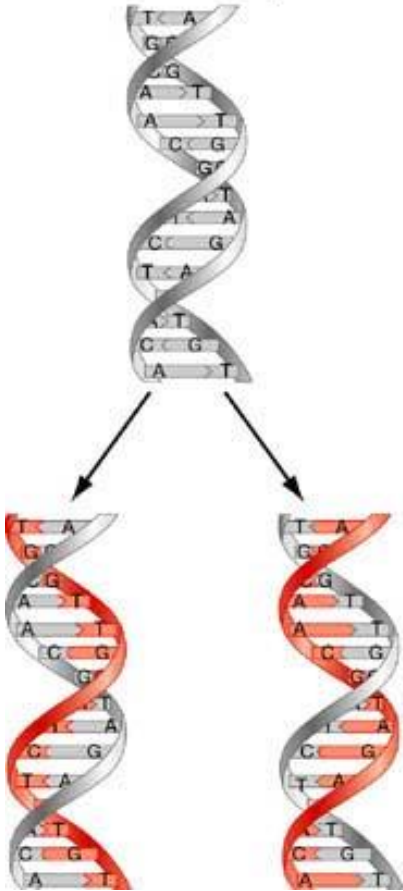


La replicazione del DNA

Come l'informazione genetica
perpetua se stessa

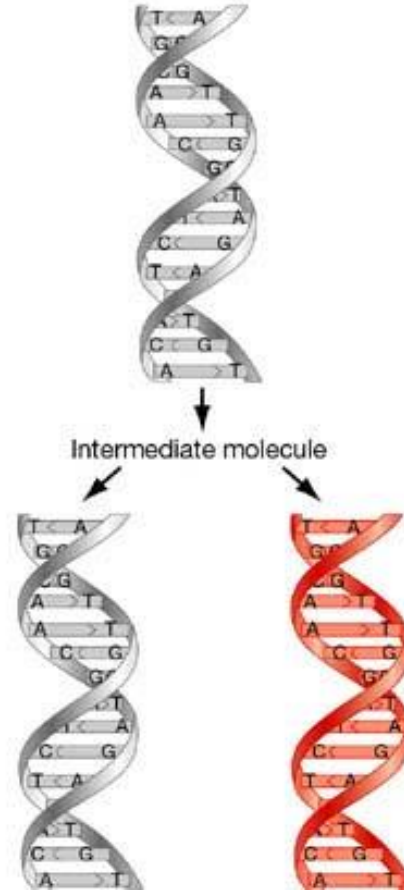
(a) Hypothesis 1:

Semi-conservative replication



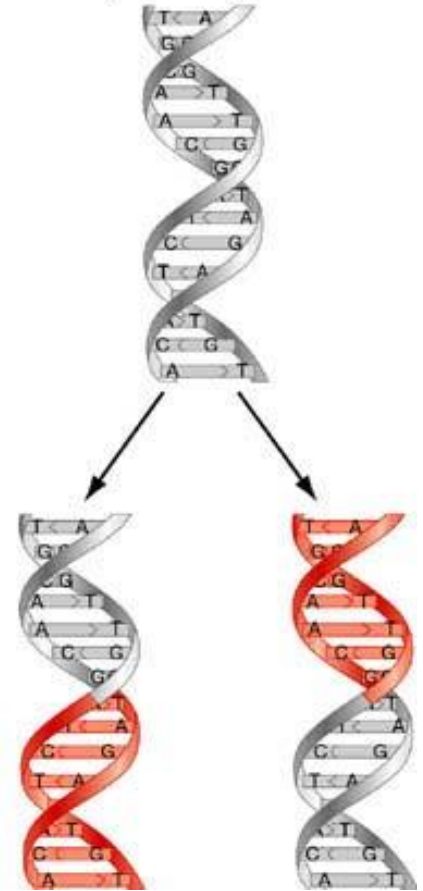
(b) Hypothesis 2:

Conservative replication



(c) Hypothesis 3:

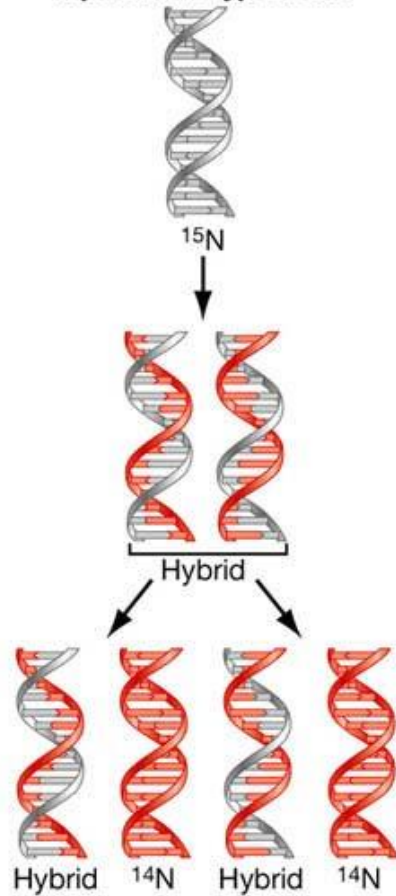
Dispersive replication



Tre ipotesi sull'esito del processo replicativo del DNA

(b) Predictions

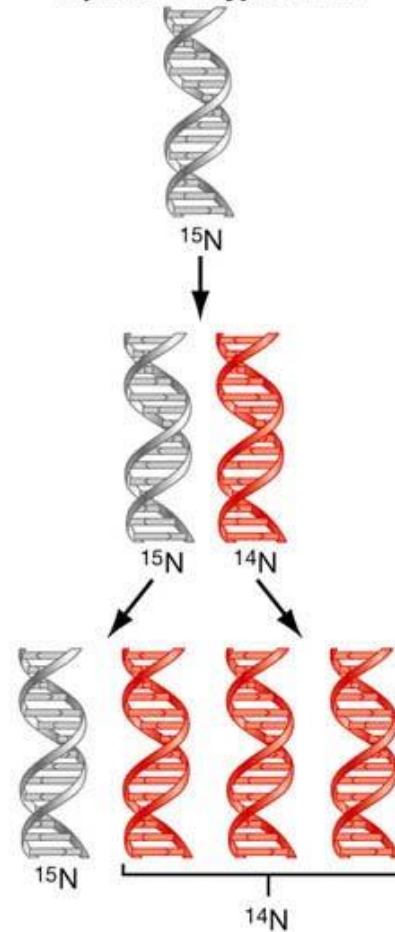
Semi-conservative replication hypothesis



After 2 generations:
1/2 intermediate density DNA
1/2 low density DNA

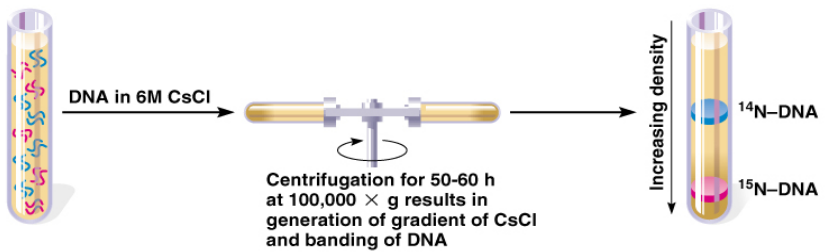
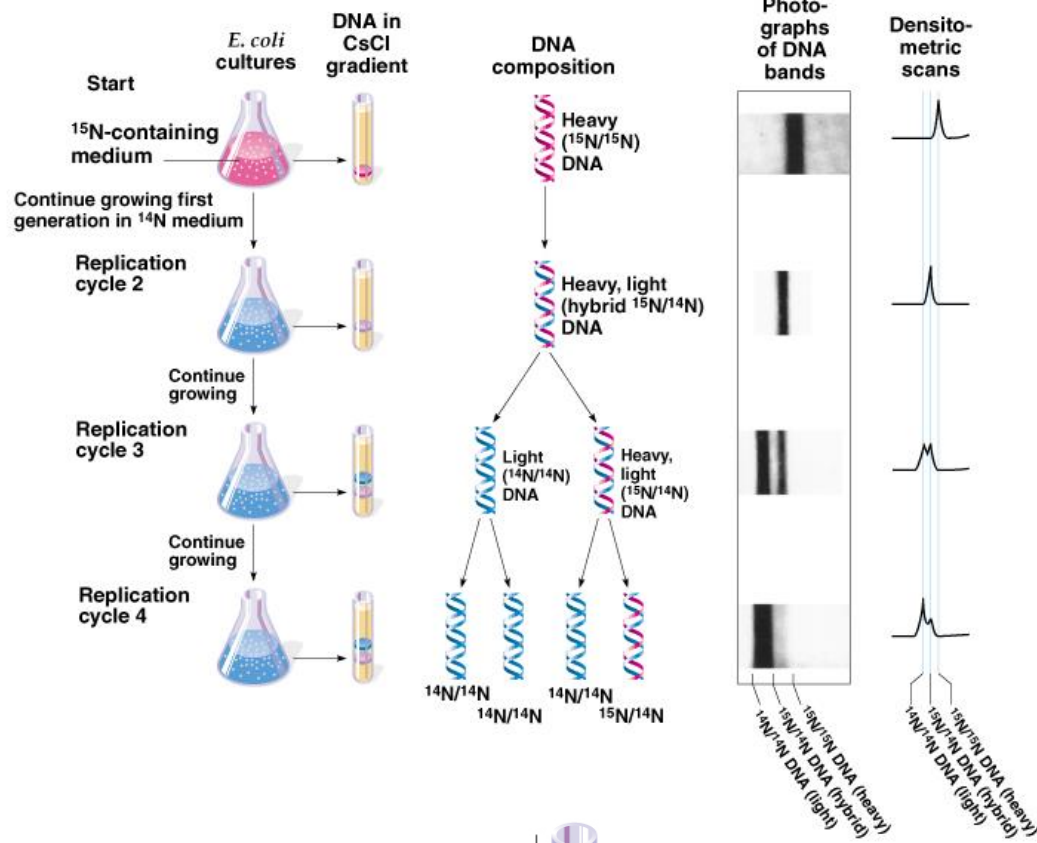
✓ Hypothesis supported

Conservative replication hypothesis



After 2 generations:
1/4 high density DNA
3/4 low density DNA

✗ Hypothesis rejected



La replicazione del DNA

La struttura a doppia elica, con 2 filamenti complementari, suggerisce lo schema di replicazione del DNA: ogni filamento può fungere da stampo per l'altro, come dimostrato dall'esperimento di Meselson-Stahl.

