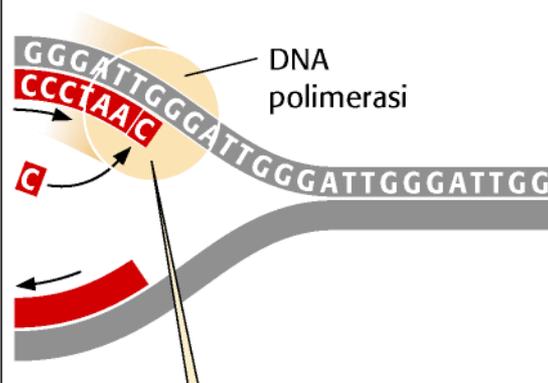


# LA FEDELTA' DELLA REPLICAZIONE DEL DNA

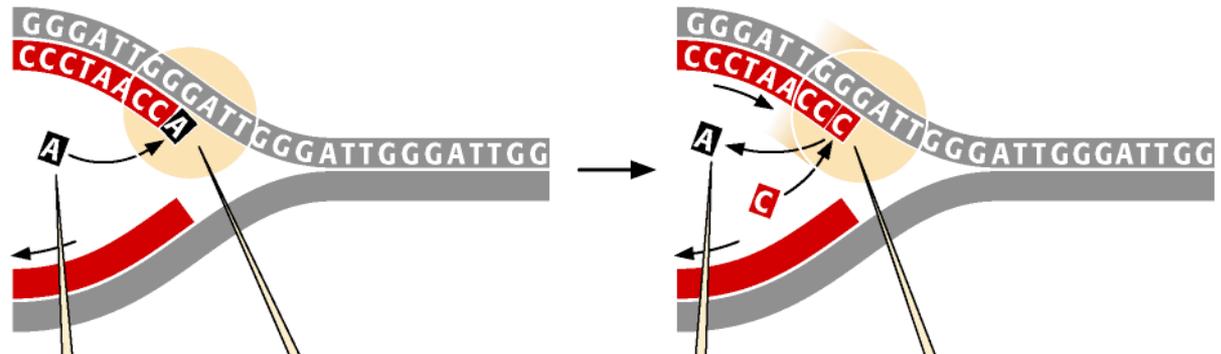
- selezione dei nucleotidi
- correzione di bozze
- riparazione dei malappaiamenti

## Selezione dei nucleotidi



Durante la replicazione del DNA la DNA polimerasi appaia nucleotidi con una elevata percentuale di accuratezza.

## Correzione di bozze del DNA



**1** Se viene aggiunta una base non corretta,...

**2** ...la DNA polimerasi si blocca e...

**3** ...rimuove la base non corretta,...

**4** ...sostituendola con una appropriata. La replicazione riprende.

## Riparazione dei malappaiamenti



Nuovo DNA

**5** A volte la correzione di bozze non ha successo e viene inserita una base non corretta nel DNA di nuova sintesi.

**6** Gli enzimi della riparazione dei malappaiamenti riconoscono la deformazione nella struttura secondaria causata dal malappaiamento della base...

