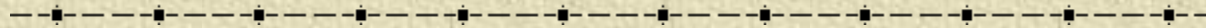


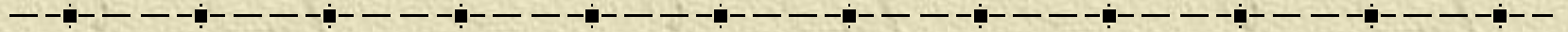
La replicazione del DNA



Corso di Genetica
per Scienze per l'Ambiente e la
Natura

— Alberto Pallavicini —

La replicazione semiconservativa del DNA

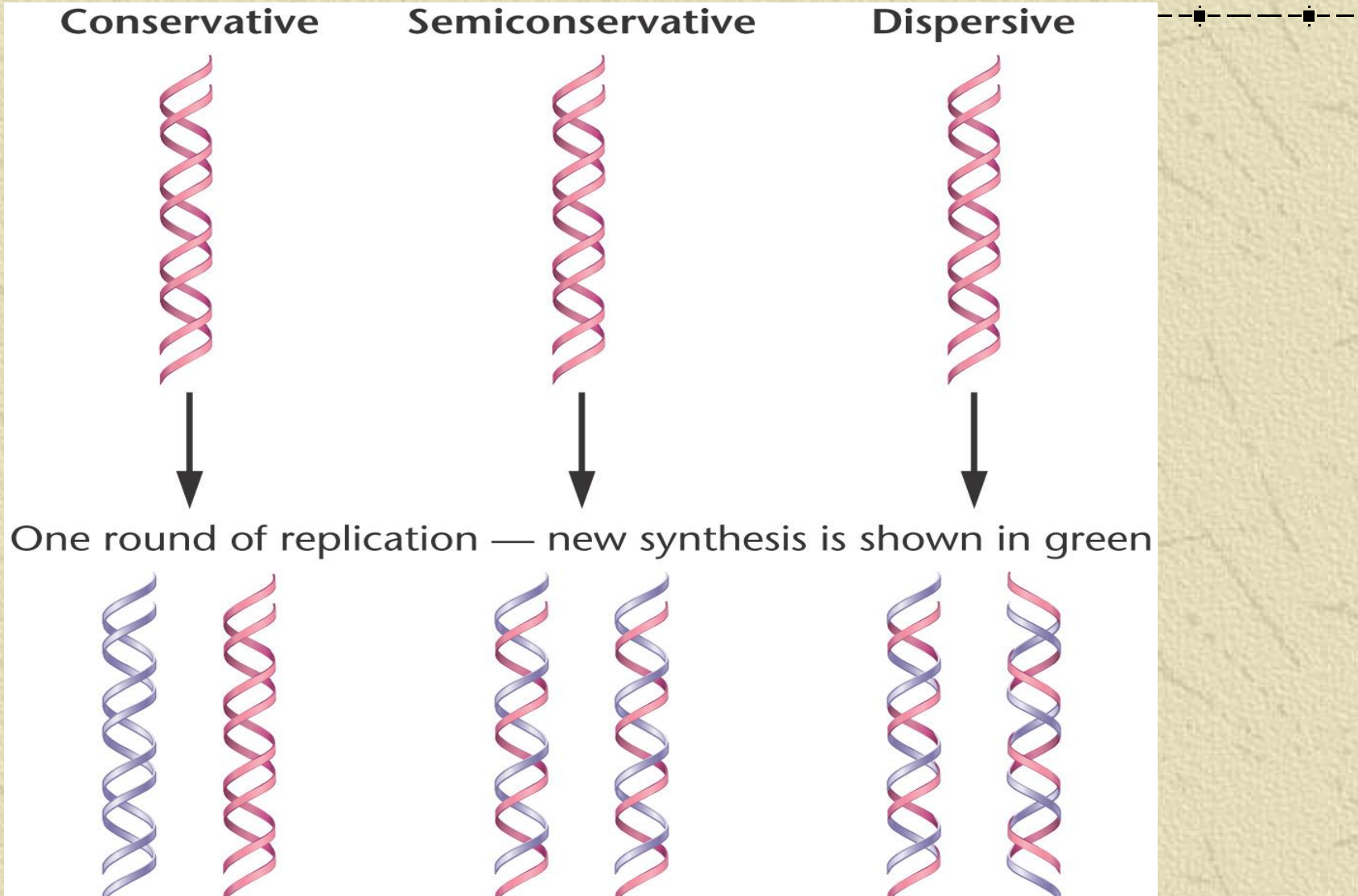


Quando Watson e Crick proposero il loro modello della doppia elica del DNA capirono che la replicazione del DNA sarebbe stata ovvia.

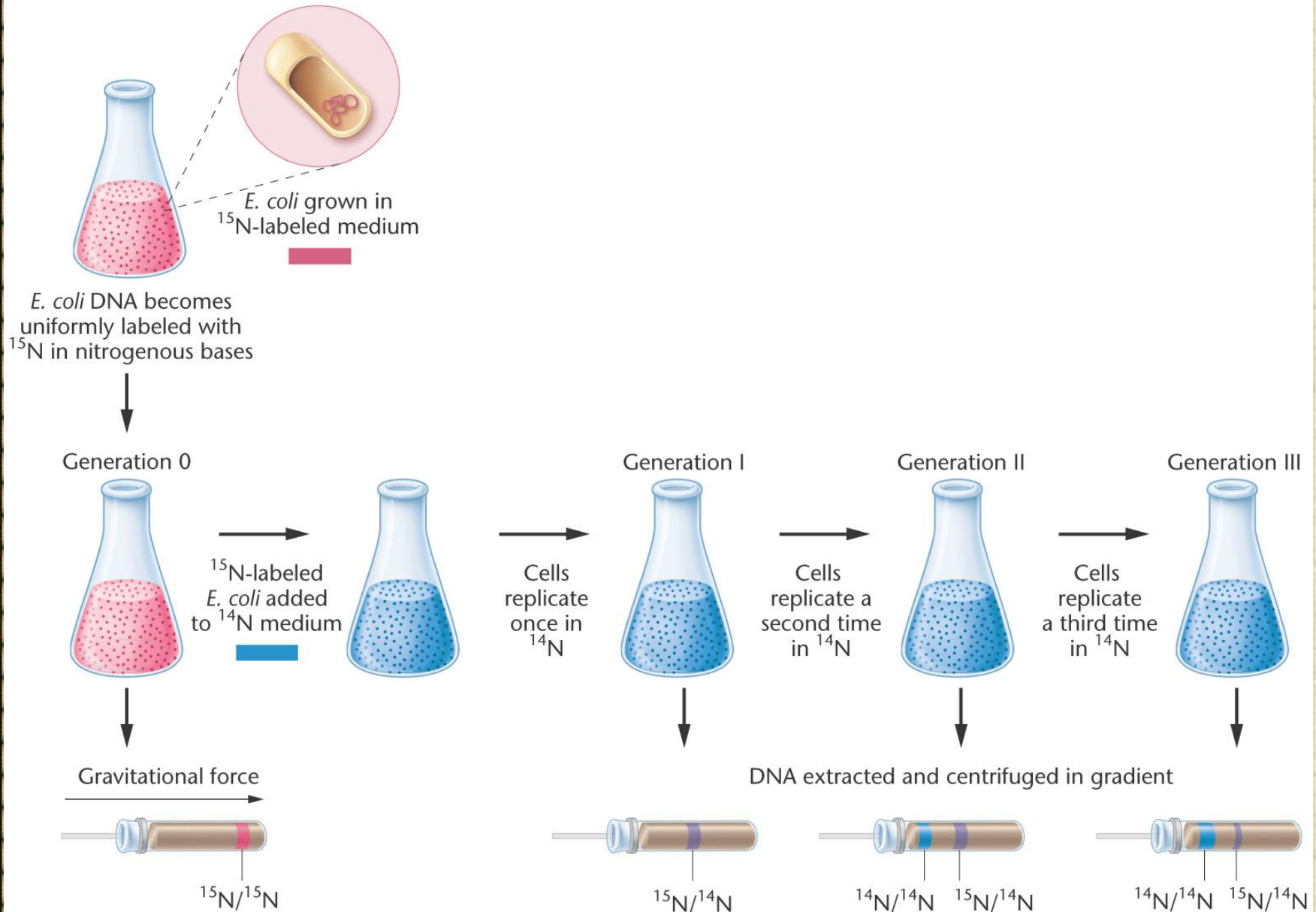
Ma a quei tempi tre erano i modelli proposti per la replicazione del DNA:

- **modello semiconservativo**
- **modello conservativo**
- **modello dispersivo**

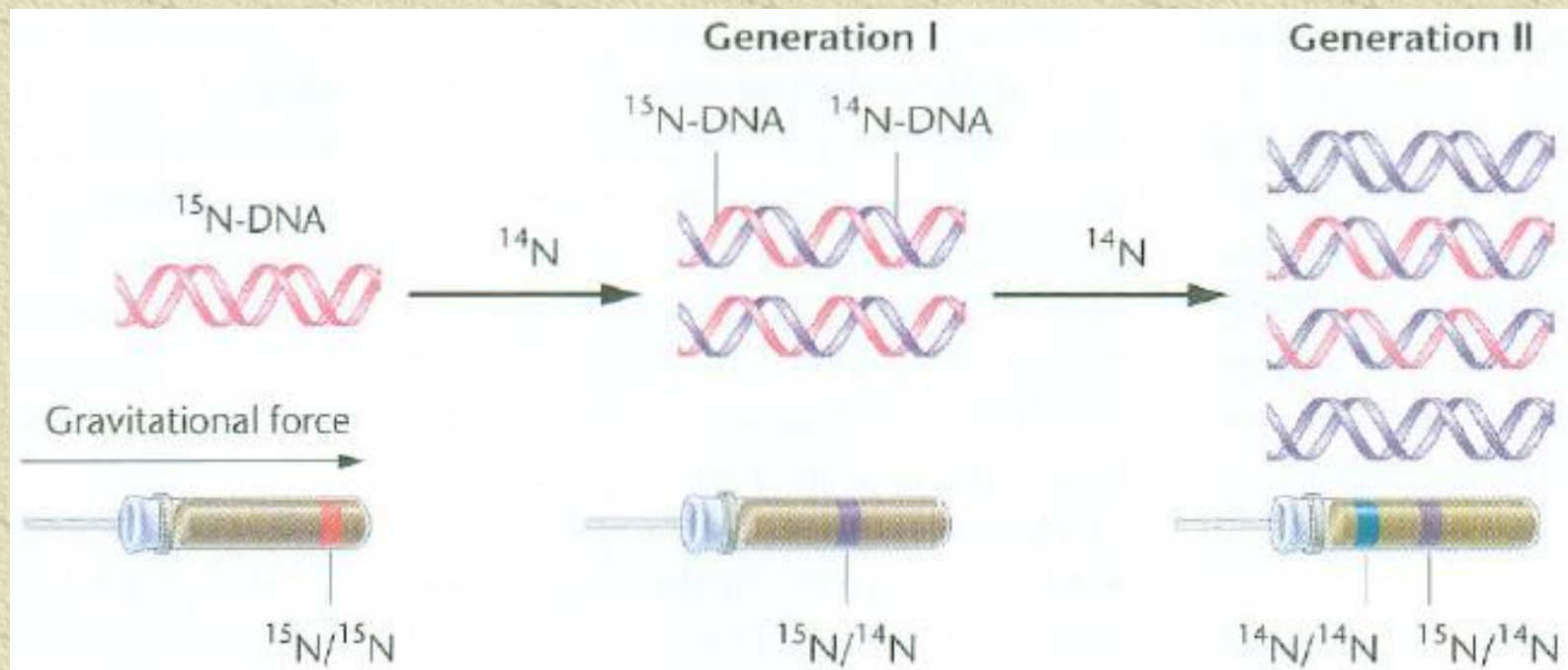
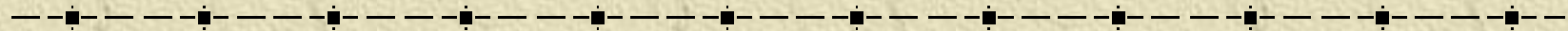
Replicazione semiconservativa