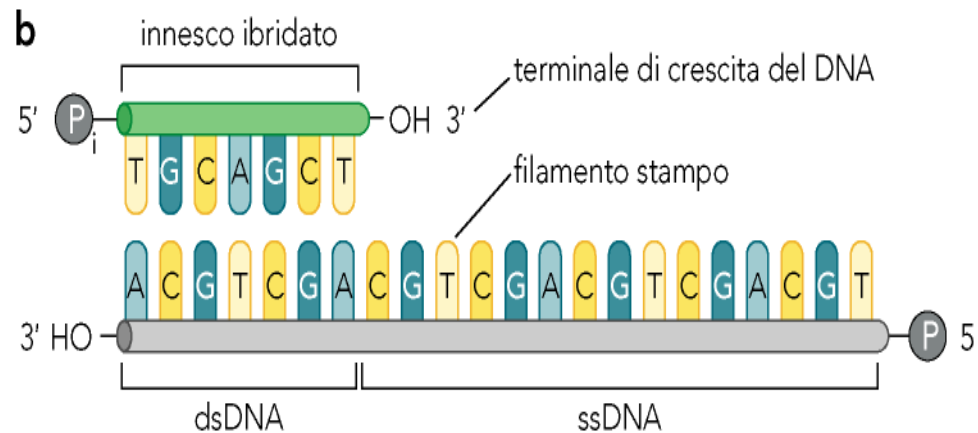
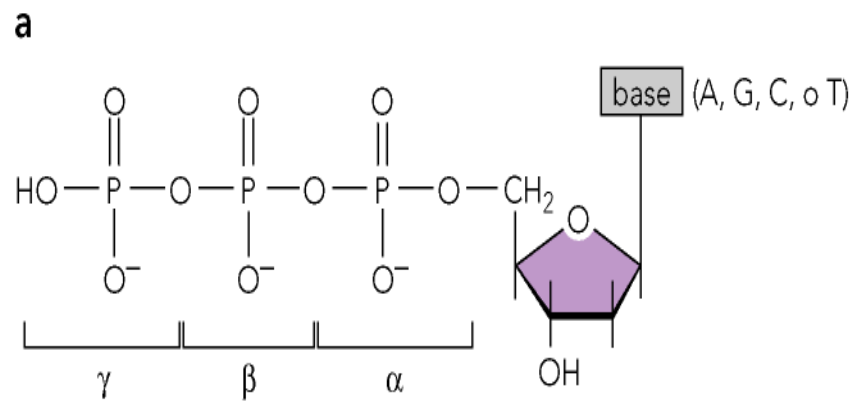
Con quale meccanismo molecolare ciò avvenga è stato ed è oggetto di intense indagini.

Oggi sappiamo molto del processo: coinvolge molte attività enzimatiche, ma non è ancora del tutto chiarito, soprattutto negli eucarioti.

Cominciamo con la chimica della sintesi del DNA e le funzioni enzimatiche, poi vedremo i problemi connessi con la sintesi alla forcella replicativa, infine l'inizio e la terminazione.

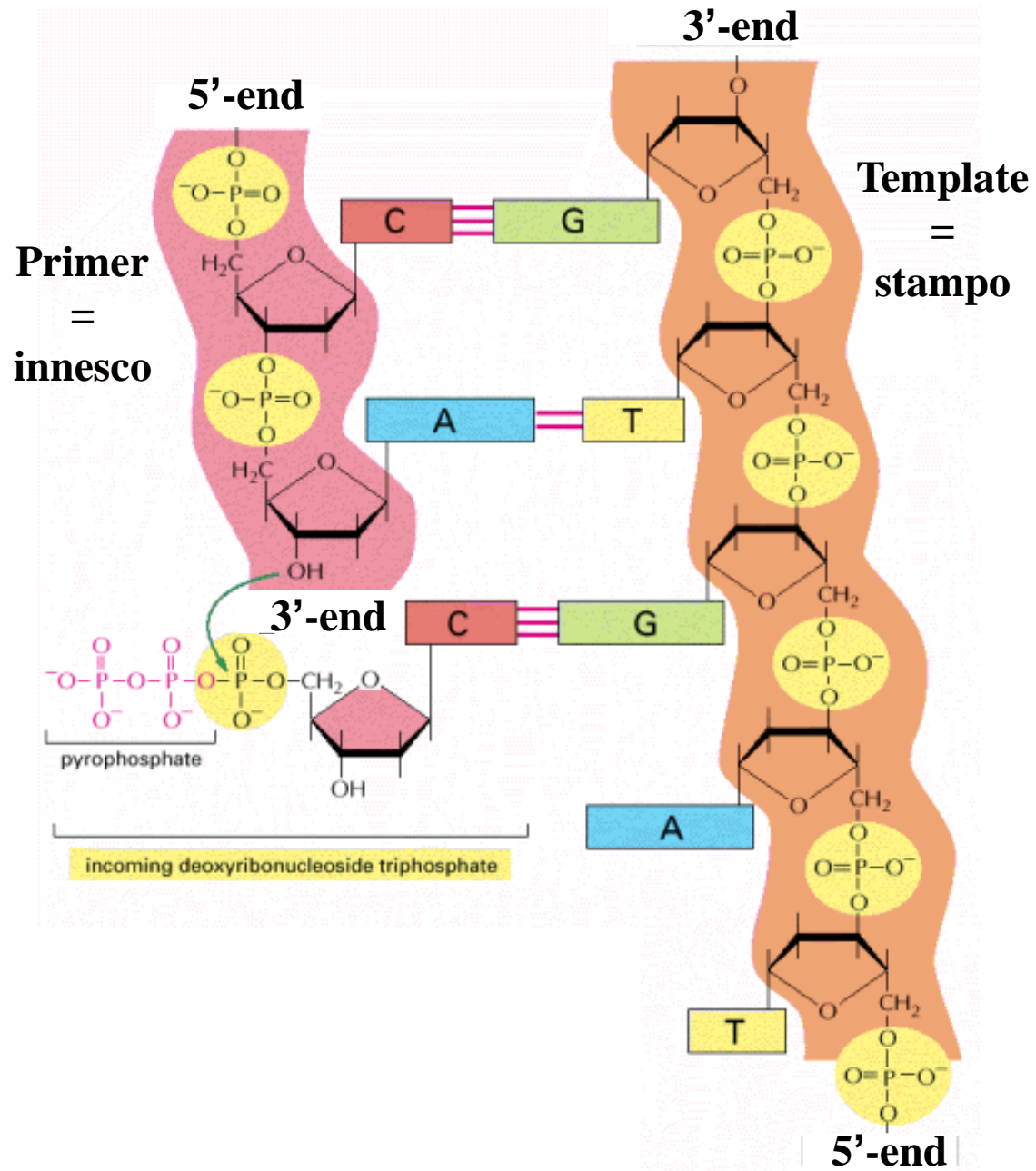
In tutte le cellule la replicazione è sotto stretto controllo, in particolare l'inizio.

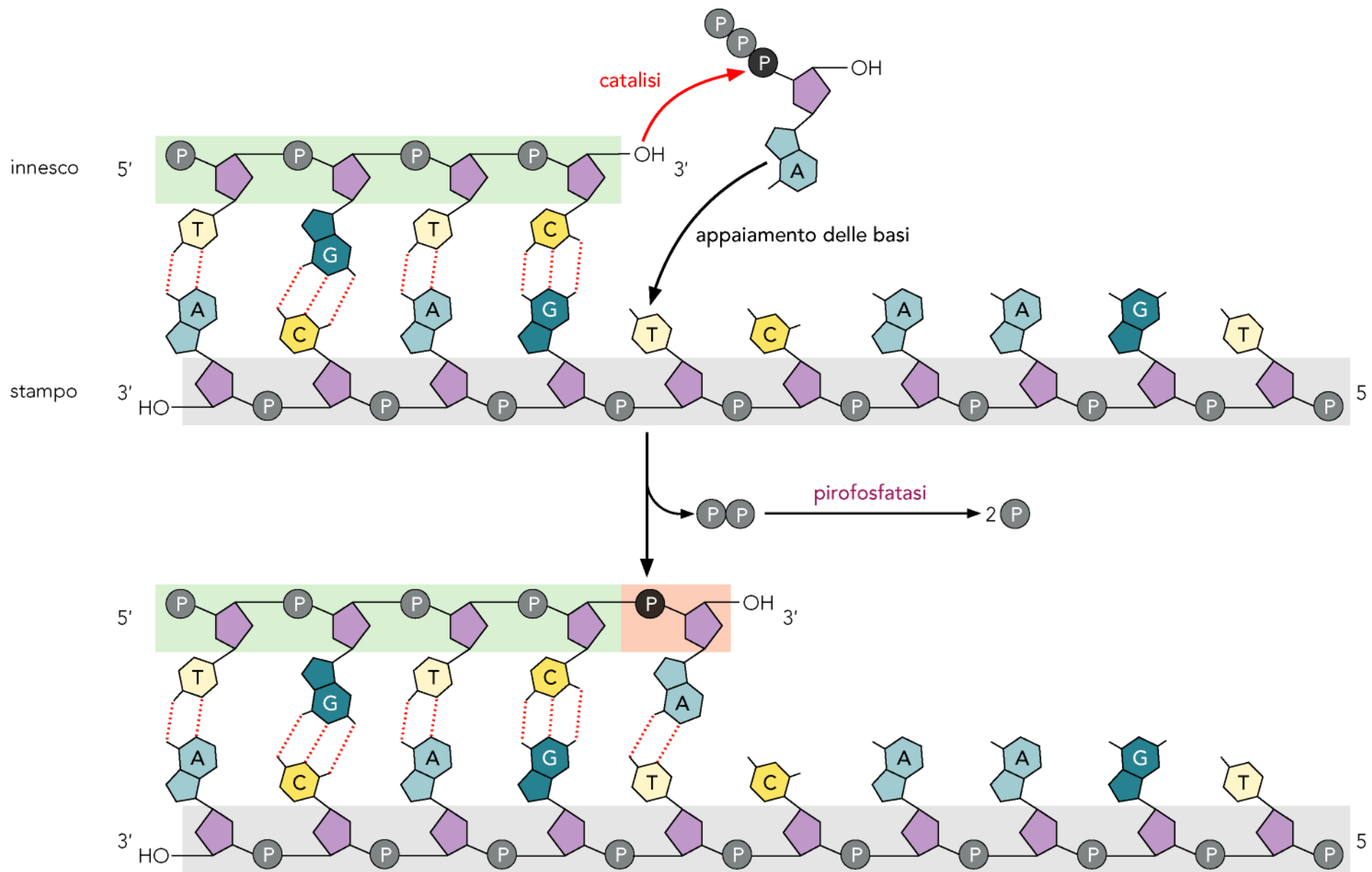
L'azione coordinata di tutte queste proteine permette l'attuarsi di questo processo con velocità appropriata, accuratezza e completezza.