**7** ...e sostituiscono la base malappaiata con una corretta.

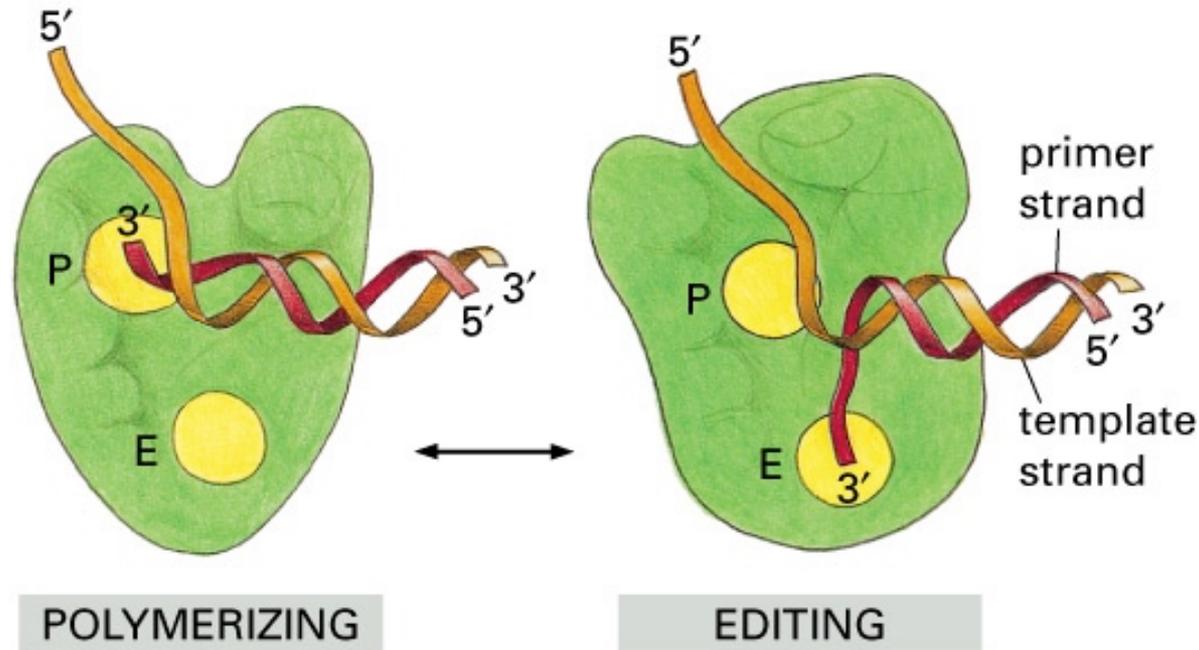
# E se vengono commessi degli errori di incorporazione di nucleotidi?

Vari meccanismi di '**proofreading**' intervengono a diversi livelli determinando l'elevata fedeltà di copiatura del DNA (1 errore ogni  $10^9$  nucleotidi copiati).

1. Dopo l'appaiamento del nuovo nt allo stampo, ma prima del legame covalente alla catena crescente
2. Dopo il legame covalente del nuovo nt alla catena crescente
3. Sul DNA già replicato

# 1-Selezione di nucleotidi

Prima di aggiungere un nuovo nucleotide, la DNA polimerasi controlla se quello precedente e' appaiato correttamente, altrimenti lo rimuove.



**Dopo** che un nucleotide e' entrato nel sito catalitico dell'enzima, ma **prima** che si crei il legame fosfodiesterico, la DNA Polimerasi va incontro ad un cambiamento di conformazione. Qualora il nucleotide non si appai in maniera corretta al filamento stampo, un cambio conformazionale ne determina il distacco dall'enzima.

# E se vengono commessi degli errori di incorporazione di nucleotidi?

Vari meccanismi di '**proofreading**' intervengono a vari livelli determinando l'elevata fedeltà di copiatura del DNA (1 errore ogni  $10^9$  nucleotidi copiati).

1. Dopo l'appaiamento del nuovo nt allo stampo, ma prima del legame covalente alla catena crescente
2. Dopo il legame covalente del nuovo nt alla catena crescente
3. Sul DNA già replicato

## 2- L'attivit  proof-reading

La DNA polimerasi possiede due attivita' enzimatiche distinte, espletate da due domini diversi:

- attivita' polimerasica in direzione 5' -3'
- attivita' esonucleasica in direzione 3' -5'

Quando la polimerasi rileva un errore di appaiamento tra le basi, dopo che il legame PDE e' stato creato, il complesso stampo-innesco si avvicina al dominio con attivita' esonucleasica, dove viene eliminato il nucleotide errato, permettendo alla polimerasi di riprendere velocemente la sintesi, senza provocare la dissociazione dell'intero complesso.

Questa attivita' *proof reading* riduce la frequenza di errore a uno ogni  $10^7$  nucleotidi