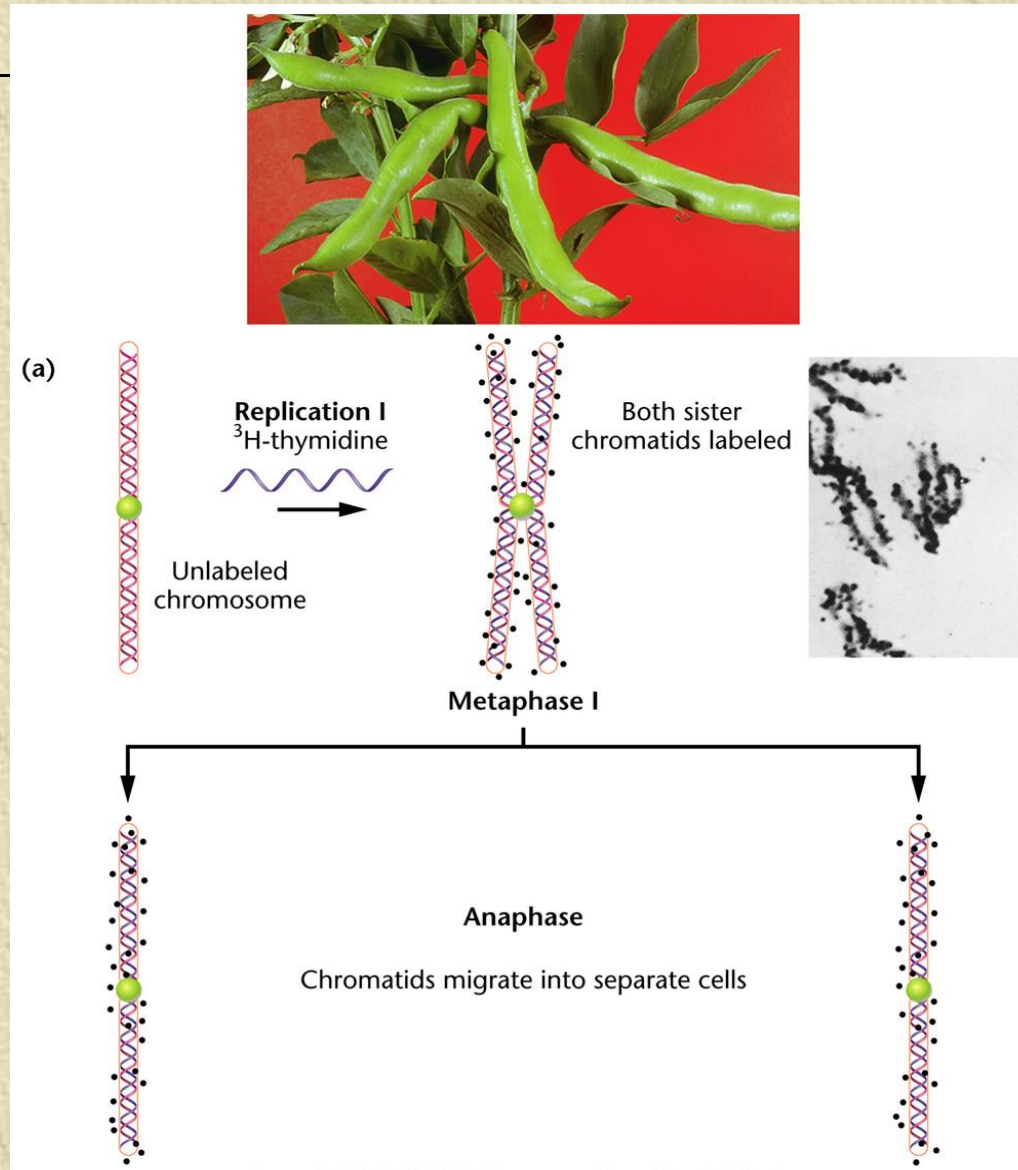
The Meselson-Stahl Experiment



L'unica spiegazione era data dalla replicazione semiconservativa



•The Taylor-Woods-Hughes experiment demonstrated that DNA replication is semiconservative in eukaryotes





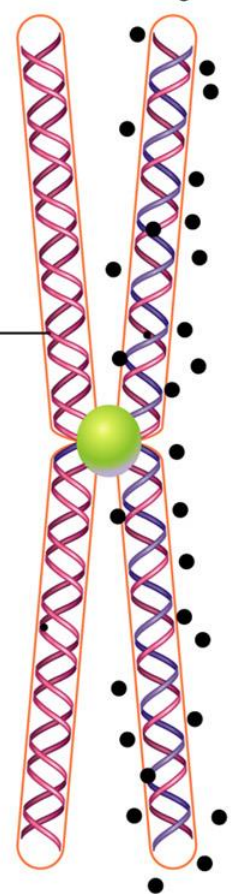
No sister chromatid exchange

Replication II
Unlabeled thymidine



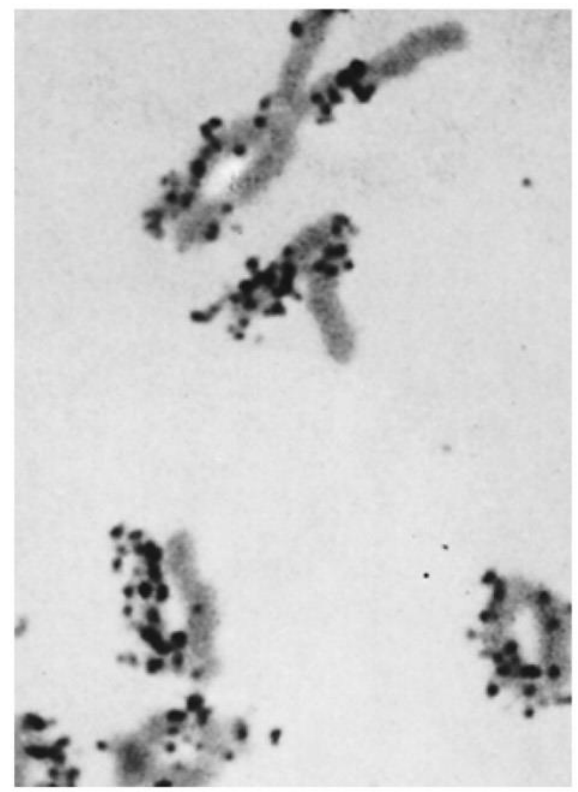
(b)

Unlabeled chromatid



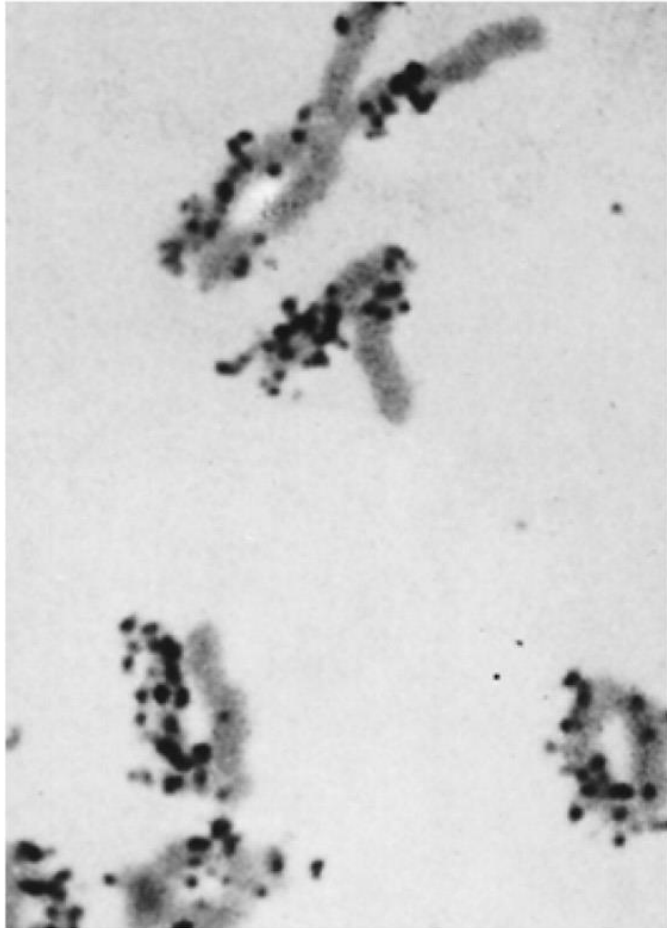
Only one chromatid labeled

Metaphase II



Replication II

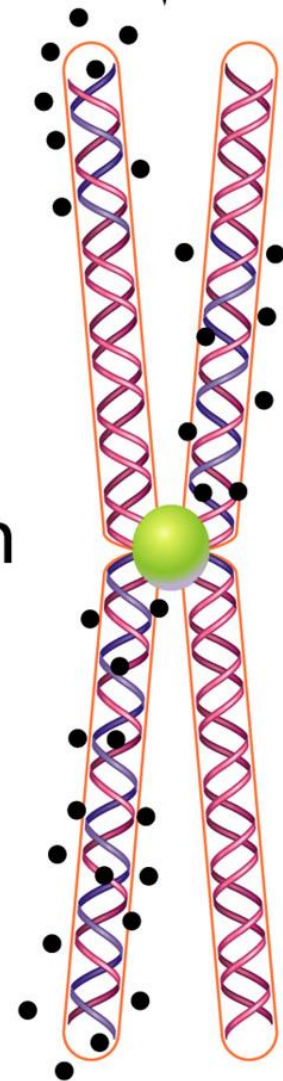
Unlabeled thymidine



Sister chromatid exchange

(c)

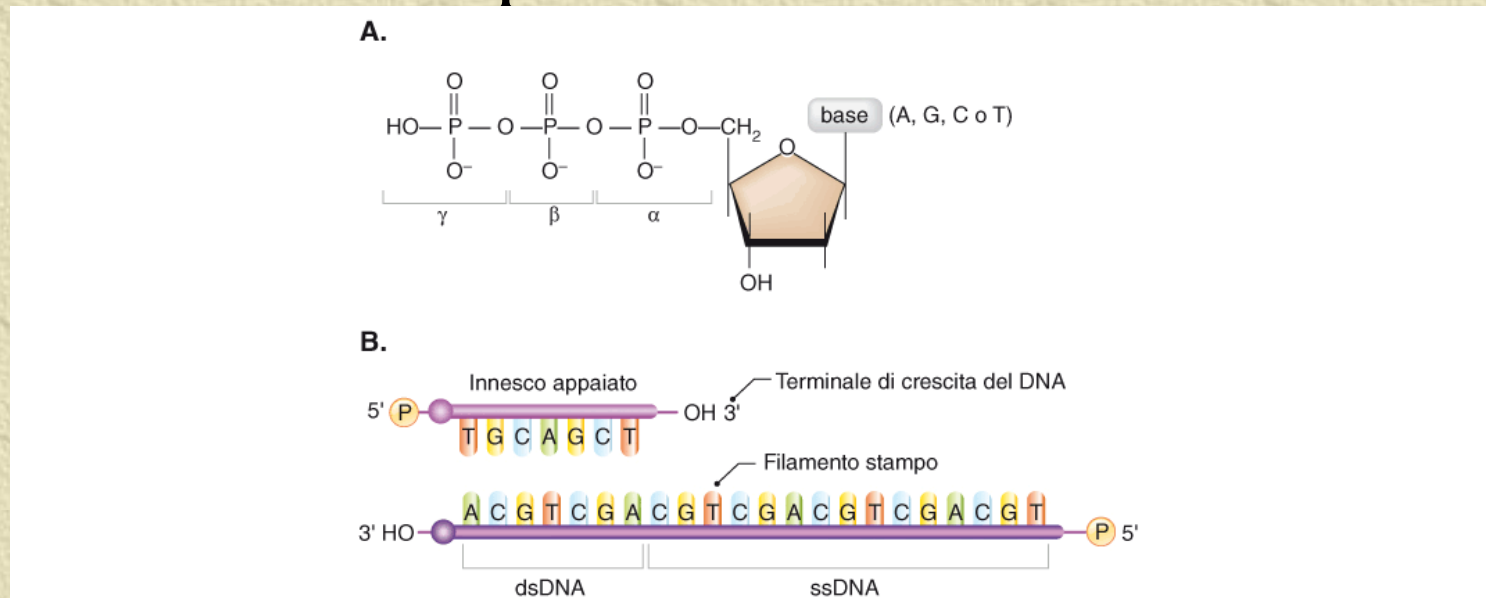
Reciprocal regions of both chromatids labeled



Metaphase II

La sintesi del DNA nei batteri necessita di DNA polimerasi

- I primi studi furono fatti da Kornberg 1957
- Isola da *E. coli* un enzima con proprietà DNA polimerasiche



DNA polimerasi II, III

TABLE 11.2

PROPERTIES OF BACTERIAL DNA POLYMERASES I, II, AND III

Properties	I	II	III
Initiation of chain synthesis	—	—	—
5'–3' polymerization	+	+	+
3'–5' exonuclease activity	+	+	+
5'–3' exonuclease activity	+	—	—
Molecules of polymerase/cell	400	?	15