Chimica della sintesi del DNA

Sono richiesti a) i 4 dNTP e b) un complesso innesco-stampo. L'innesco deve essere a doppia elica, avere un 3'-OH libero, per l'aggiunta dei deossi-nucleotidi complementari in direzione 3', ed essere molto più corto dello stampo a singolo filamento.





L'idrolisi del pirofosfato è il motore della sintesi

La reazione di sintesi è indicata come: $XTP + (XMP)_n \rightarrow (XMP)_{n+1} + PP$.
 $\Delta G^\circ = -3.5$ Kcal/mole (modesta entità).

Altrettanta energia viene fornita dall'idrolisi del P-P: $P-P \rightarrow 2$
Pi.

La reazione complessiva allora è:

$XTP + (XMP)_n \rightarrow (XMP)_{n+1} + 2$ Pi . ΔG° tot = -7 Kcal/mole, pari a
 $K_{eq} \approx 10^5$ (**sostanzialmente irreversibile**).

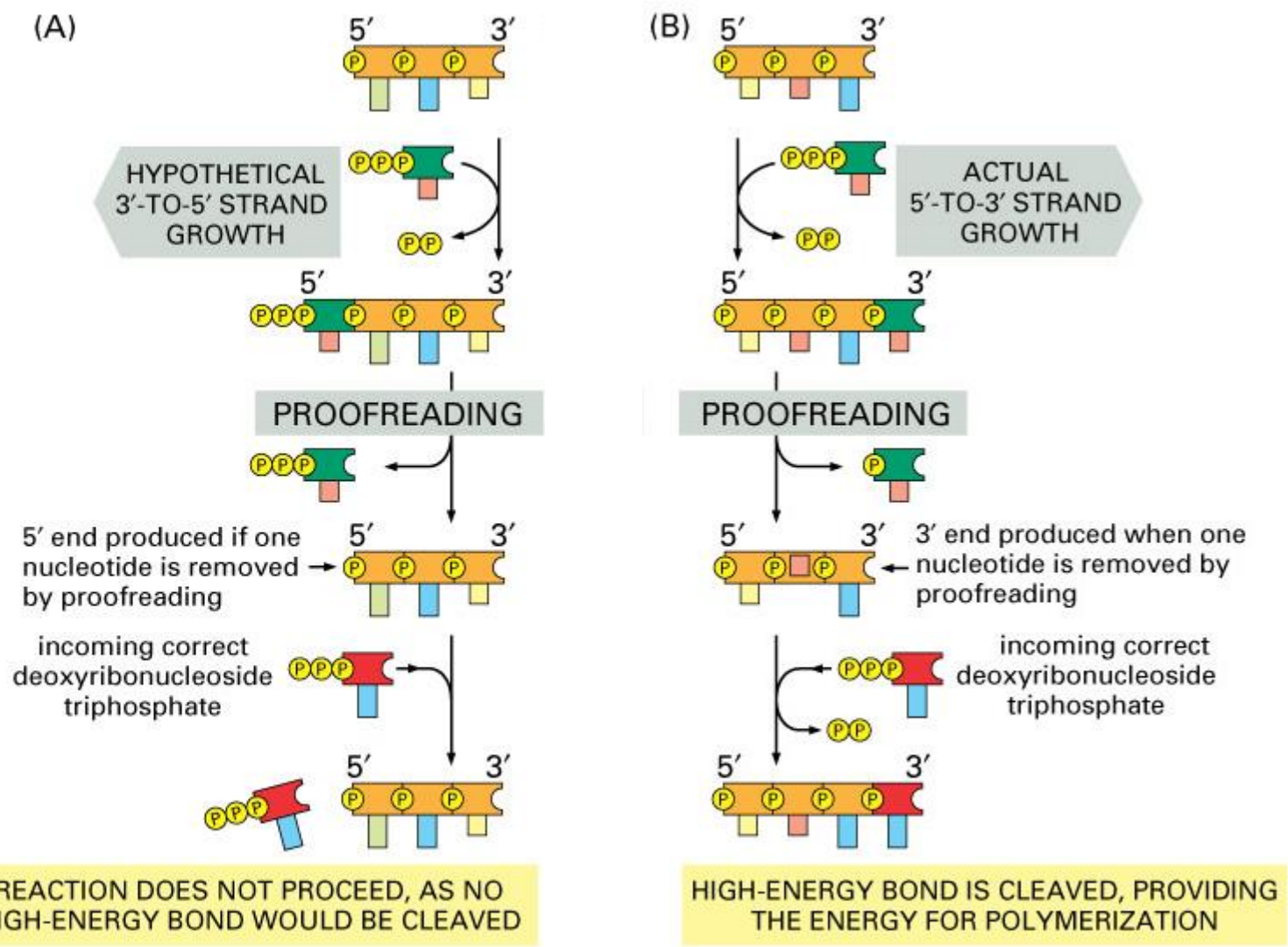
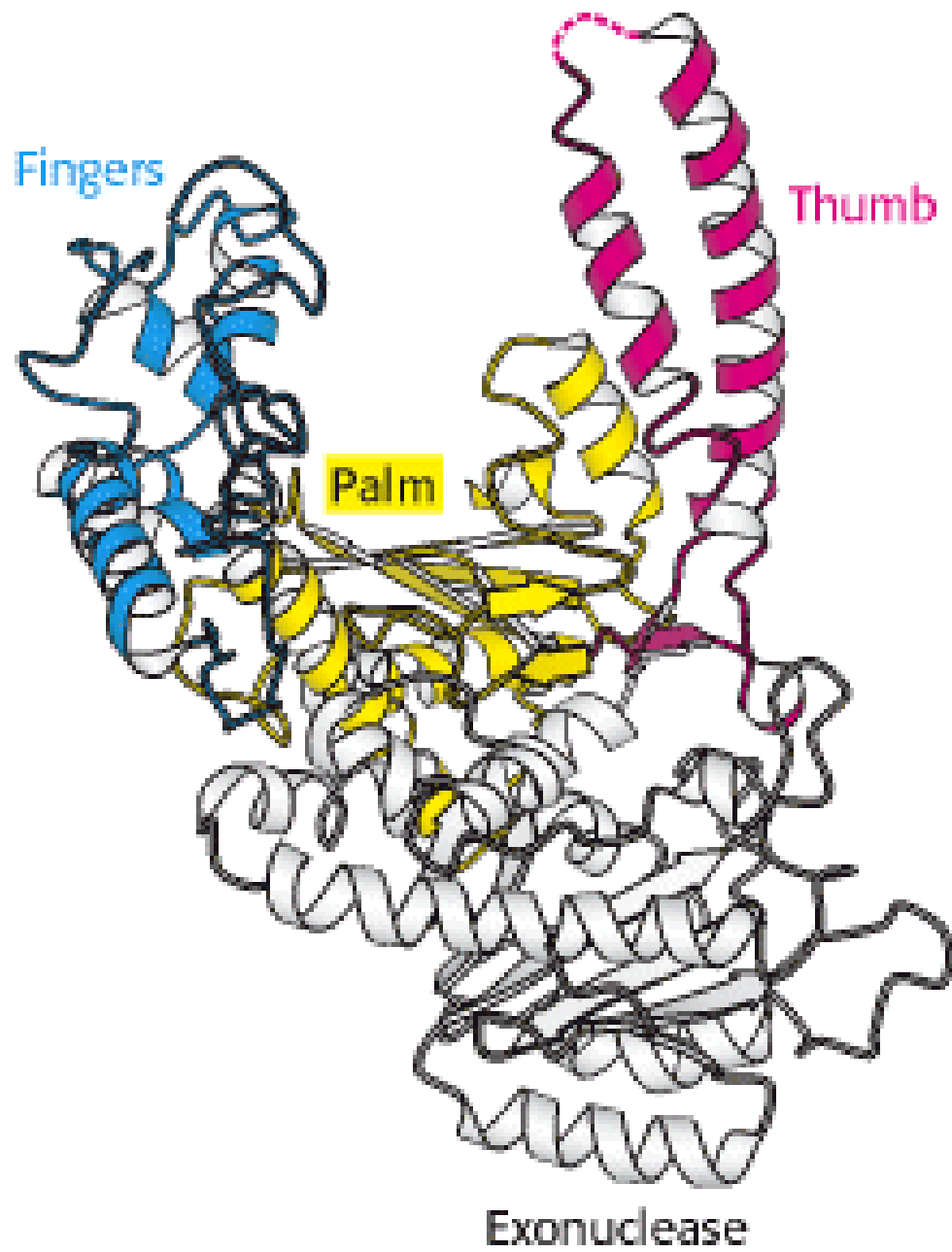
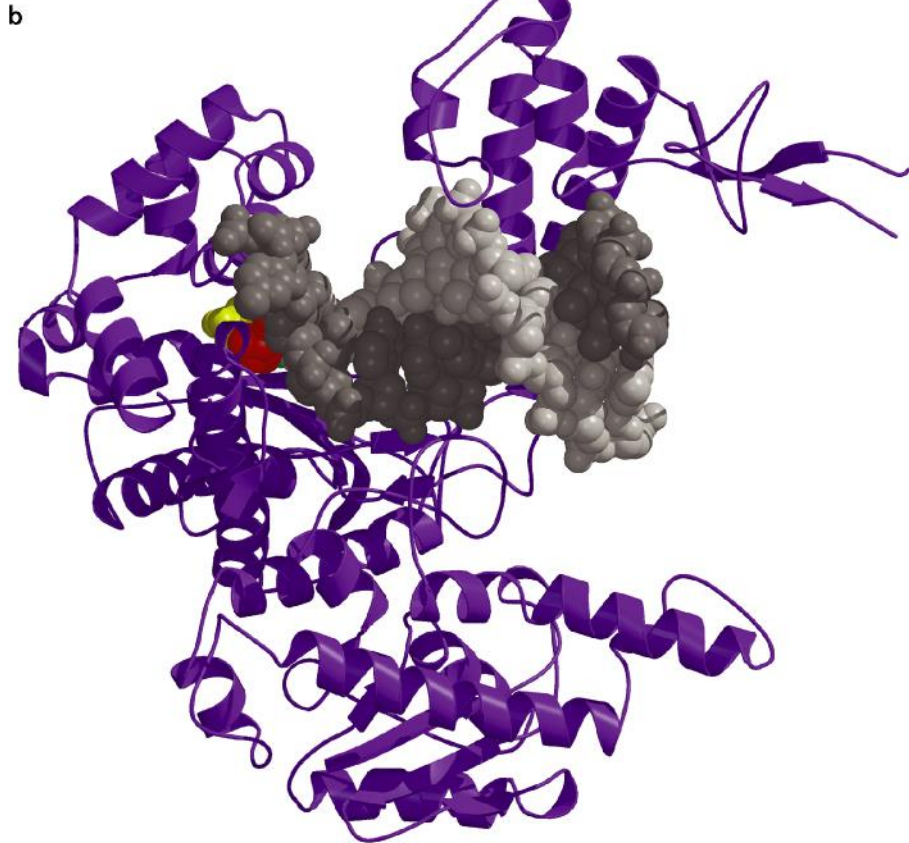
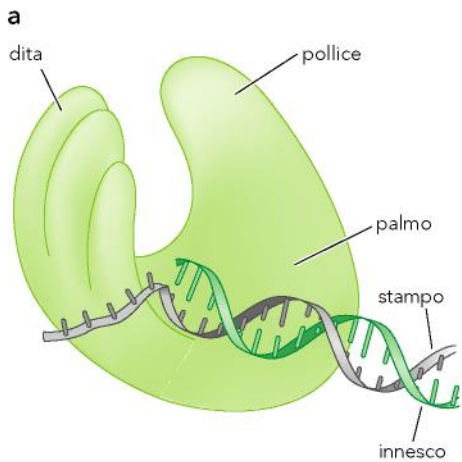