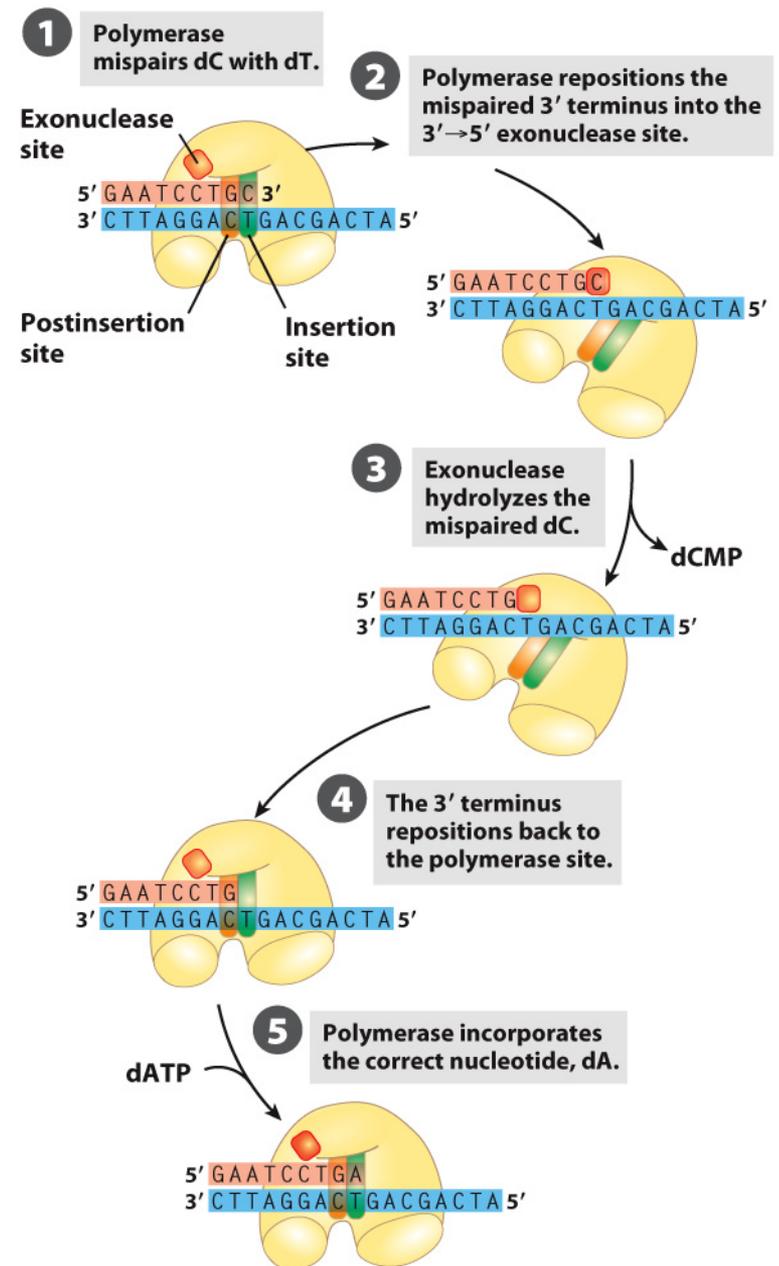


Figure 25-7

Lehninger Principles of Biochemistry, Seventh Edition  
© 2017 W. H. Freeman and Company

# E se vengono commessi degli errori di incorporazione di nucleotidi?

Vari meccanismi di '**proofreading**' intervengono a vari livelli determinando l'elevata fedeltà di copiatura del DNA (1 errore ogni  $10^9$  nucleotidi copiati).

1. Dopo l'appaiamento del nuovo nt allo stampo, ma prima del legame covalente alla catena crescente
2. Dopo il legame covalente del nuovo nt alla catena crescente
3. Sul DNA già replicato

**TABLE 25-5**

**Types of DNA Repair Systems in *E. coli***

Enzymes/proteins	Type of damage
<p><b>Mismatch repair</b>                      Dam methylase                      MutH, MutL, MutS proteins                      DNA helicase II                      SSB                      DNA polymerase III                      Exonuclease I                      Exonuclease VII                      RecJ nuclease                      Exonuclease X                      DNA ligase</p>	<p>Mismatches</p>
<p><b>Base-excision repair</b>                      DNA glycosylases                      AP endonucleases                      DNA polymerase I                      DNA ligase</p>	<p>Abnormal bases (uracil, hypoxanthine, xanthine); alkylated bases; in some other organisms, pyrimidine dimers</p>
<p><b>Nucleotide-excision repair</b>                      ABC excinuclease                      DNA polymerase I                      DNA ligase</p>	<p>DNA lesions that cause large structural change (e.g., pyrimidine dimers)</p>
<p><b>Direct repair</b>                      DNA photolyases</p>	<p>Pyrimidine dimers</p>
<p><i>O</i><sup>6</sup>-Methylguanine-DNA methyltransferase</p>	<p><i>O</i><sup>6</sup>-Methylguanine</p>
<p>AlkB protein</p>	<p>1-Methylguanine, 3-methylcytosine</p>