DNA polimerasi

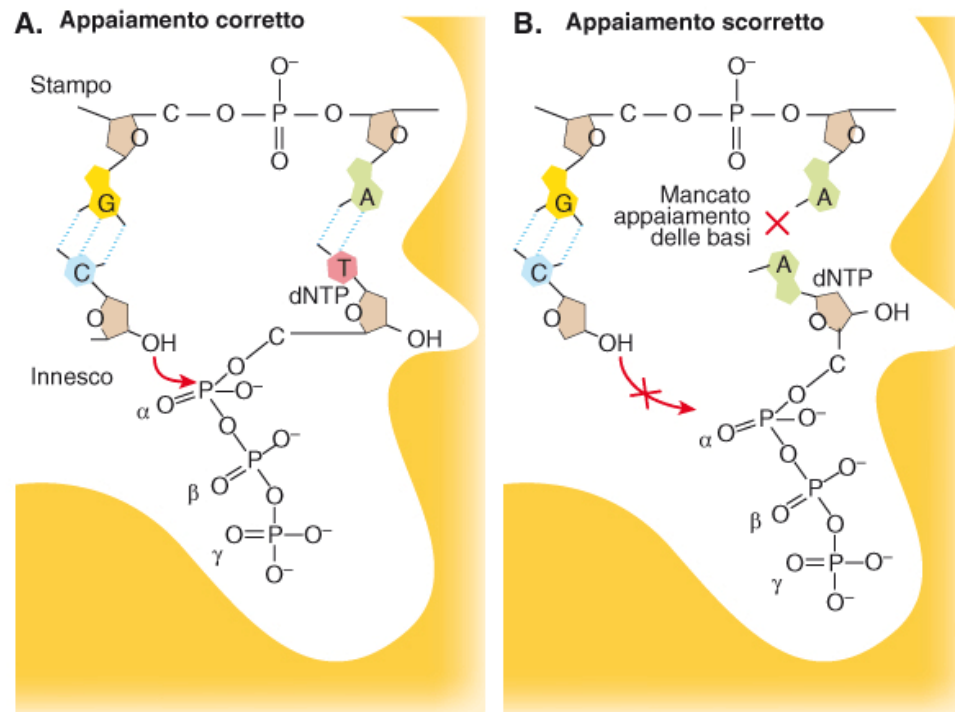
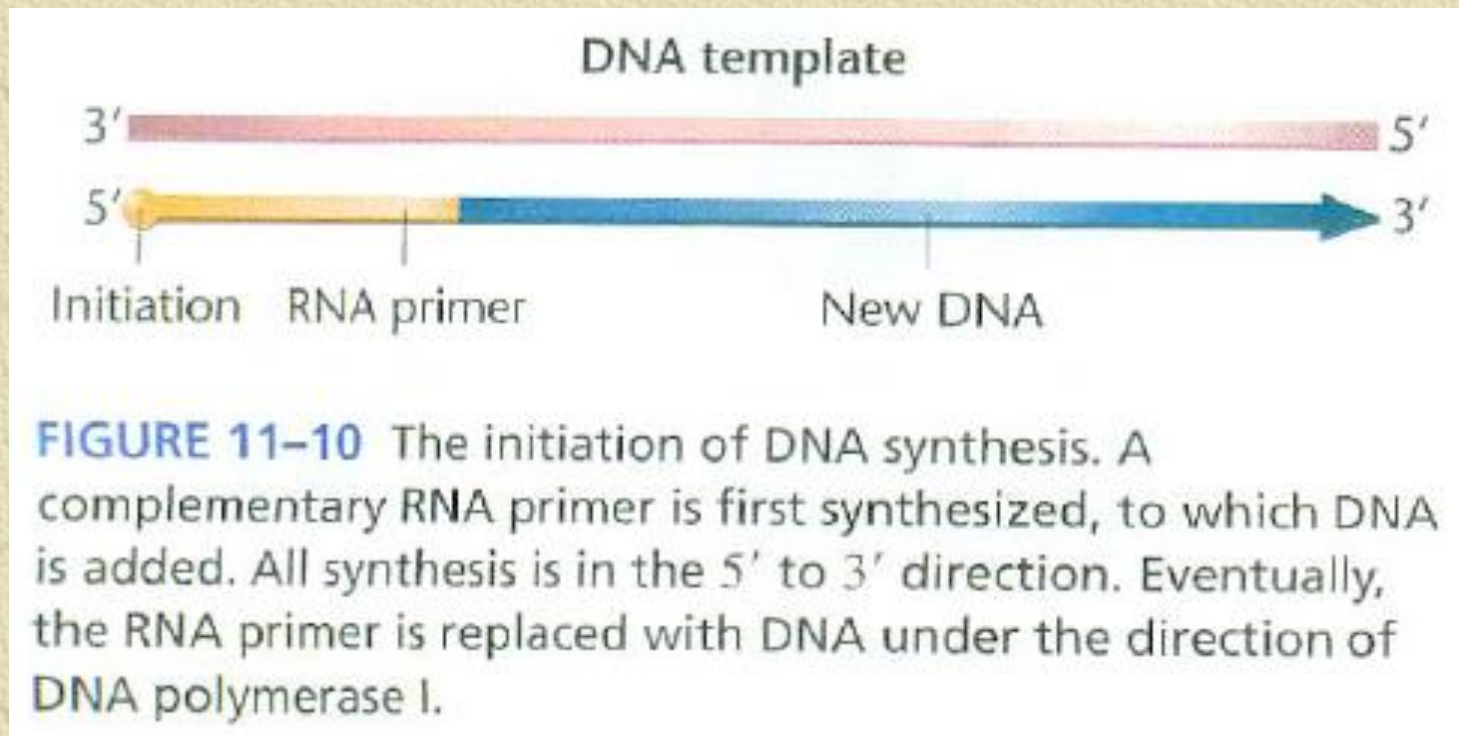


FIGURA 9.14 ► Un corretto appaiamento delle basi è necessario per la polimerizzazione dei nucleotidi da parte della DNA polimerasi. (A) Solo un dNTP correttamente appaiato si trova ad avere il fosfato in α in posizione tale da poter essere attaccato dal 3'-OH dell'innesco. (B) Uno scorretto appaiamento di basi riduce drasticamente la velocità di catalisi.

La sintesi del DNA richiede un innesco

- Fornito dalla RNA polimerasi chiamata **primasi**
 - Il frammento è lungo 5-15 ribonucleotidi



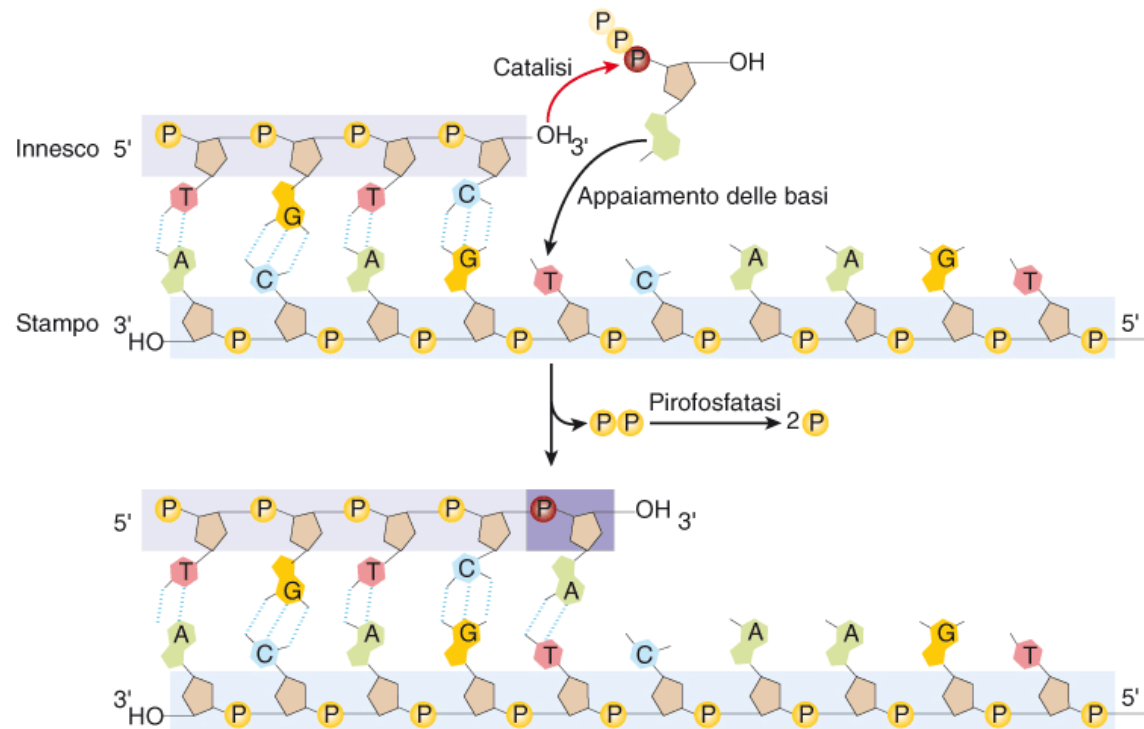


FIGURA 9.13 ► Schema del meccanismo di sintesi del DNA. La sintesi del DNA inizia per mezzo di un attacco nucleofilo del fosfato α del dNTP che deve essere inserito. Questo determina l'allungamento di un nucleotide al terminale 3' dell'innesco e il rilascio di una molecola di pirofosfato, che viene rapidamente idrolizzata da parte di una pirofosfatasi, con produzione di due molecole di fosfato.

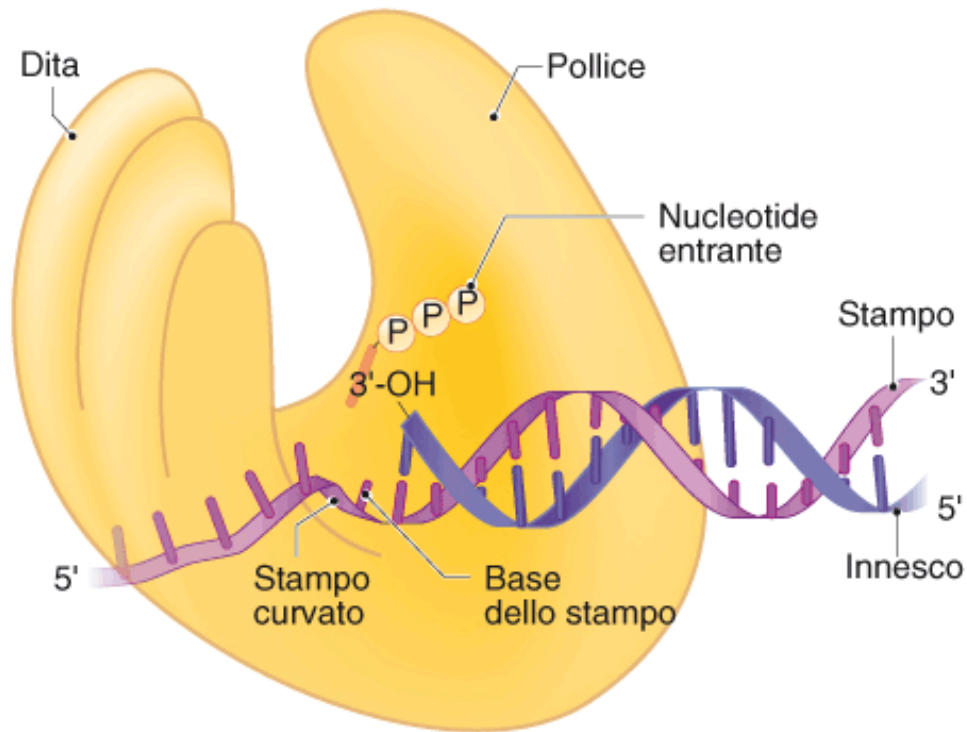
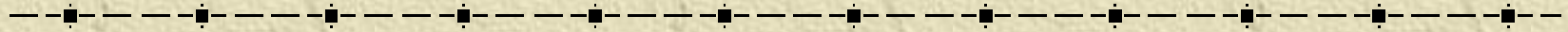
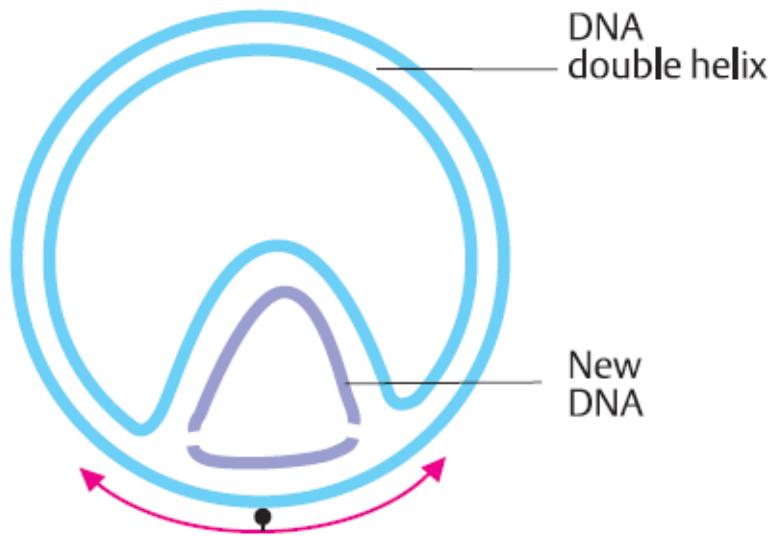


FIGURA 9.15 ► La struttura tridimensionale della DNA polimerasi fa pensare a una mano destra. Il DNA neosintetizzato è associato con il dominio a palmo della DNA polimerasi. Sul sito attivo, la prima base dello stampo è nella posizione corretta perché possa formarsi la doppia elica. Immediatamente dopo questo nucleotide, il legame fosfodiestereico dello stampo si piega di 90°. Ciò impedisce a tutte le successive basi dello stampo di potersi appaiare con i dNTP nel sito attivo.