Figure 6-15 Essential Cell Biology, 2/e. (© 2004 Garland Science)

La DNA polimerasi sintetizza il DNA utilizzando un solo sito attivo per i 4 diversi dNTP: conta solo la geometria delle coppie di basi, identica per AT e GC (stesso ingombro sterico), per la formazione del legame fosfodiesterico. Basi non corrette vengono incorporate ad una velocità 10.000 volte minore (SELETTIVITÀ CINETICA).





Struttura 3D della DNA polimerasi

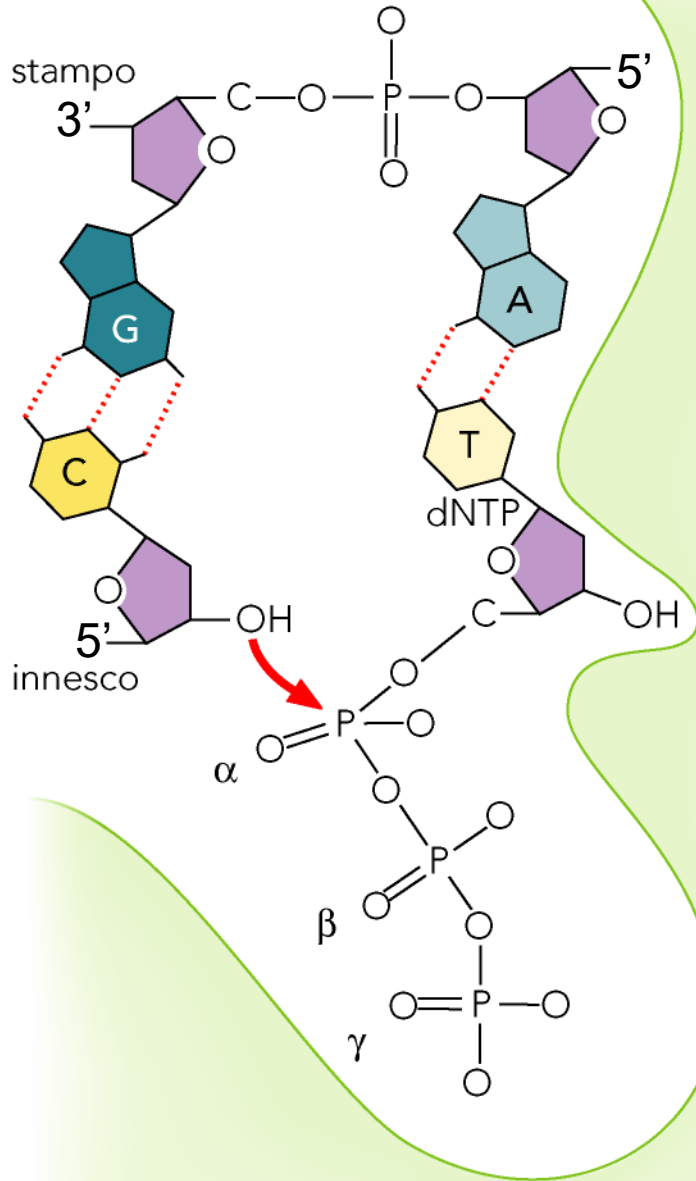
Permette di capire dove e come avviene la sintesi di DNA.

a) L'enzima, formata da 3 domini, assomiglia ad una mano destra: pollice, dita e palmo.

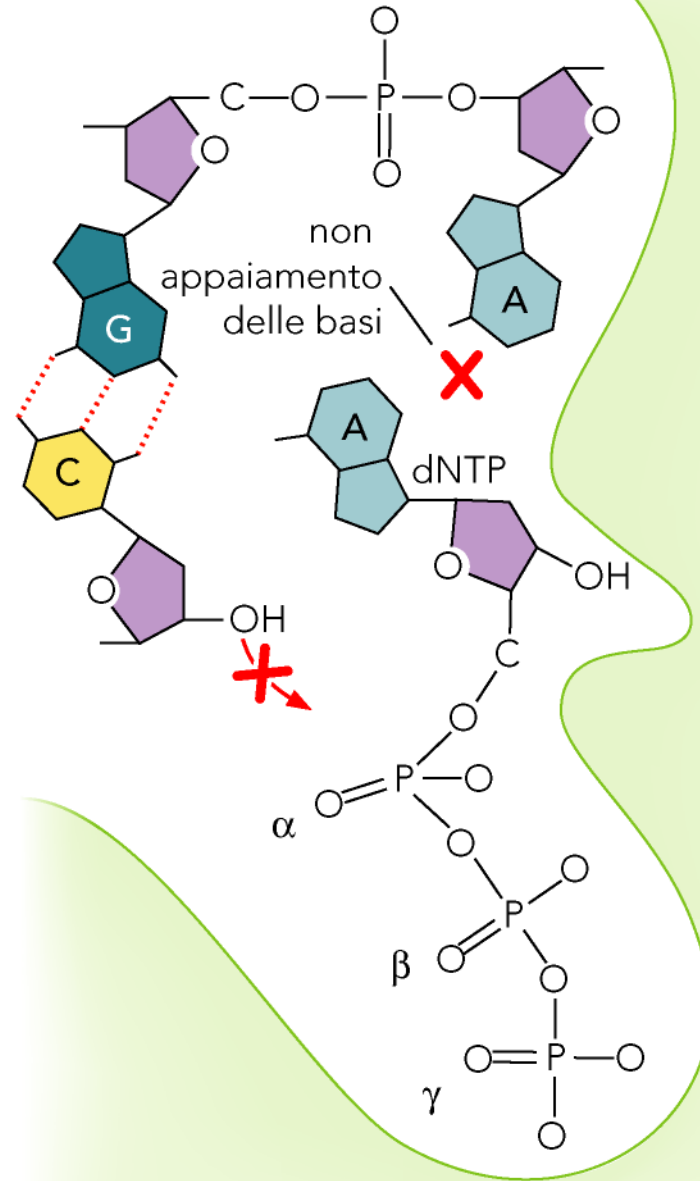
b) Il palmo contiene il **sito catalitico**, ed è quindi associato al neo-DNA, mentre lo stampo a singolo filamento viene piegato in modo da non passare fra pollice e dita.