# SISTEMA DI RIPARAZIONE DEGLI APPAIAMENTI SBAGLIATI

(Strand-directed mismatch repair system)

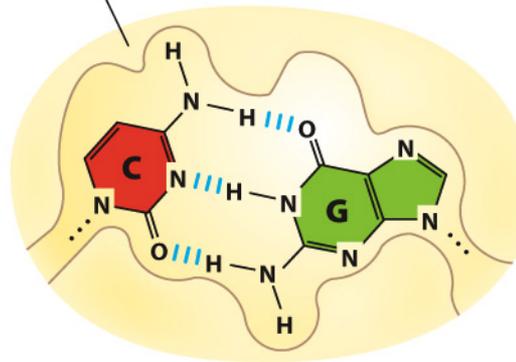
Sistema di enzimi che:

1. **Riconosce la distorsione dell'elica** dovuta al mismatch (distinguendo il filamento nuovo dal vecchio);
2. Taglia il segmento di DNA contenente il mismatch;
3. Risintetizza il segmento tagliato usando il filamento vecchio come stampo.

# Base-Pair Geometry

(a) Correct base pairs

Active site shape



(b) Incorrect base pairs

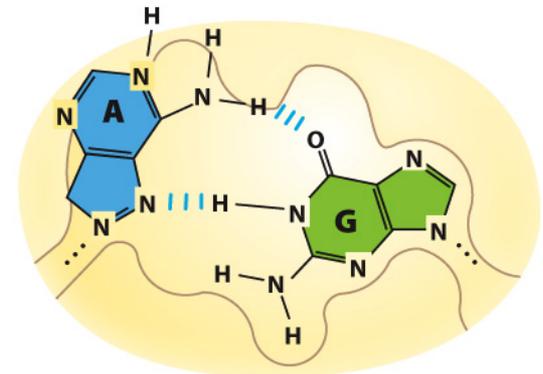
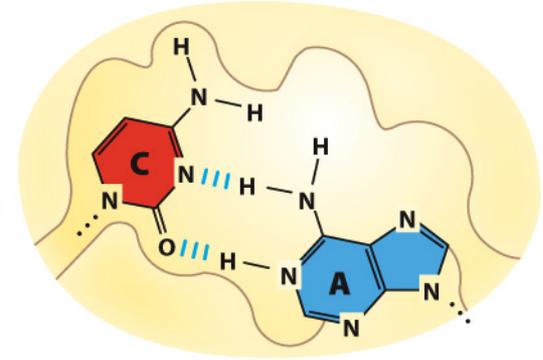
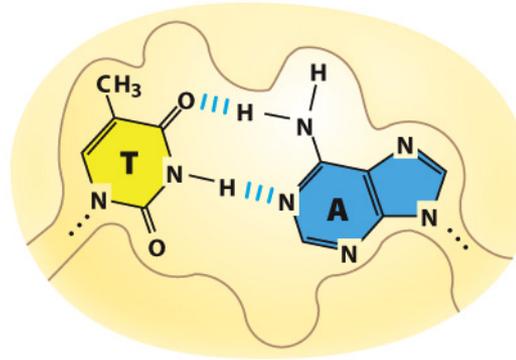
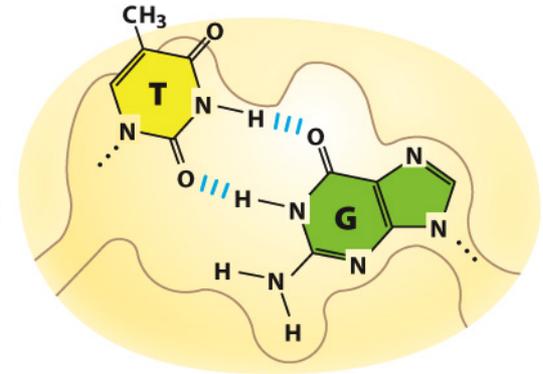