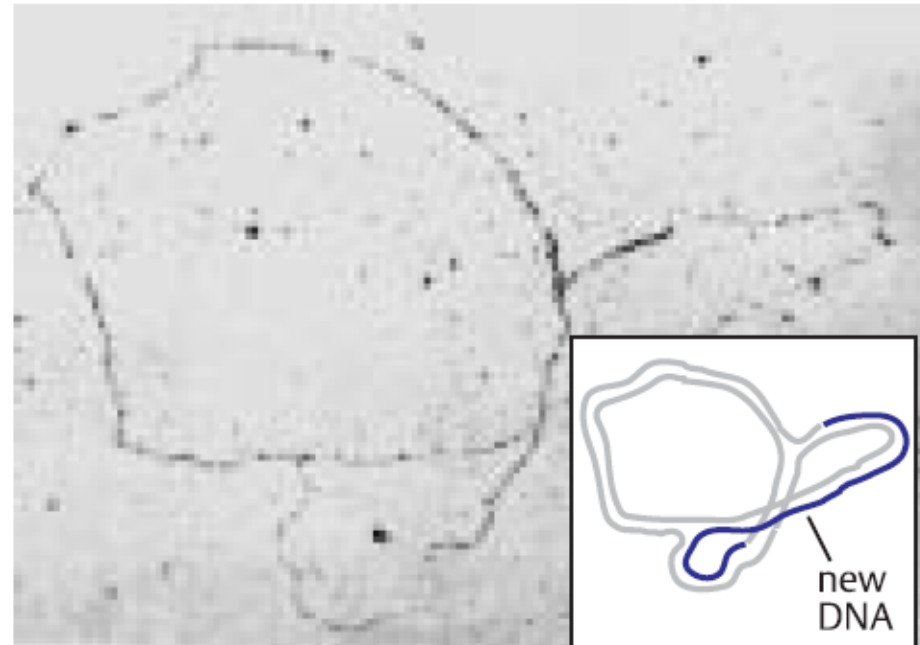
Origini, forche e unità di replicazione



- Replicazione bidirezionale
- In *E. coli* un unico replicone
- Parte dalla regione OriC

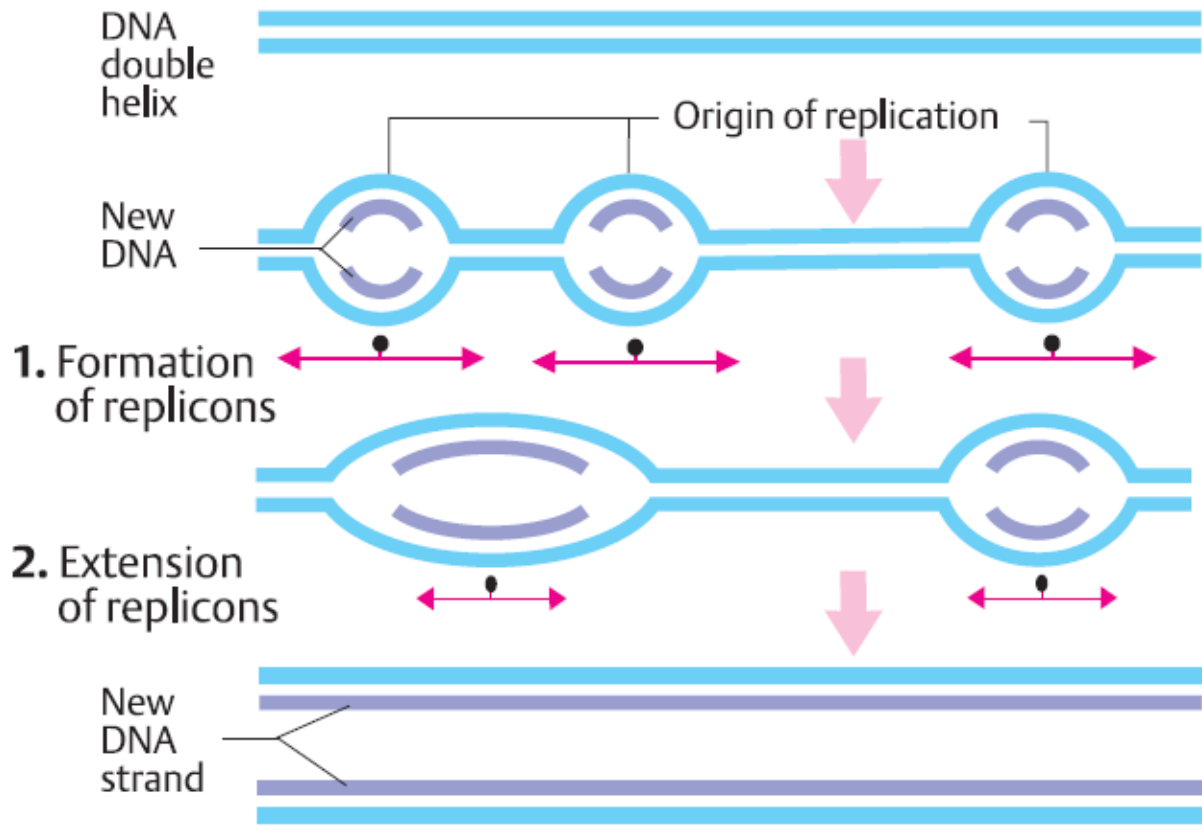
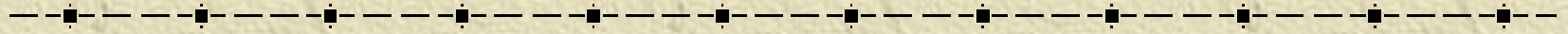


1. DNA replication in the bacterial chromosome



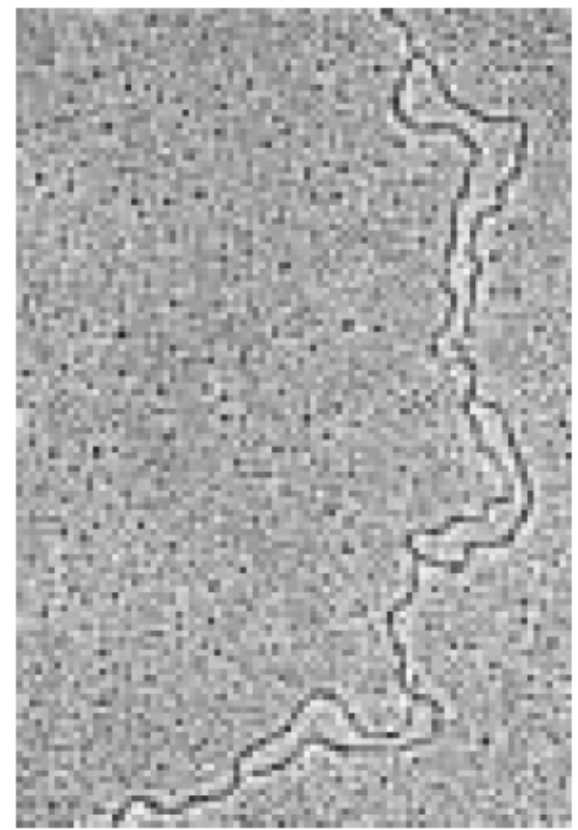
2. Prokaryotic replication in an autoradiogram in *E. coli* (J. Cairns)

Negli eucarioti la sintesi parte da più origini di replicazione

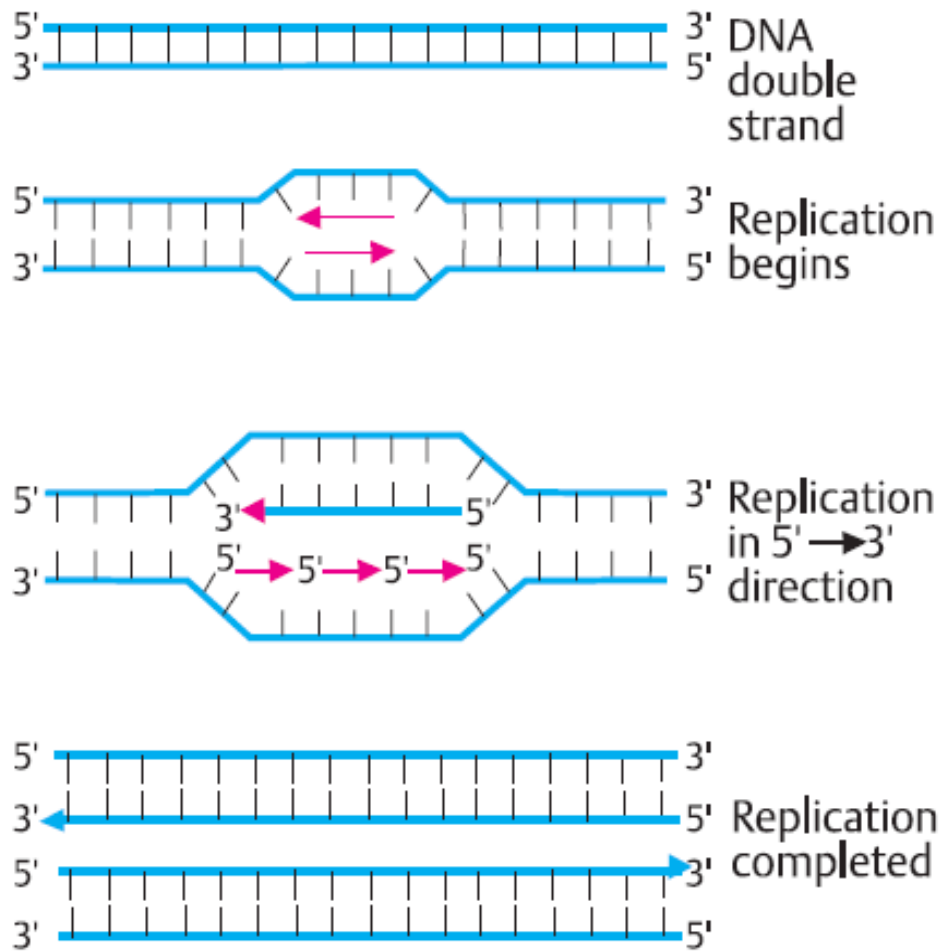


3. Replication completed

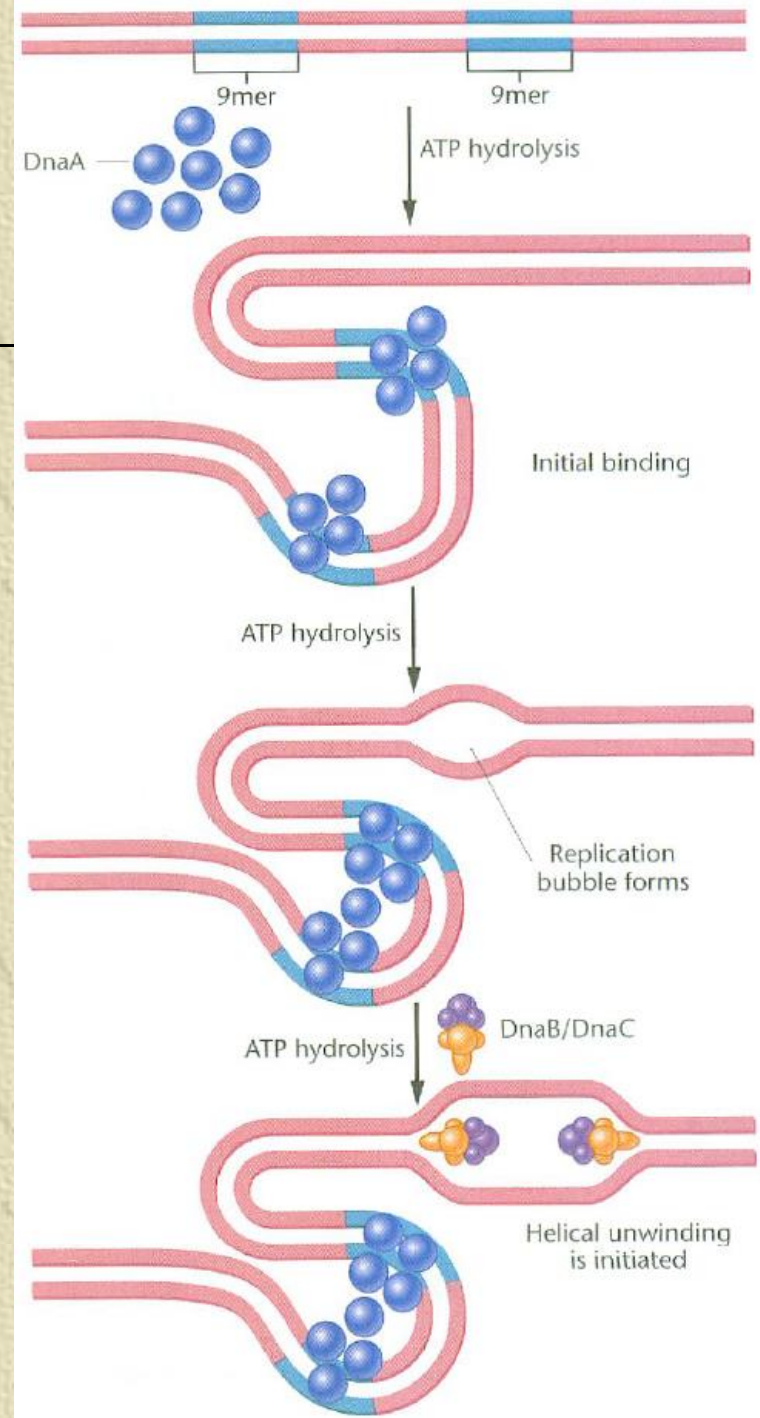
B. Eukaryotic replication begins at several sites



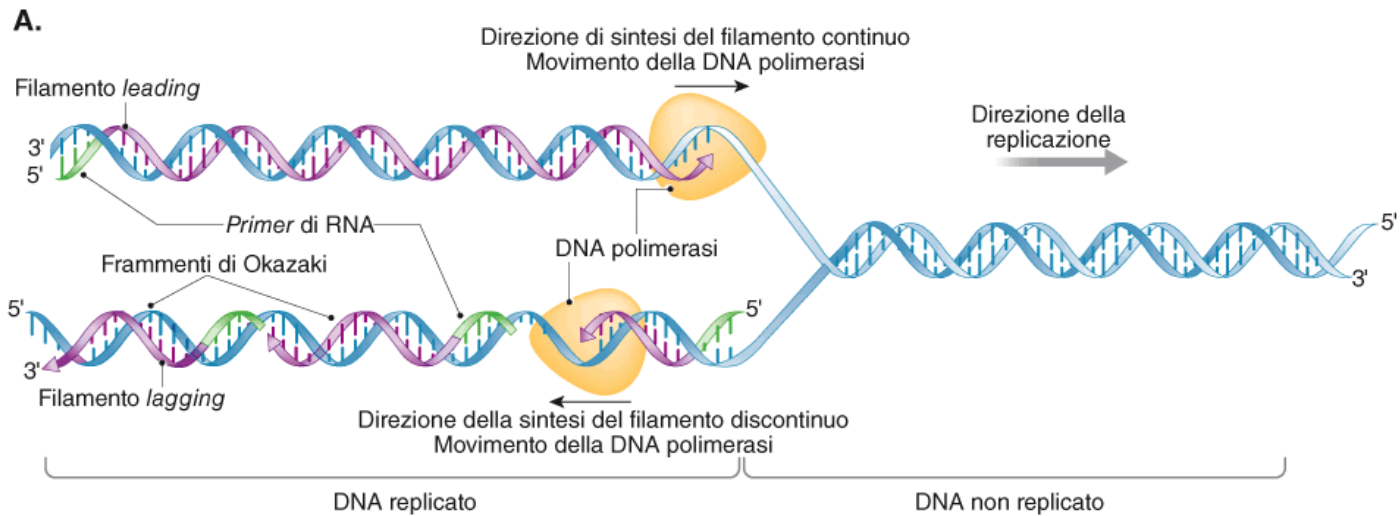
4. Eukaryotic replication in the EM (D. S. Hogness)