Struttura 3D della DNA polimerasi del fago T7 legata al DNA (in rosso e giallo il dNTP entrante).

a appaiamento corretto



b appaiamento scorretto

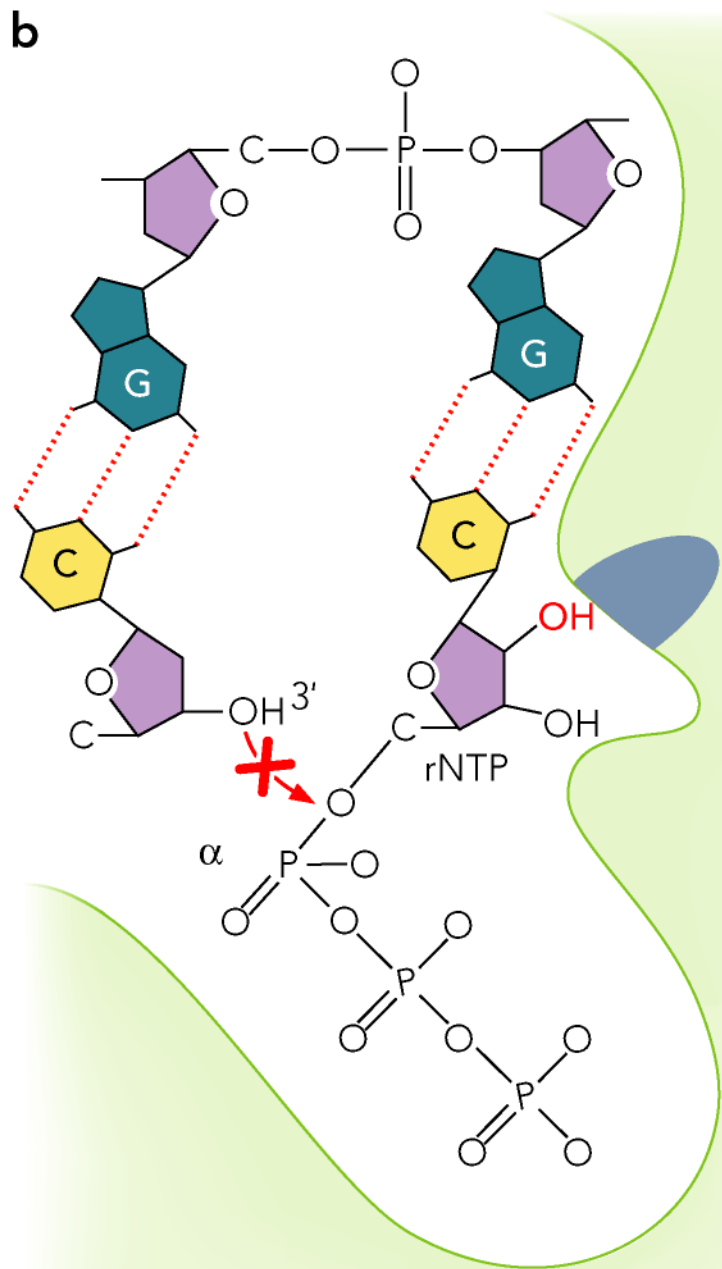
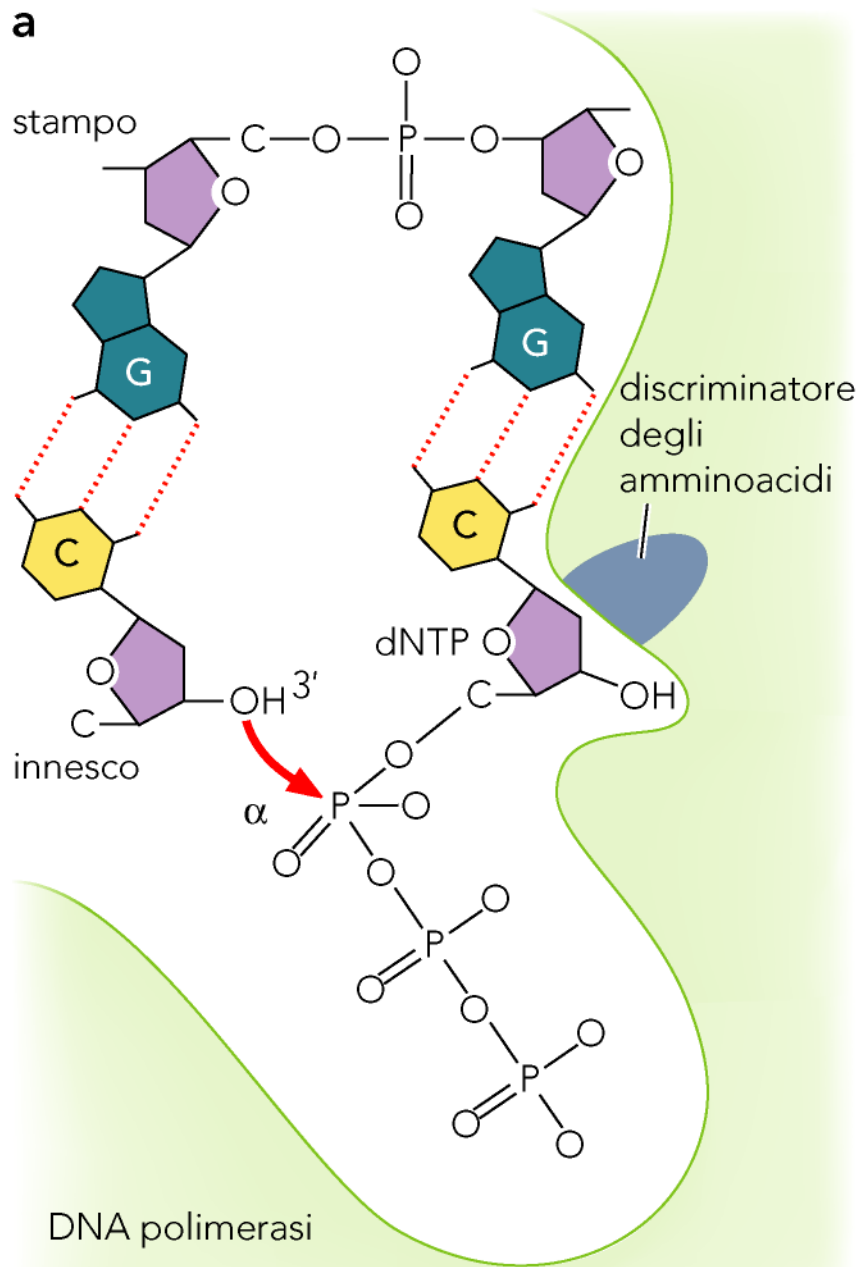


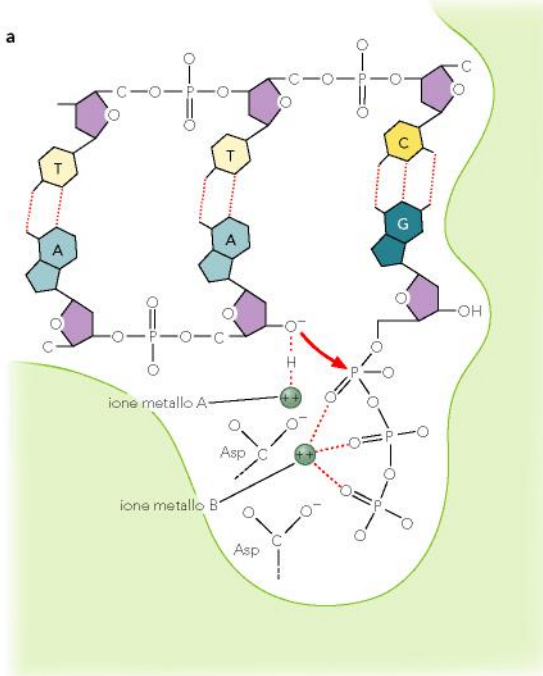
Discriminazione dei rNTP da parte della DNA polimerasi

Sebbene 10 volte più concentrati dei dNTP, i rNTP vengono incorporati a velocità 1000 volte minore.

Motivo: il sito attivo della DNA Pol è troppo piccolo per accogliere il 2'-OH.

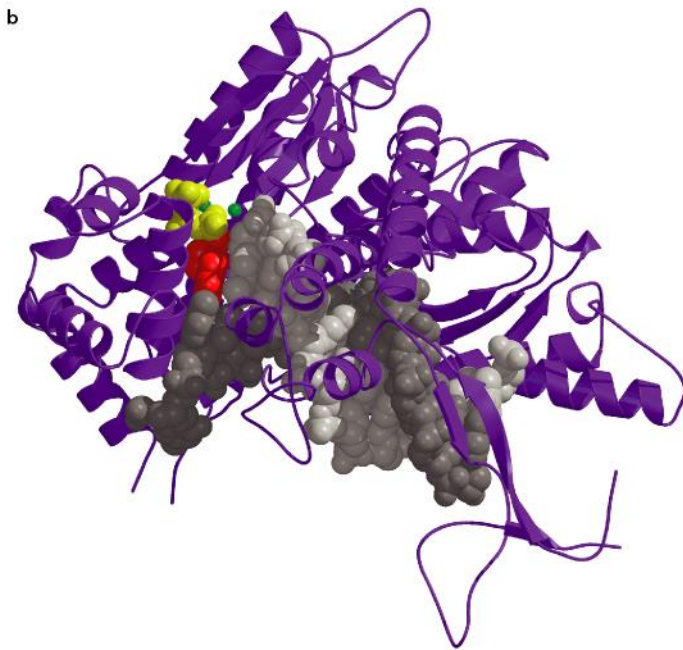
Due amminoacidi discriminatori interagiscono con lo zucchero: se uno dei due **muta** in uno amminoacido più piccolo, DNA Pol riduce fortemente la sua capacità discriminatoria nei confronti dei rNTP.





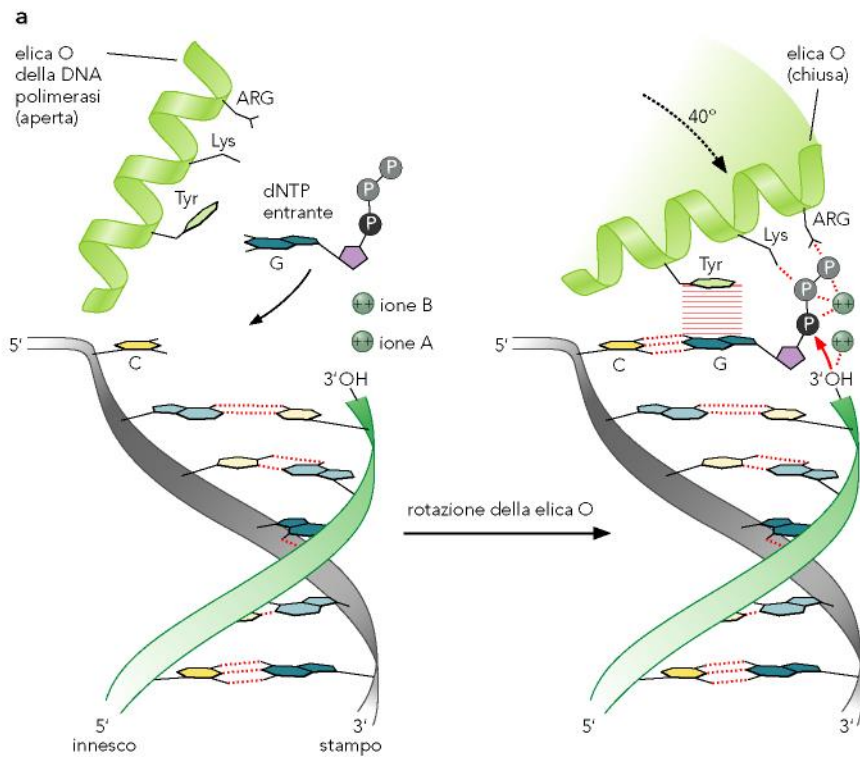
Durante la sintesi vengono legati 2 ioni metallici

Due ioni bivalenti (Mg^{2+} o Zn^{2+}) sono legati nel sito catalitico: uno dissocia il protone dal 3'-OH dell'ultimo dd-ribosio, favorendo l'attacco nucleofilo dell'O- sul $P\alpha$ del dNTP entrante, l'altro si coordina ai 3 O del gruppo trifosfato e stabilizza il pirofosfato.