Figure 25-6

*Lehninger Principles of Biochemistry, Seventh Edition*

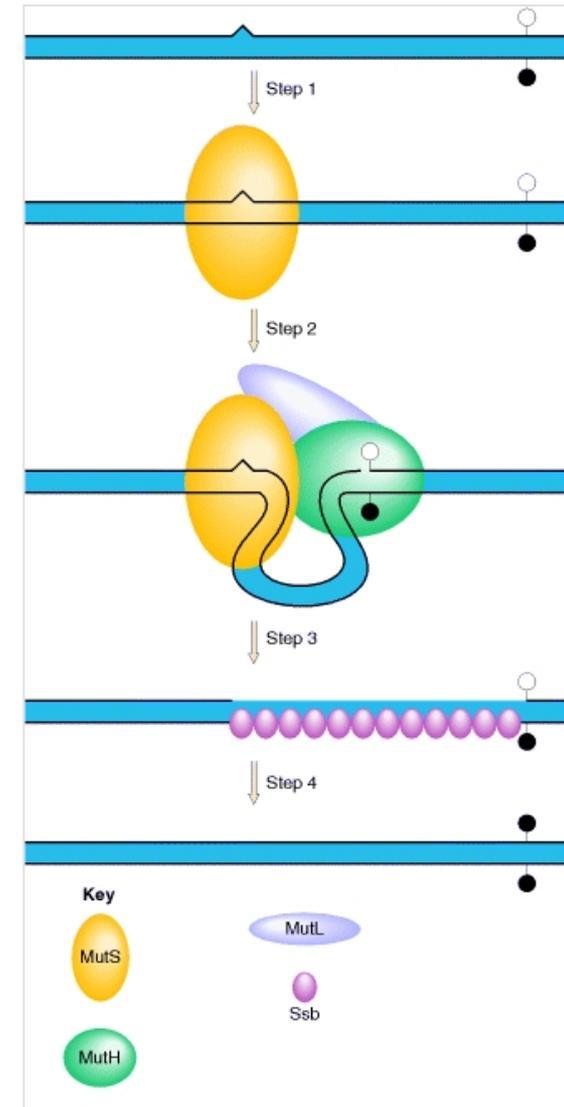
© 2017 W. H. Freeman and Company

# SISTEMA DI RIPARAZIONE DEGLI APPAIAMENTI SBAGLIATI (Strand-directed mismatch repair system)

Nei batteri **MutS** scorre lungo il DNA e riconosce il mismatch

**MutH** e **MutL** vengono reclutate

**MutH** taglia un segmento di filamento neosintetizzato, il gap viene riempito dalla DNA polimerasi e le estremità saldate dalla DNA ligasi.

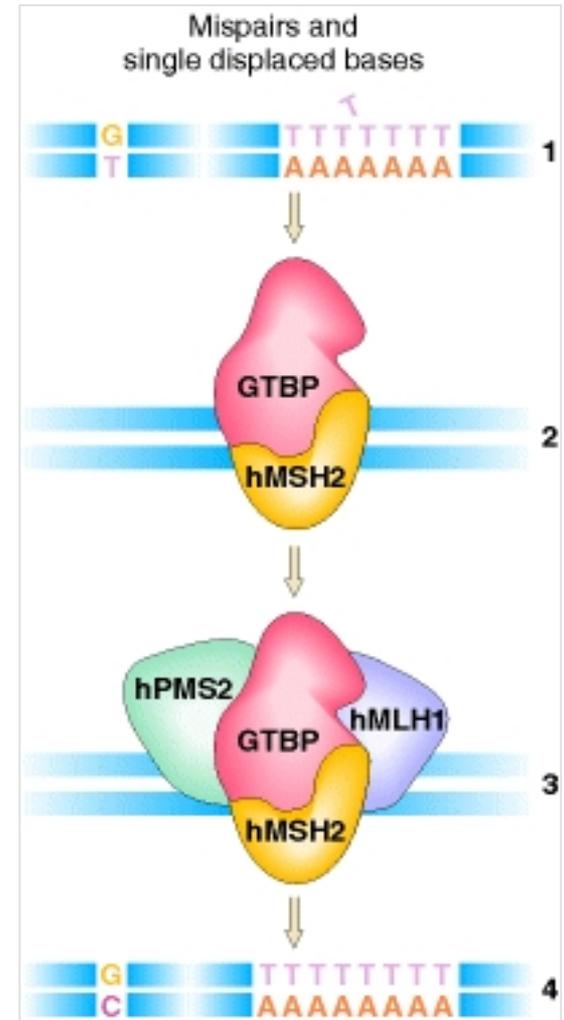


# SISTEMA DI RIPARAZIONE DEGLI APPAIAMENTI SBAGLIATI

(Strand-directed mismatch repair system)

Nelle cellule umane hMSH2 e hMLH1, sono simili a MutS e MutL rispettivamente, ma intervengono tante altre proteine

Mutazioni nei geni del mismatch repair system causano la predisposizione a certi tipi di cancro (es. HNPCC, carcinoma colonrettale ereditario non poliposico, noto anche come sindrome di Lynch; test predittivo: mutazioni nei geni MSH2 e MLH1).