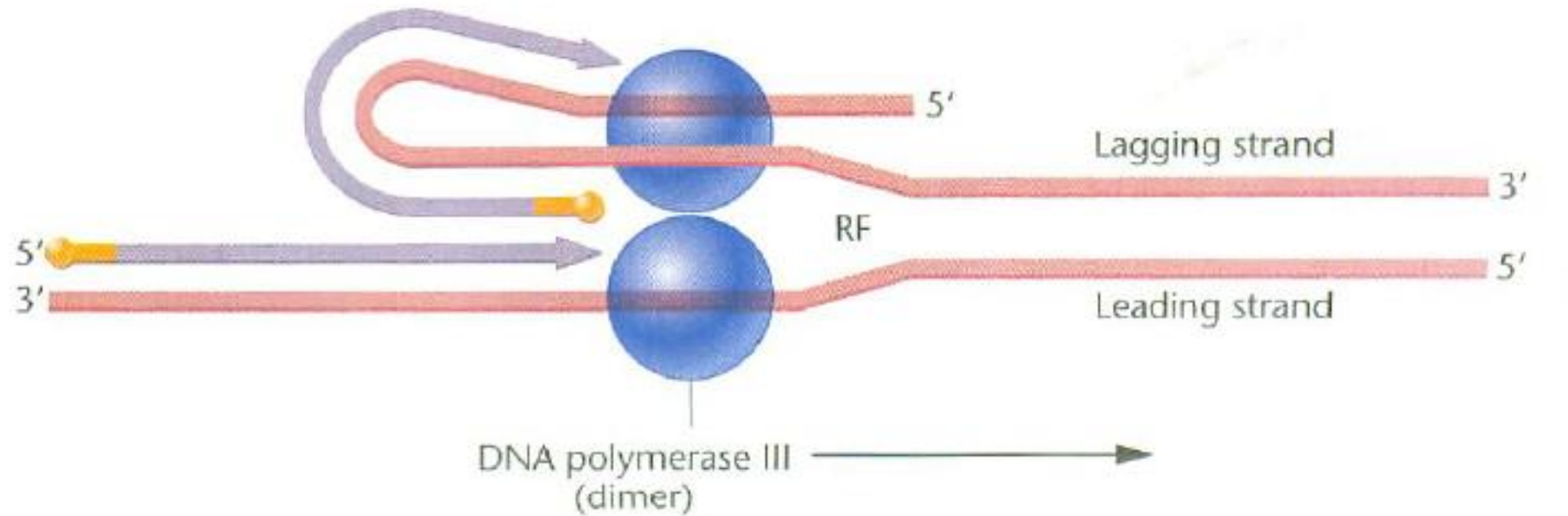
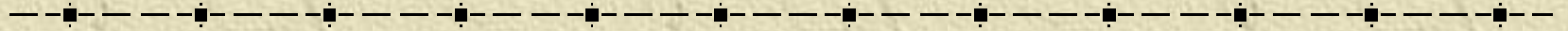
C. Scheme of replication



La forza replicativa



La sintesi avviene simultaneamente



La replicazione del DNA necessita la cooperazione di molti enzimi

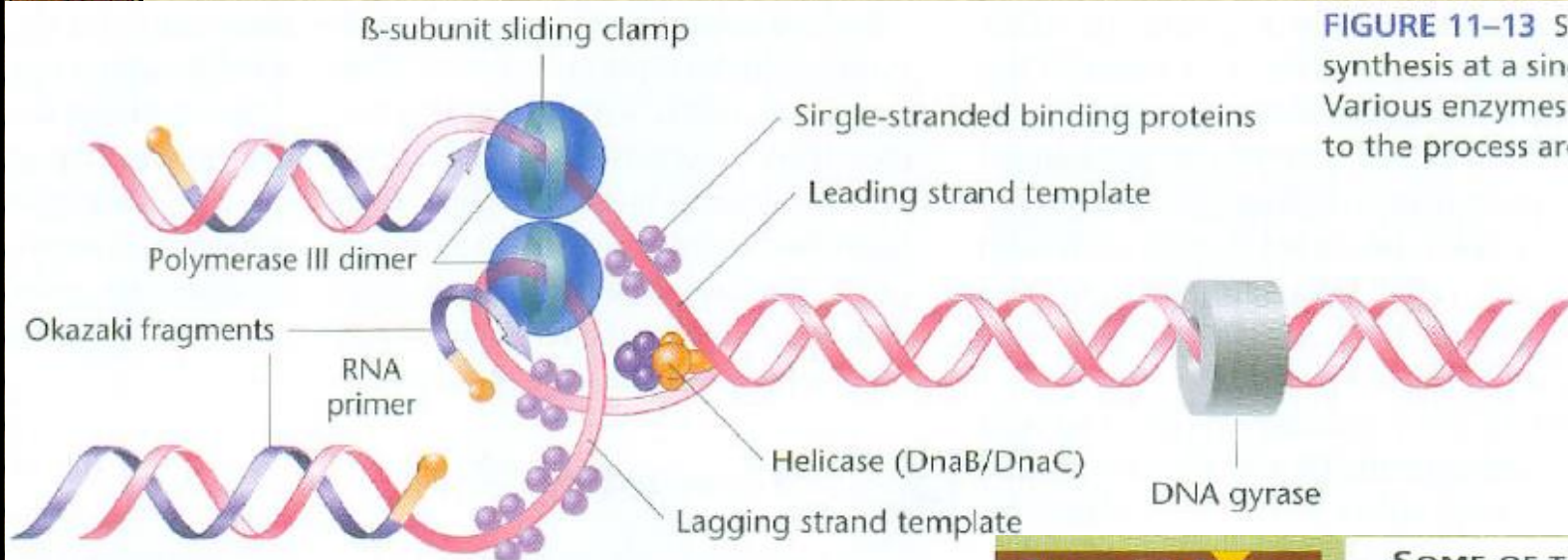


FIGURE 11-13 Summary of DNA synthesis at a single replication fork. Various enzymes and proteins essential to the process are shown.

• Si usano mutazioni condizionali per studiare l'attività dei diversi enzimi mutati

TABLE 11.4

SOME OF THE VARIOUS *E. COLI* MUTANT GENES AND THEIR PRODUCTS OR ROLE IN REPLICATION

Mutant Gene	Enzyme or Role
<i>polA</i>	DNA polymerase I
<i>polB</i>	DNA polymerase II
<i>dnaE, N, Q, X, Z</i>	DNA polymerase III subunits
<i>dnaG</i>	Primase
<i>dnaA, I, P</i>	Initiation
<i>dnaB, C</i>	Helicase at <i>oriC</i>
<i>oriC</i>	Origin of replication
<i>gyrA, B</i>	Gyrase subunits
<i>lig</i>	Ligase
<i>rep</i>	Helicase
<i>ssb</i>	Single-stranded binding proteins
<i>rpoB</i>	RNA polymerase subunit

Escherichia coli possiede almeno cinque DNA polimerasi.

- La DNA polimerasi II ha una funzione altamente specializzata nel riparo del DNA.
- La DNA polimerasi III è il più importante enzima della replicazione di *E. coli*.
- Le DNA polimerasi IV e V, isolate nel 1999, sono coinvolte in un particolare processo di riparazione, la riparazione soggetta ad errori o risposta SOS.

La replicazione del DNA negli eucarioti

• Nel lievito le origini della replicazione sono sequenze di circa 150 coppie di basi dette replicatori (o ARS, *autonomously replicating sequences*)

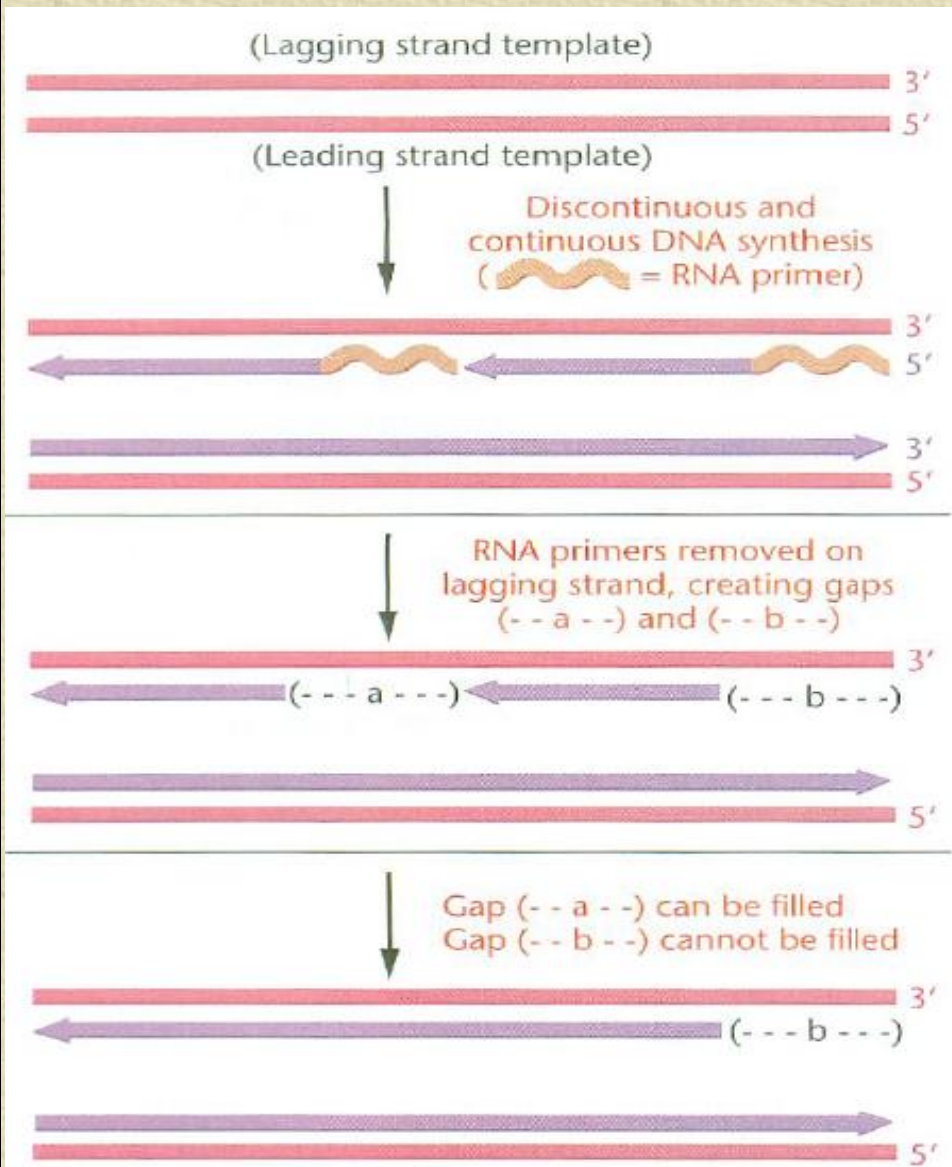
• L'inizio della replicazione in tutti gli eucarioti richiede una proteina multimerica, ORC (*origin recognition complex*), che si lega a numerose sequenze contenute nel replicatore.

TABLE 11.5

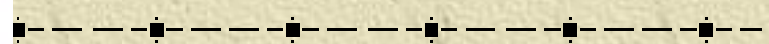
PROPERTIES OF EUKARYOTIC DNA POLYMERASES

	Polymerase α	Polymerase β	Polymerase δ	Polymerase ϵ	Polymerase γ	Polymerase ζ
Location	Nucleus	Nucleus	Nucleus	Nucleus	Mitochondria	Nucleus
3'–5' Exonuclease Activity	No	No	Yes	Yes	Yes	No
Essential to Nuclear Replication?	Yes	No	Yes	Yes	No	No