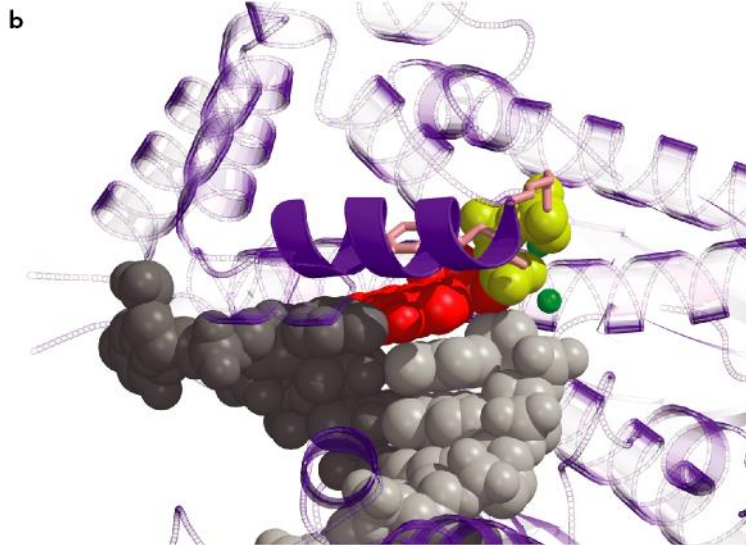
Struttura 3D della DNA Pol del fago T7 (in verde gli ioni metallici).

I contatti fra DNA Pol e DNA sono principalmente nel solco minore e indipendenti dalla natura delle basi.



Cambiamenti conformazionali della DNA polimerasi durante la catalisi

Alcuni residui delle dita si spostano quando si lega il substrato, facilitando l'avvicinamento del gruppo trifosfato agli ioni metallici e quindi l'incorporazione del substrato.



Interazione dello stampo con la DNA polimerasi

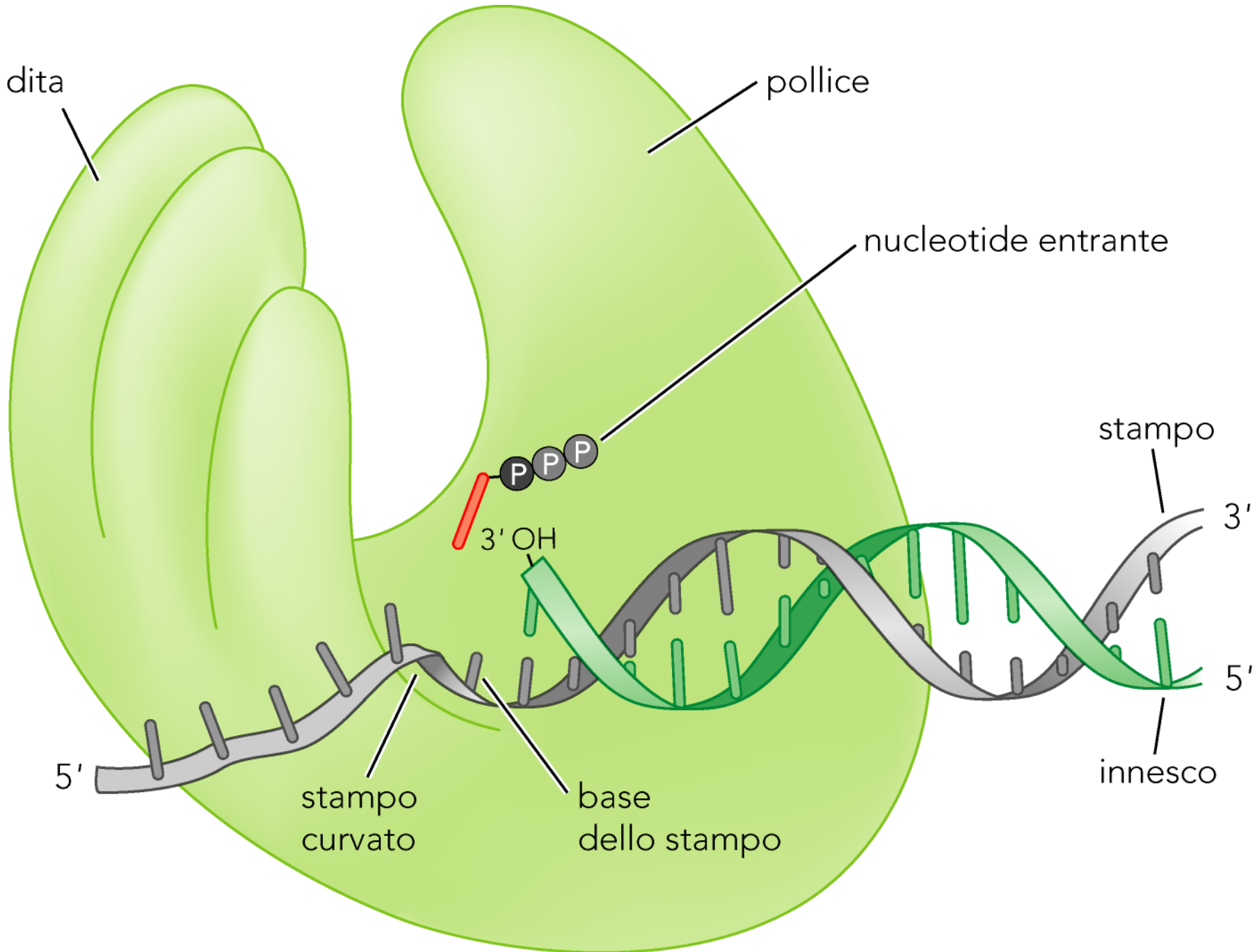
Le dita entrano in contatto con lo stampo, piegando di 90° il legame fosfodiesterico posto subito prima del sito catalitico, in modo da esporre solo la prima base dello stampo nel sito attivo.

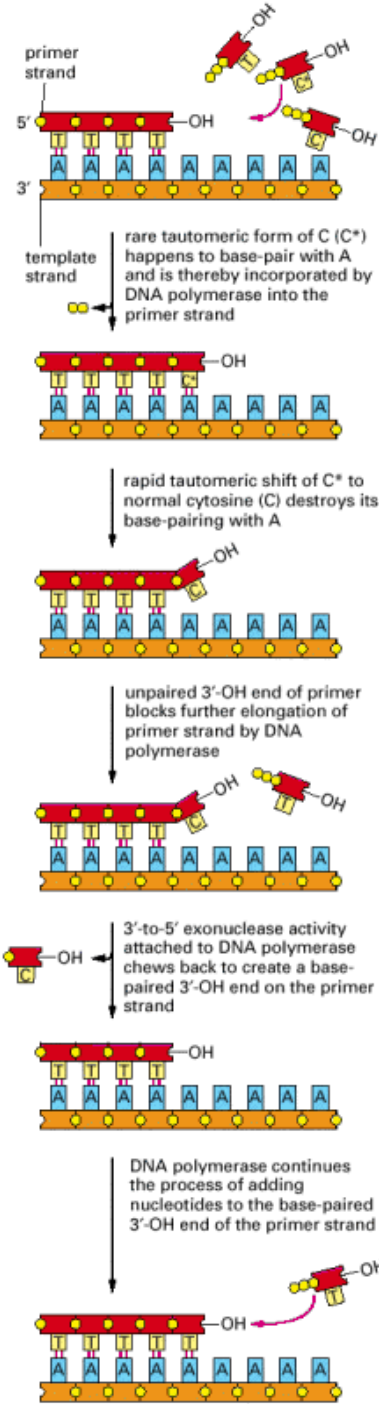
Il pollice non è coinvolto nella catalisi, ma interagisce col neo-DNA, mantenendo l'innesco in posizione.

Riassunto degli eventi ordinati che avvengono ogni volta che la DNA Pol aggiunge una base all'innesco:

- a) formazione di una coppia di basi complementari,
- b) chiusura delle dita attorno alla coppia,
- c) posizionamento ottimale degli ioni metallici per catalizzare la formazione del legame fosfodiesterico,
- d) apertura delle dita e spostamento del complesso in avanti di una bp.

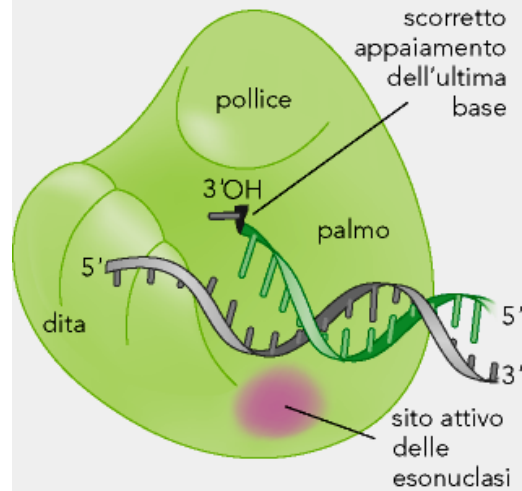
Ogni movimento è fortemente stimolato dal corretto appaiamento delle basi.