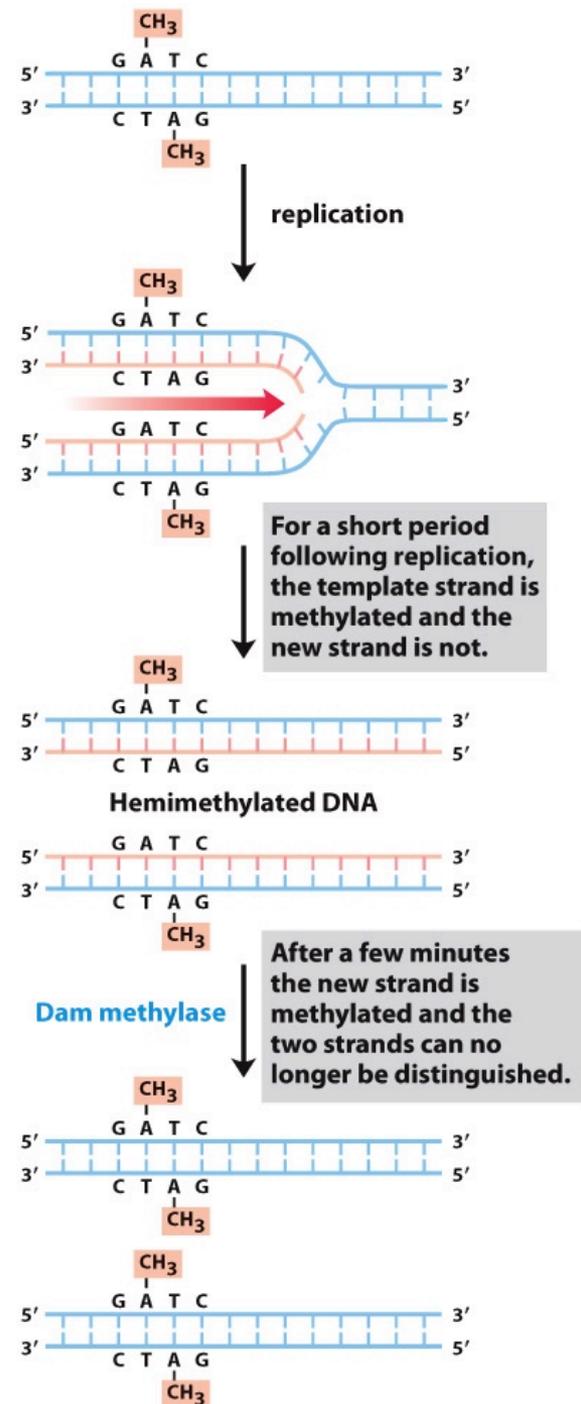
# Mismatch Repair

---

**How do repair enzymes “know” which strand is the correct one?**

# Mismatch Repair and Methylation

- In *E. coli*, the parent strand is methylated.
- **Dam methylase** inserts CH<sub>3</sub> at adenines in the **GATC** sequence.
- Following a short period of time, the daughter strand is then methylated.
- The **newly synthesized strand is unmethylated** for a short period after synthesis.
- Any replication errors must reside in the unmethylated strand.
- The methyl-directed mismatch repair system will **cleave the unmethylated strand** in the initial part of the repair process.



# Mechanism of Mismatch Recognition and Repair in *E. coli*

---

- MutL and MutS proteins recognize methylated GATC.
- MutH binds to MutL-MutS-DNA complex, making a DNA loop.
- DNA strands thread through the complex until methylated GATC is encountered.
  - mismatch could be 1,000 bp away from GATC
- MutH cleaves the nonmethylated DNA strand on the 5'-side of the G.
- DNA unwinds and is degraded 3' → 5'.
  - Helicase II (UvrD helicase), SSB, and exonucleases work to degrade the nonmethylated DNA toward the mismatch.
- The removed sequence is replaced using DNA Pol III and DNA ligase.