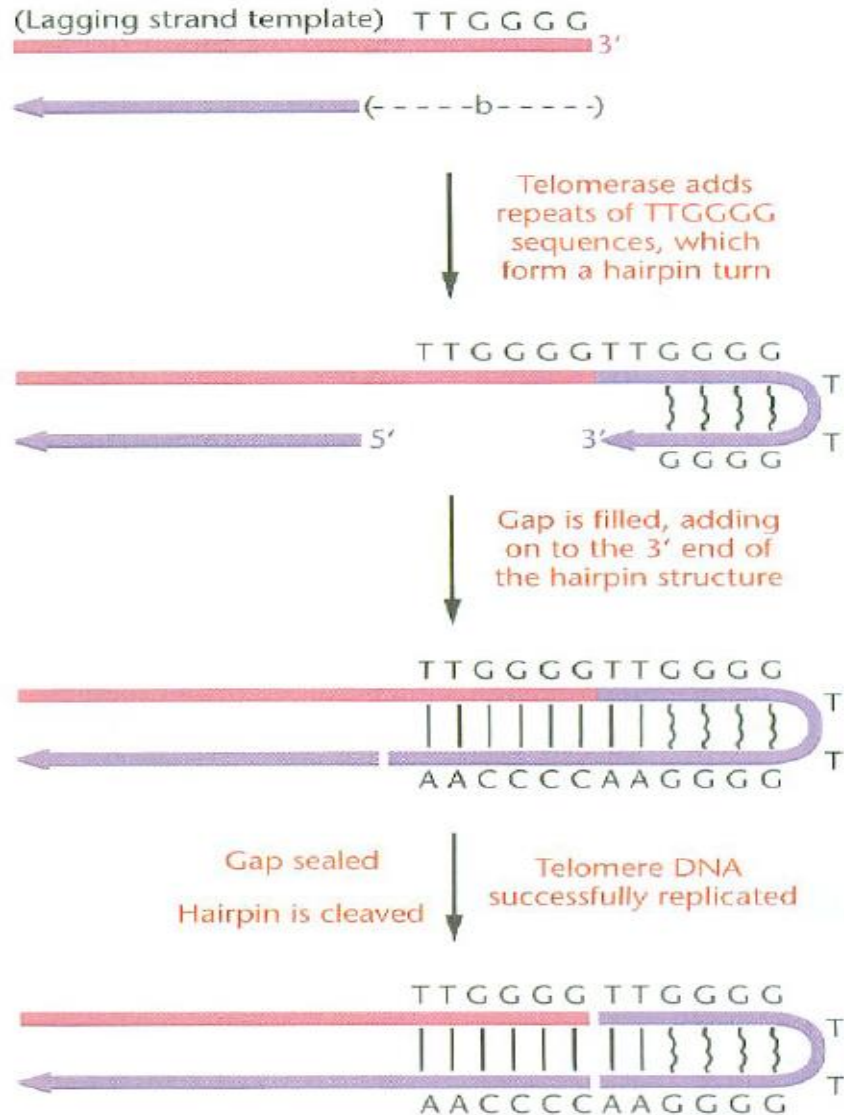
Le estremità dei cromosomi



Se si continua così ciclo a ciclo perdiamo DNA

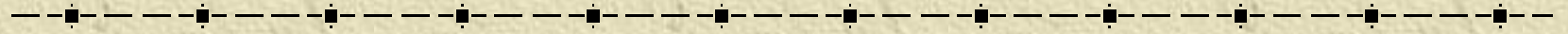


La telomerasi sintetizza frammenti che formano forcine



- Che poi servono da innesco alla polimerasi

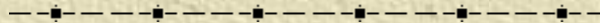
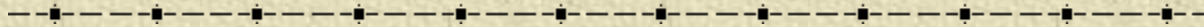
Telomeri, invecchiamento e cancro



✦ <http://www.fisv.org/fisv-talks/anno-2013/item/288-telomeri,-invecchiamento-e-cancro>

Controllo genetico delle
proteine.

Ovvero: Funzione del gene



Controllo genetico degli enzimi

Quale è la funzione del gene?

I geni codificano per proteine

La prima prova di questo legame fu il trovare il collegamento tra genetica ed enzimi richiesti per degradare o sintetizzare un determinato composto chimico.

1902 alcaptonuria

Garrod e Bateson conclusero che questa malattia ha origini genetiche

Controllo genetico degli enzimi

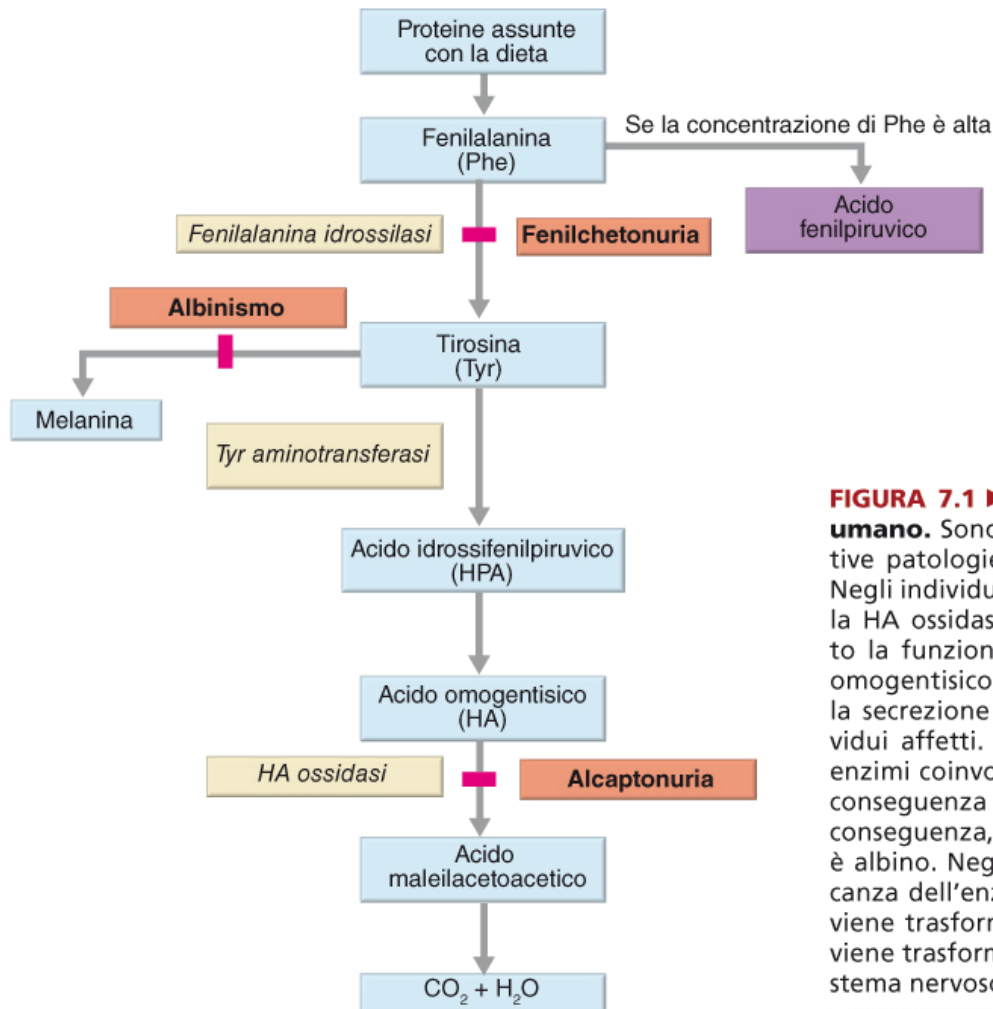


FIGURA 7.1 ► Alcuni errori congeniti del metabolismo umano. Sono indicati i principali blocchi enzimatici e le relative patologie genetiche del metabolismo degli aminoacidi. Negli individui affetti da alcaptonuria, il gene che codifica per la HA ossidasi ha subito una mutazione che ne ha inattivato la funzione, impedendo quindi la conversione dell'acido omogentisico in acido maleilacetoacetico. La conseguenza è la secrezione dell'acido omogentisico nelle urine degli individui affetti. Negli individui affetti da albinismo, uno degli enzimi coinvolti nella sintesi della melanina è alterato, come conseguenza di una mutazione nel gene che lo codifica; di conseguenza, la melanina non viene sintetizzata e l'individuo è albino. Negli individui affetti da fenilchetonuria, per mancanza dell'enzima fenilalanina idrossilasi, la fenilalanina non viene trasformata in tirosina; di conseguenza, si accumula e viene trasformata in acido fenilpiruvico, causando danni al sistema nervoso.

Controllo genetico degli enzimi

1942 Beadle e Tatum

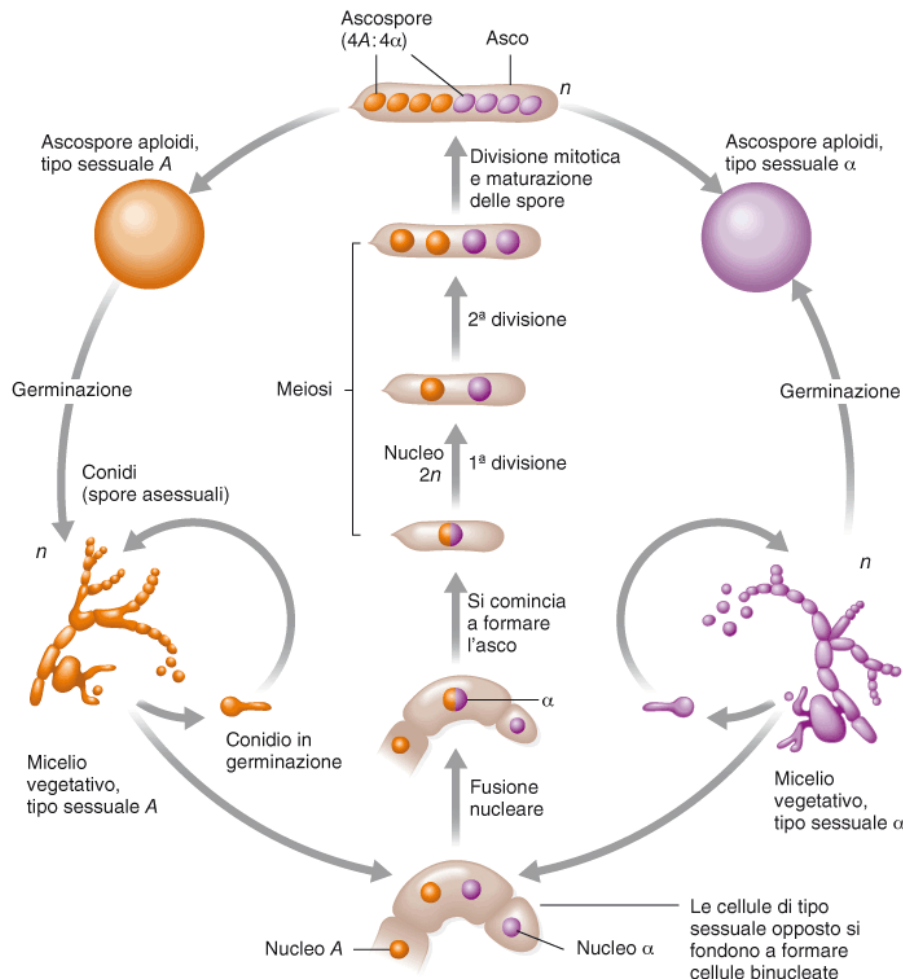


FIGURA 7.2 ► Ciclo vitale di *Neurospora crassa*. La fase vegetativa è un organismo aploide con dei filamenti, o ife, che formano una massa spongiosa, il micelio. I protoperiteci, le strutture sessuali femminili, si differenziano da un groviglio di ife sterili che racchiudono l'ascogonio. Questo è formato da un'ifa multicellulare spiralata che si estende in un sistema di ife sottili, detto tricogino. La fecondazione avviene quando un conidio di un tipo sessuale viene a contatto con una parte del tricogino di tipo sessuale opposto. In seguito si ha la fusione dei due nuclei e si forma uno zigote che costituisce l'unico elemento diploide del ciclo vitale. Il nucleo $2n$ subisce una meiosi e poi una mitosi, dando origine a un asco contenente 8 spore, a due a due identiche.

Controllo genetico degli enzimi

1942 Beadle e Tatum

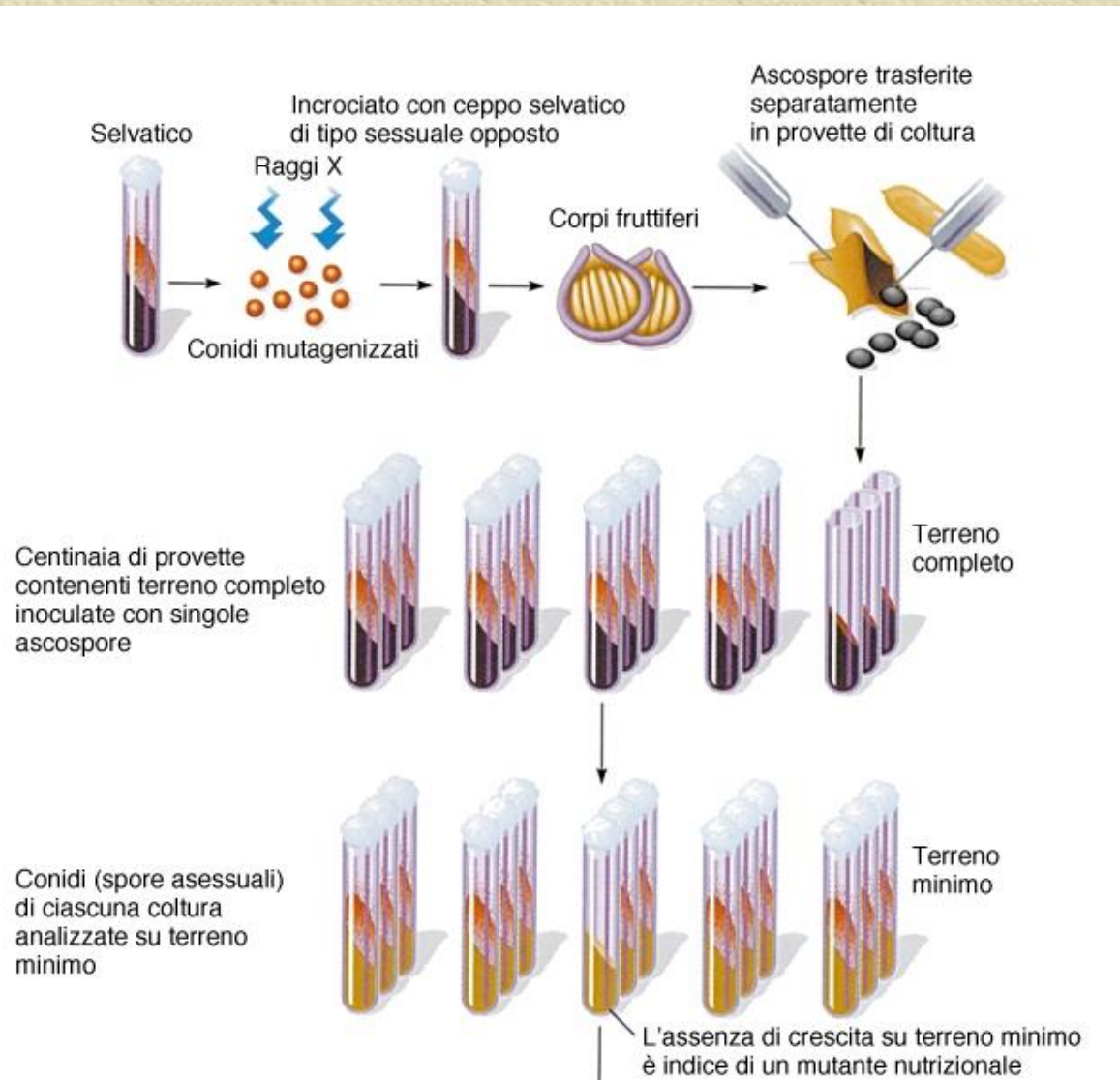
La Neurospora ha esigenze nutrizionali semplici

Il ceppo selvatico cresce in un terreno minimo con sali inorganici, una fonte di carbonio organica, biotina.