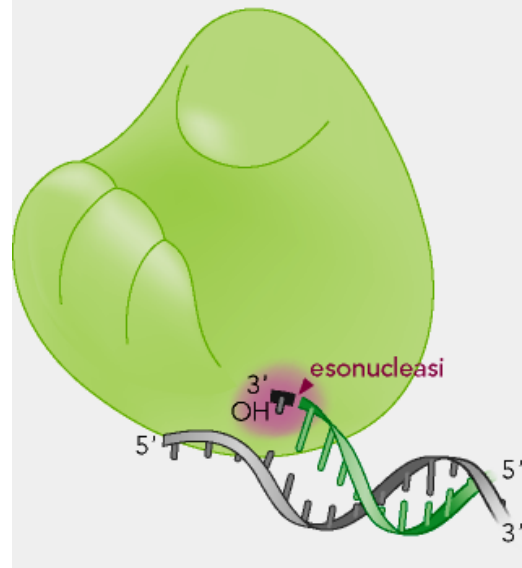


L'attività esonucleolitica (3'- 5') e la correzione delle bozze

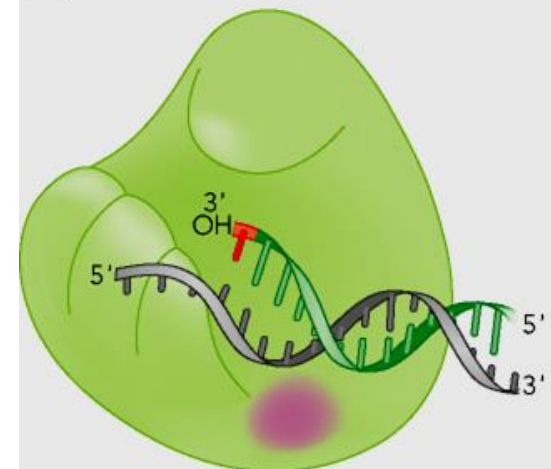
a sintesi del DNA lenta o assente



b rimozione dei nucleotidi non complementari



c ripristino della normale attività di sintesi



Quando un nucleotide non corretto viene incorporato nel DNA

-vengono ridotte la velocità di sintesi e l'affinità per il 3'OH in crescita.

-aumenta l'affinità per l'attività esonucleasica

Di conseguenza viene rimosso il nucleotide non correttamente appaiato.

In seguito alla rimozione si ripristinano le affinità iniziali per i due diversi siti (catalitico/esonucleasico)

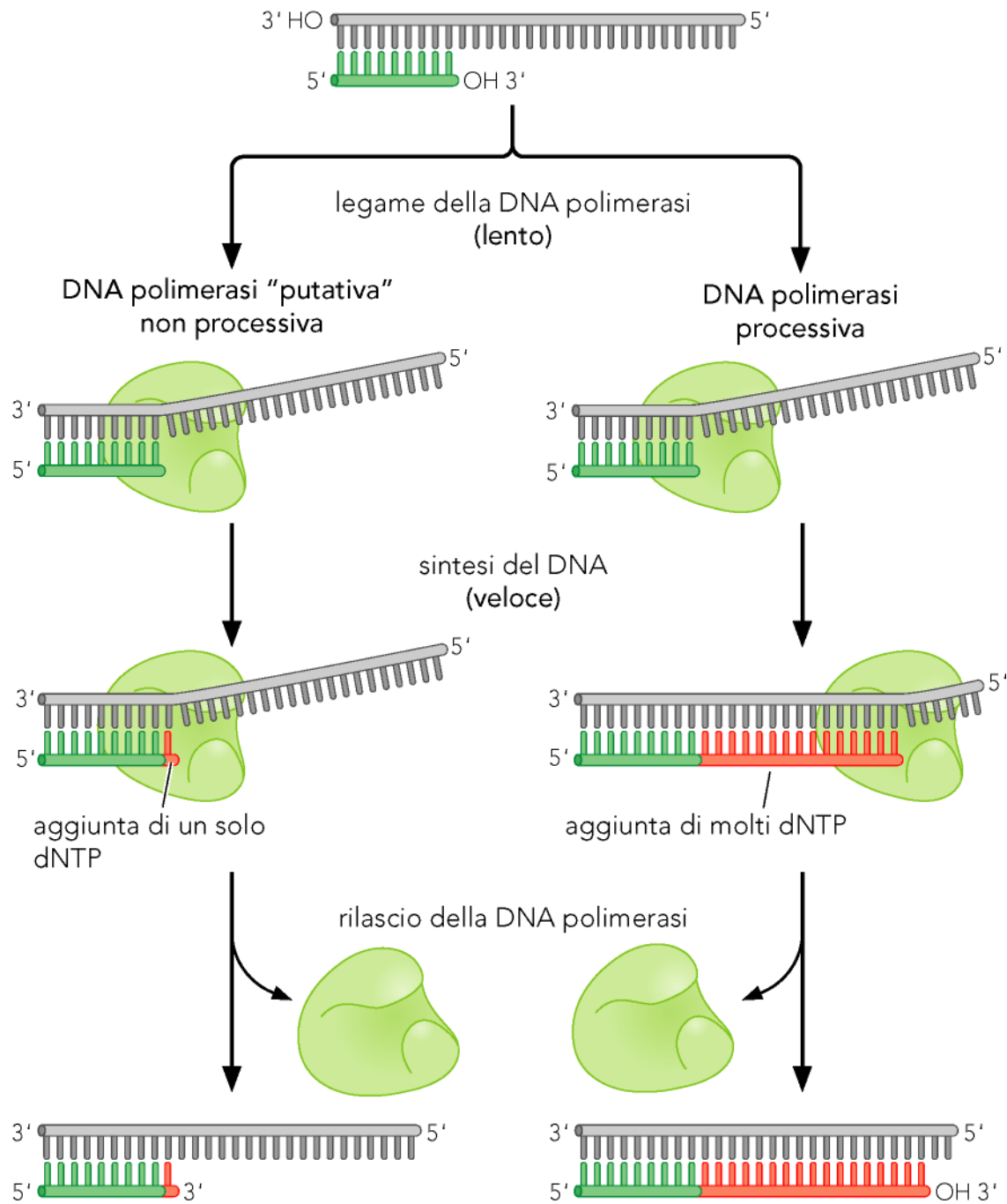
La DNA polimerasi è un enzima processivo

La catalisi è un evento rapido: 1000 basi /s nei batteri. Dipende dall'alta processività dell'enzima che corrisponde al numero di basi aggiunte al secondo.

Il valore di questo parametro varia da poche basi a > 50000 , a seconda della DNA polimerasi. Non dipende dalla **velocità di sintesi**, che è **sempre la stessa (1 base/ms)**, ma dalla diversa probabilità di distacco della DNA Pol dallo stampo, in quanto la velocità di (ri) complessazione è il passaggio più lento (1 / s).

La elevata processività dipende dalla facilità di scorrimento della DNA polimerasi sul DNA, che avviene in modo sequenza-indipendente, grazie alle interazioni elettrostatiche fosfati-pollice e solco minore- palmo.

L'incorporazione di una base provoca un parziale rilascio dell'enzima (rottura dei legami a H nel solco minore), che permette un rapido avanzamento di una bp. La processività è fortemente aumentata dall'interazione fra la DNA Pol e una proteina a forma di anello, che circonda il DNA durante la sintesi.



La forcella replicativa

Nella cellula i 2 neo-filamenti vengono replicati contemporaneamente, perché i filamenti parentali vengono separati in modo che ognuno funga da stampo.

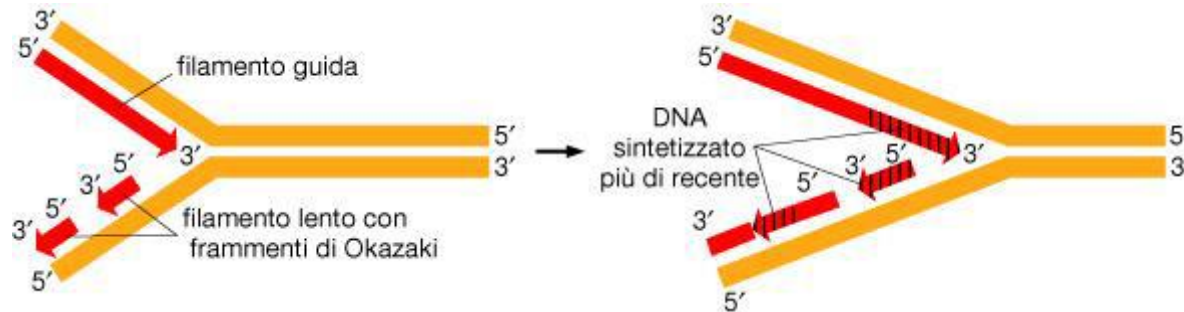
La zona di separazione, dove avviene la sintesi dei 2 nuovi filamenti, è detta forcella replicativa (RF). La RF si sposta continuamente verso il DNA non ancora srotolato, assieme ai filamenti separati che fungeranno da stampo.

L'antiparallelismo della doppia elica complica la replicazione simultanea dei due filamenti, poiché la DNA Pol può sintetizzare solo in direzione 5'-3': solo uno dei 2 filamenti stampo può essere copiato in modo continuo, in direzione di apertura della forcella, ed è detto filamento guida o continuo (leading strand).

Anche l'altro filamento deve essere sintetizzato dalla DNA Pol in direzione 5'-3', cioè in direzione opposta a quella di apertura della forcella, quindi in modo discontinuo. E' detto filamento lento o ritardato (lagging strand), perché la DNA Pol deve disporre di una certa quantità di stampo prima di iniziarne la sintesi.

La Duplicazione del filamento che ha direzione 3'-5' è continua

La Duplicazione del filamento che ha direzione 5'-3' è discontinua



Dove la sintesi è discontinua vengono prodotti brevi tratti di DNA chiamati frammenti di Okazaki

Sintesi del filamento discontinuo

La sintesi di un frammento discontinuo dura fino al terminale 5' del frammento precedente. Questi frammenti, detti frammenti di Okazaki, variano come lunghezza fra 1000 e 2000 basi nei batteri e fra 100 e 400 basi negli eucarioti. Subito dopo la loro sintesi vengono uniti covalentemente in un filamento continuo, quindi sono degli intermedi di replicazione.

