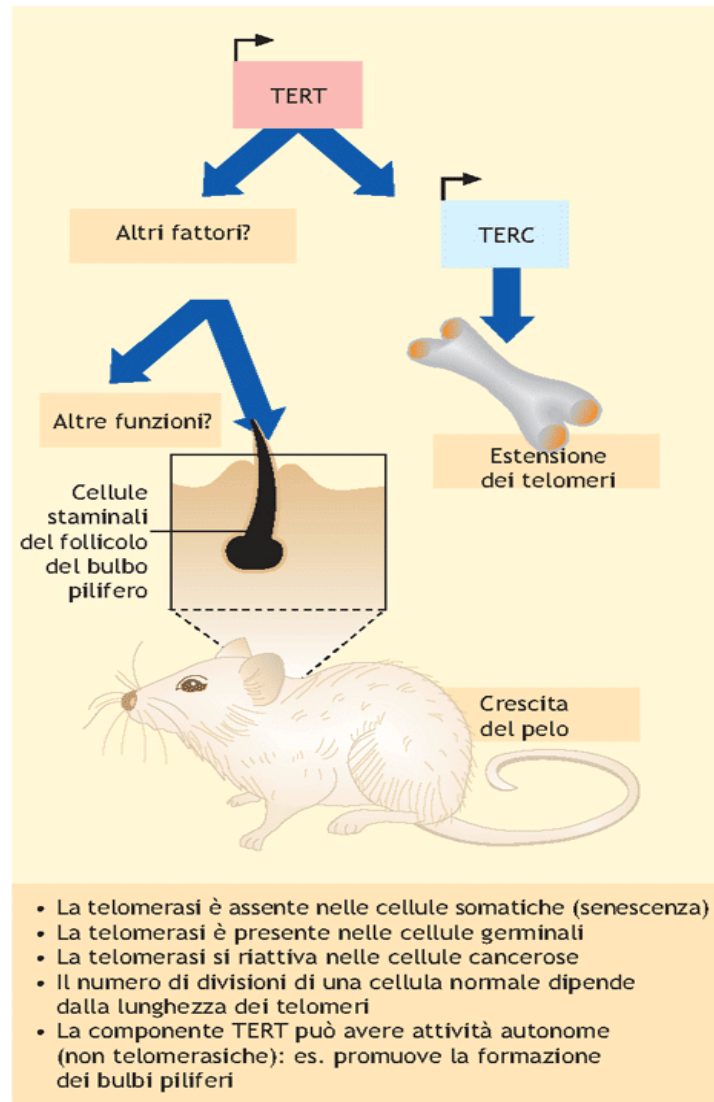


Figura 4.20 La telomerasi.

OPEN

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

Cheng Xu<sup>1,3</sup>, Zhiqi Wang<sup>1,3</sup>, Xiaoqi Su<sup>1,3</sup>, Min Da<sup>1</sup>, Zhaocong Yang<sup>1</sup>, Weiwei Duan<sup>2\*</sup> & Xuming Mo<sup>1\*</sup>

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 genic integrity. Telomeres are involved in many physiological processes<sup>1</sup> such as cell senescence<sup>2</sup> and endometrial regeneration<sup>3</sup>. Leucocyte telomere length (LTL) is the longest at birth and decreases with age<sup>4</sup>. Moreover, the shortening of LTL affects the progression of diseases, including ageing<sup>5,6</sup>, immune dysfunction<sup>7</sup>, post-traumatic stress disorder<sup>8</sup>, diabetes<sup>9</sup>, cardiovascular disease (CVD)<sup>10</sup>, and cancer<sup>11</sup>.

CVD refers to heart and blood vessel abnormalities and is one of the most common causes of noncommunicable disease mortality<sup>12</sup>, accounting for approximately 17.5 million deaths worldwide<sup>13</sup>. The United States has the