Forse è possibile isolare mutanti nutrizionali? (Auxotrofi)

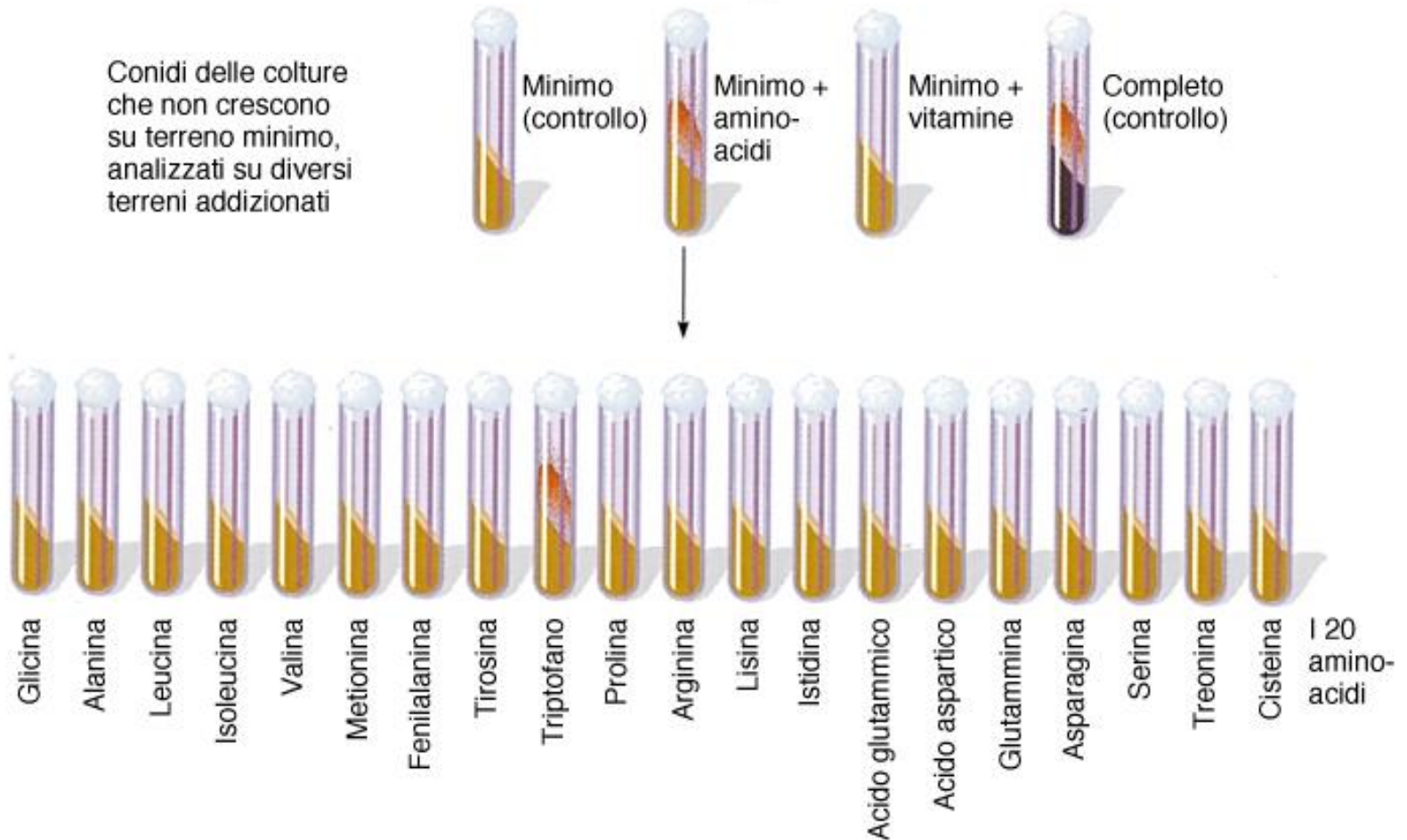
Controllo genetico degli enzimi

1942 Beadle e Tatum



Controllo genetico degli enzimi

1942 Beadle e Tatum



Controllo genetico degli enzimi

1942 Beadle e Tatum

Figura 4.4

Catena metabolica della metionina che mostra i quattro geni in *Neurospora crassa* che codificano per gli enzimi che catalizzano ciascuna reazione. (I geni *met-5* e *met-2* sono sullo stesso cromosoma; *met-3* e *met-8* sono su due altri cromosomi).

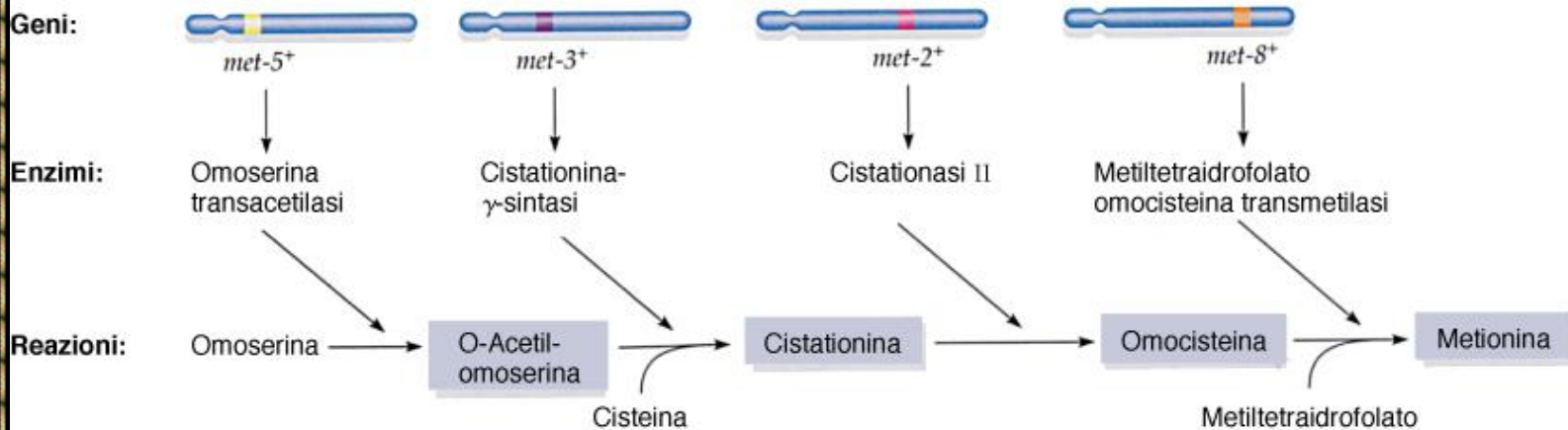


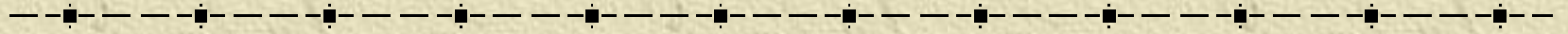
Tabella 4.1 Crescita di mutanti auxotrofi per metionina

Crescita in terreno minimo addizionato con...

Ceppi mutanti	Nessuna aggiunta	O-Acetil-omoserina	Cistationina	Omocisteina	Metionina
Selvatico	+	+	+	+	+
<i>met-5</i>	-	+	+	+	+
<i>met-3</i>	-	-	+	+	+
<i>met-2</i>	-	-	-	+	+
<i>met-8</i>	-	-	-	-	+

Controllo genetico degli enzimi

1942 Beadle e Tatum



Con esperimenti di questo tipo Beadle e Tatum proposero che uno specifico gene codificasse per un determinato enzima.

Ipotesi un gene- un enzima

Ora si sa che un enzima è spesso composto da più catene polipeptidiche quindi è meglio modificare l'asserzione di Beadle e Tatum in : **un gene- un polipeptide**

Deficienze enzimatiche a base genetica nell'uomo

Molte malattie di tipo genetico nell'uomo sono causate da una mutazione di un singolo gene.

Effetto **pleiotropico**

FENILCHEONURIA

frequenza di circa 1/12.000 nati

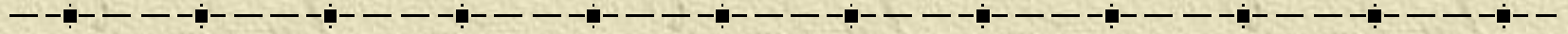
[OMIM 261600](#)

ALBINISMO

frequenza 1/33.000 tra i caucasici e 1/28.000 tra gli afroamericani degli Stati Uniti

[OMIM 203100](#)

Controllo genetico della struttura delle proteine



Tutti gli enzimi sono proteine ma non tutte le proteine sono enzimi.

I geni sono tra l'altro responsabili della struttura di proteine non enzimatiche.

Molto più facile studiarle perché sono normalmente in quantità maggiore.

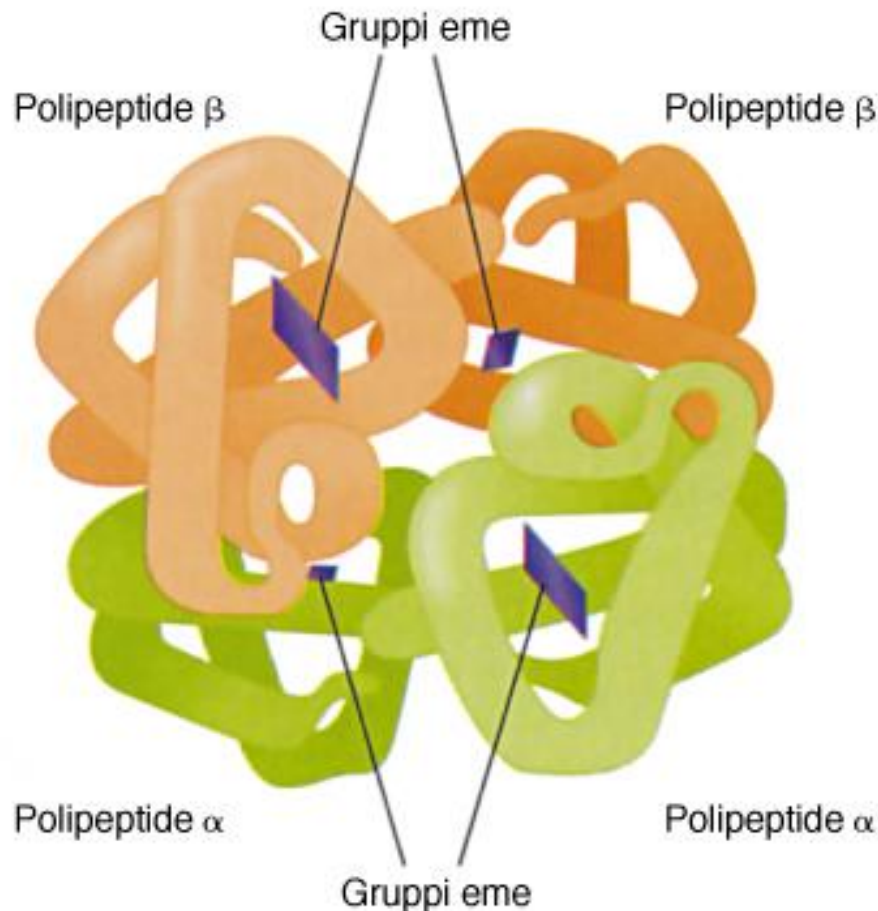
Anemia falciforme

Malattia genetica che altera l'emoglobina descritta per la prima volta da Herrick 1910.

Controllo genetico della struttura delle proteine. Anemia falciforme

Figura 4.8

La molecola dell'emoglobina. Il disegno mostra i due polipeptidi α e i due β , ciascuno associato con un gruppo eme.



Controllo genetico della struttura delle proteine. Anemia falciforme

Figura 4.6

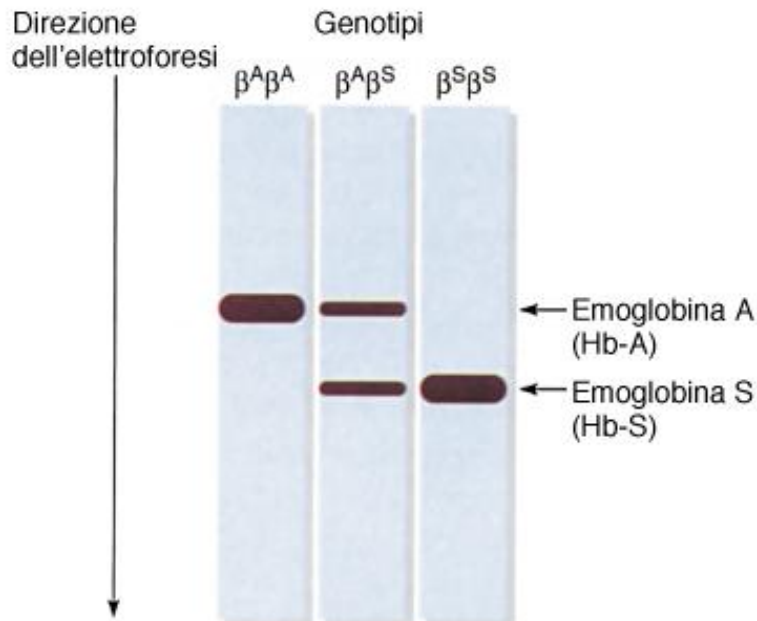
Fotografia al microscopio elettronico a scansione di un eritrocita normale (a sinistra) e falciforme (a destra).



Controllo genetico della struttura delle proteine. Anemia falciforme

Figura 4.7

Elettroforesi di varianti dell'emoglobina. Emoglobina di individui normali $\beta^A\beta^A$ (a sinistra), di individui $\beta^A\beta^S$ con tratti di anemia falciforme (al centro) e individui $\beta^S\beta^S$ affetti da anemia falciforme (a destra). I due tipi di emoglobina migrano in posizione diversa nel campo elettrico e quindi devono avere carica diversa.



1949 Pauling e collaboratori dimostrano che l'emoglobina dei malati era diversa in elettroforesi. Questa è una delle prime rigorose dimostrazioni che le proteine sono controllate da geni.

Controllo genetico della struttura delle proteine. Anemia falciforme

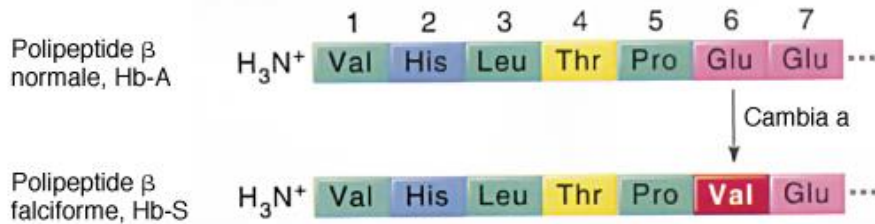
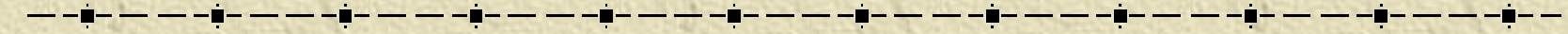


Figura 4.9

I primi sette aminoacidi N-terminali nei polipeptidi β dell'emoglobina normale e falciforme. Nel polipeptide dell'emoglobina falciforme, vi è una singola sostituzione da acido glutammico a valina dell'aminoacido in sesta posizione.

Nel 1956 Ingram analizzò le sequenze aminoacidiche dell'emoglobina Hb-A e Hb-S e trovò la mutazione

Glu(+)>Val

Controllo genetico della struttura delle proteine. Altre alterazioni dell'emoglobina

a) Catena a

	Posizione degli aminoacidi							
	1	2	16	30	57	58	68	141
Normale	Val	Leu	Lys	Glu	Gly	His	Asn	Arg
Varianti Hb:								
HbI	Val	Leu	Asp	Glu	Gly	His	Asn	Arg
Hb-G Honolulu	Val	Leu	Lys	Gln	Gly	His	Asn	Arg
Hb Norfolk	Val	Leu	Lys	Glu	Asp	His	Asn	Arg
Hb-M Boston	Val	Leu	Lys	Glu	Gly	Tyr	Asn	Arg
Hb-G Philadelphia	Val	Leu	Lys	Glu	Gly	His	Lys	Arg

b) Catena b

	Posizione degli aminoacidi									
	1	2	3	6	7	26	63	67	121	146
Normale	Val	His	Leu	Glu	Glu	Glu	His	Val	Glu	His
Varianti Hb:										
Hb-S	Val	His	Leu	Val	Glu	Glu	His	Val	Glu	His
Hb-C	Val	His	Leu	Lys	Glu	Glu	His	Val	Glu	His
Hb-G San Jose	Val	His	Leu	Glu	Gly	Glu	His	Val	Glu	His
Hb-E	Val	His	Leu	Glu	Glu	Lys	His	Val	Glu	His
Hb-M Saskatoon	Val	His	Leu	Glu	Glu	Glu	Tyr	Val	Glu	His
Hb Zurich	Val	His	Leu	Glu	Glu	Glu	Arg	Val	Glu	His
Hb-M Milwaukee-1	Val	His	Leu	Glu	Glu	Glu	His	Glu	Glu	His
Hb-D β Punjab	Val	His	Leu	Glu	Glu	Glu	His	Val	Gln	His

Figura 4.10

Esempi di sostituzioni aminoacidiche trovate in (a) polipeptidi a e (b) polipeptidi b di varianti di emoglobine umane.

Controllo genetico della struttura delle proteine. La fibrosi cistica

La fibrosi cistica è una malattia che causa disfunzioni al pancreas, ai polmoni e alla digestione dei bambini affetti.

Presenza di muco molto viscoso.

Aspettativa di vita 40 anni.

Estremamente frequente nei bianchi caucasici $1/2000$. Si stima che $1/23$ sia eterozigote.

Controllo genetico della struttura delle proteine. La fibrosi cistica

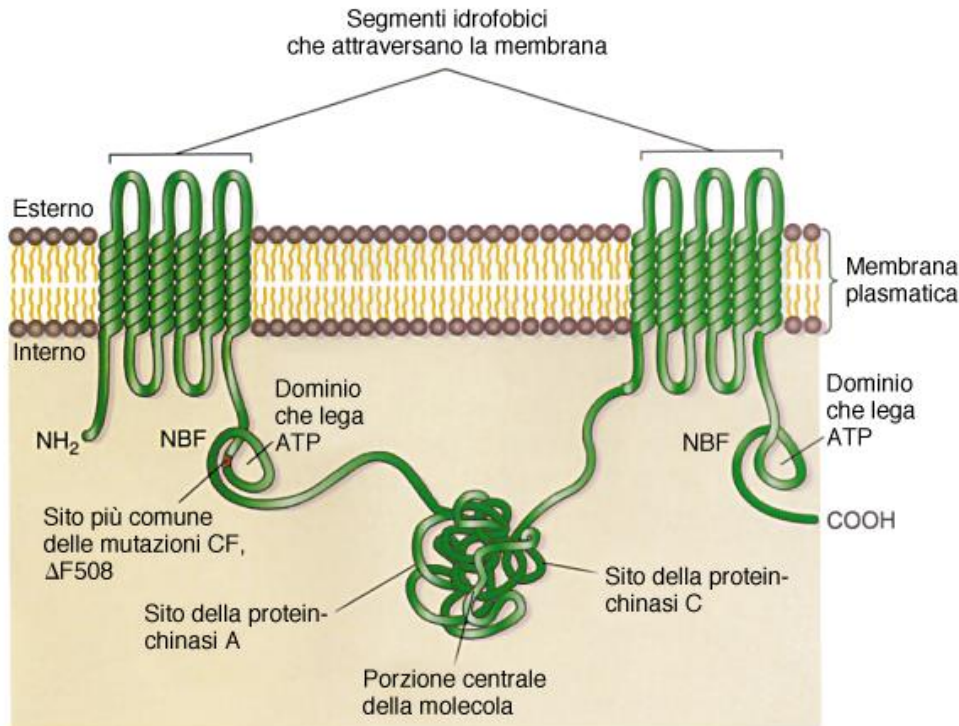


Figura 4.13

Struttura proposta per il regolatore del trasporto transmembrana (CFTR) della fibrosi cistica. La proteina ha due segmenti idrofobici che attraversano la membrana e dopo ciascun segmento vi è una regione nucleotide-binding fold (NBF) che lega ATP. La posizione della delezione di aminoacido, causata dalla delezione di tre coppie di basi, trovata più frequentemente in pazienti affetti da forma grave di CF, si trova nel primo (relativamente all'estremità aminica) NBF; questa è la mutazione $\Delta F508$. La porzione centrale della molecola contiene siti che possono essere fosforilati dagli enzimi protein-chinasi A e protein-chinasi C.

Consulenza genetica

La consulenza genetica comincia con l'analisi dell'albero genealogico delle famiglie.

Identificazione dei portatori

Individua persone eterozigoti per una mutazione recessiva.

Analisi enzimatica o controllo della proteina.

Analisi sul DNA.

Analisi fetale

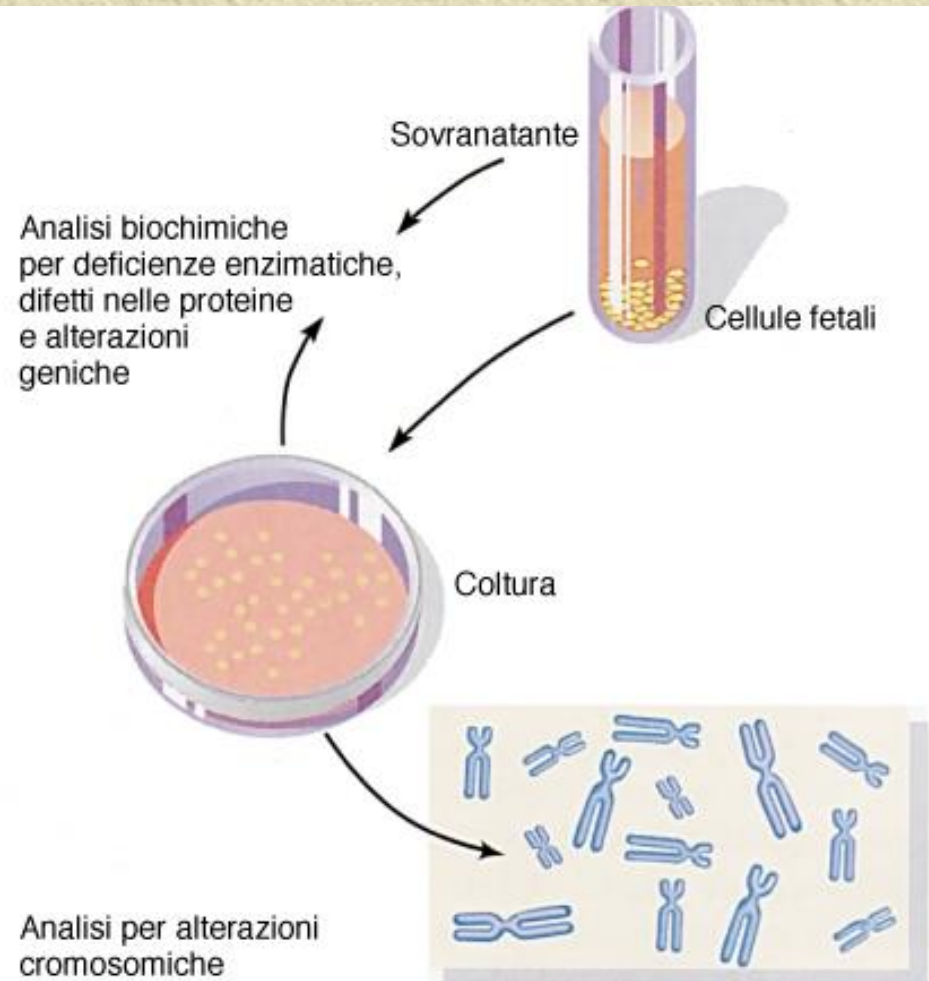
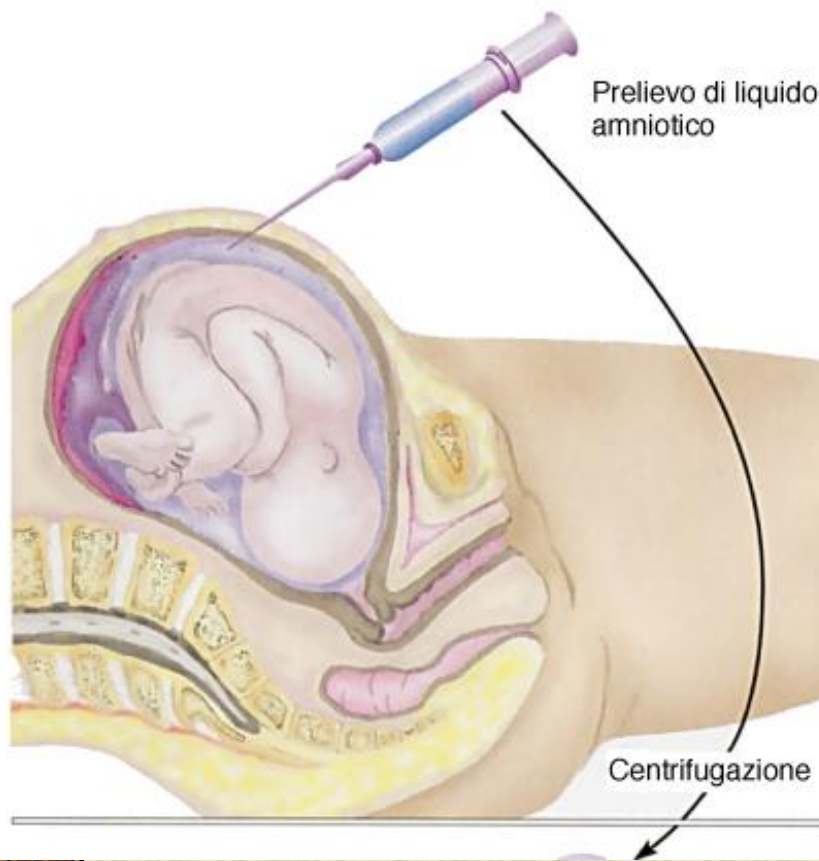
verifica della normalità del feto.

Amniocentesi e villi coriali

Consulenza genetica

Figura 4.14

Amniocentesi, una procedura utilizzata per la diagnosi prenatale dei difetti genetici.



Consulenza genetica

Figura 4.15

Analisi dei villi coriali, una procedura utilizzata per la diagnosi prenatale dei difetti genetici.