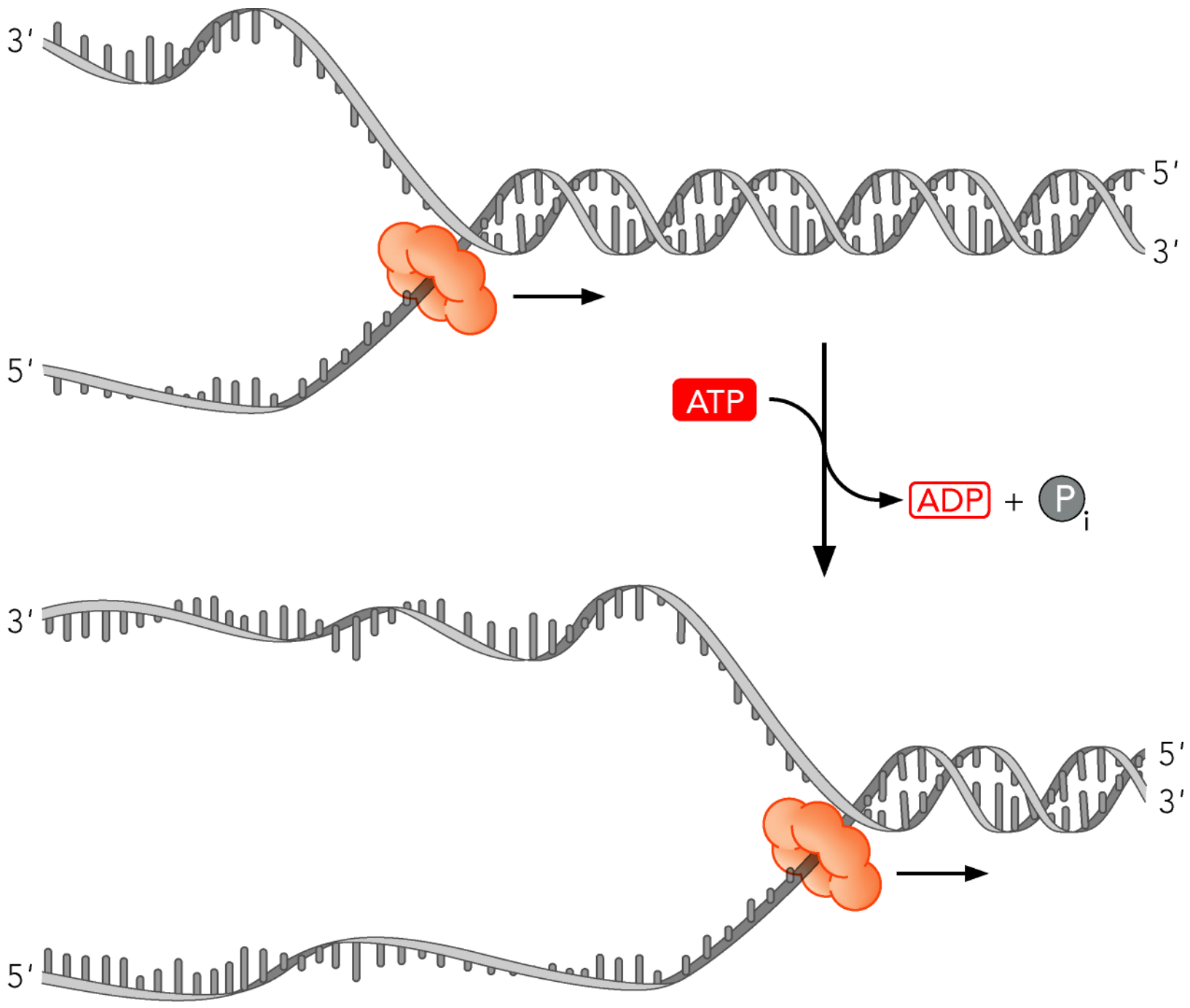
L'inizio di un nuovo filamento dei frammenti di Okazaki richiede un innesco di RNA

La necessità di creare un innesco per la DNA Pol è fornita da un enzima speciale, detta **primasi**, in grado di sintetizzare de novo, cioè senza innesco, corti frammenti (5-10 basi) di RNA primer (innesco), poi utilizzati dalla DNA Pol. La frequenza di utilizzo della primasi sui due filamenti è ovviamente diversa: sul filamento guida viene utilizzata una sola volta, sull'altro tutte le volte che viene iniziato un frammento di Okazaki. Dato che ad ogni forca replicativa vengono sintetizzate milioni di basi, la sintesi del filamento lento può richiedere centinaia di migliaia di frammenti di Okazaki, ciascuno col suo primer.

La primasi, a differenza delle RNA Pol, che sintetizzano gli altri RNA cellulari, non richiede sequenze specifiche per iniziare la sintesi del primer, ma si attiva solo in associazione con proteine specifiche della replicazione.

Le DNA elicasi aprono la doppia elica alla forcella replicativa

Questi enzimi aprono la doppia elica, spostandosi su di essa, a spese di ATP. Hanno una struttura esamerica ad anello, con cui circondano uno dei 2 filamenti alla forcella, ed operano in modo processivo. Il legame delle elicasi alla forcella è assistito da proteine ausiliarie. Ogni elicasi ha una propria polarità (5'-3' o viceversa). L'elicasi associata al filamento lento ha polarità 5'-3', in modo da scorrere nel verso dell'apertura della forcella.



Le proteine stabilizzano il DNA a singolo filamento

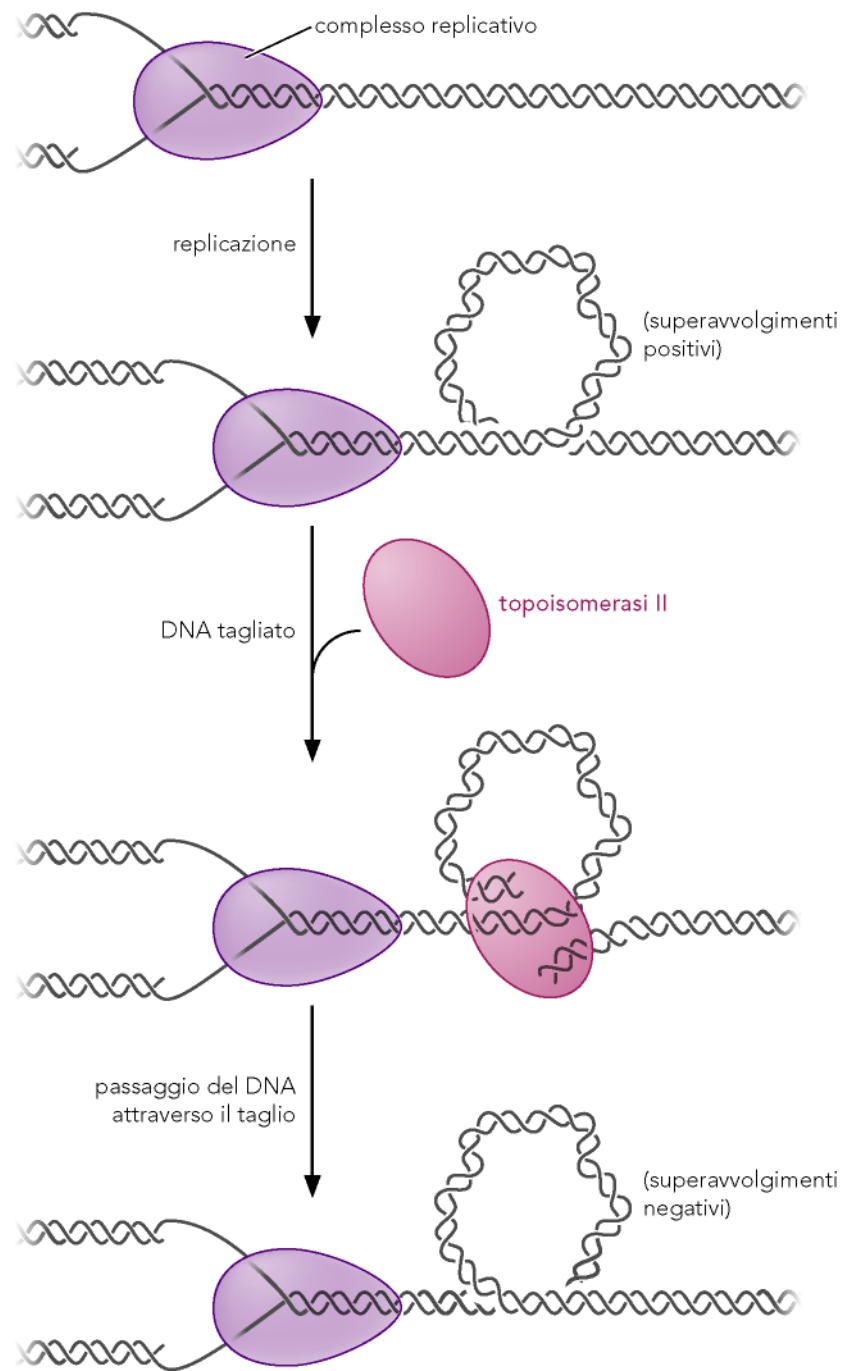
I filamenti singoli, rilasciati dall'elicasi, vengono stabilizzati da particolari proteine, dette SSB (single strand binding) nei batteri, che si legano su siti vicini sul DNA, lo mantengono in conformazione distesa, facilitando il ruolo di stampo per la sintesi del DNA e dell'innesco.

Il legame delle SSB al DNA è **cooperativo e sequenza-indipendente**. Si realizza tramite interazioni elettrostatiche con i gruppi fosfato e impilamento con le basi, ma senza legami a H.

Le topoisomerasi rimuovono i superavvolgimenti prodotti dall'apertura della doppia elica

Le elicasi, aprendo la doppia elica, riducono il numero di twist T_w . Se il DNA è circolare o vincolato alle estremità, L_k non può cambiare, per cui W_r deve aumentare. In effetti a valle della forcella si formano superavvolgimenti positivi, che in assenza di topoisomerasi rallenterebbero la replicazione fino ad arrestarla. Anche nei lunghi cromosomi lineari degli eucarioti i superavvolgimenti, non potendo essere eliminati per semplice rotazione del DNA, vengono rimossi dalle topoisomerasi.

Notare che gli enzimi che agiscono alla forca replicativa (elicasi e topoisomerasi) non modificano la struttura primaria (covalente) del DNA, ma solo quella secondaria (legami a H fra le catene) e terziaria (superavvolgimenti), rispettivamente.



Specializzazione delle DNA polimerasi

Nelle cellule vi sono diverse DNA Pol, ognuna specializzata per una diversa funzione.

E. coli possiede 5 DNA Pol, distinte per attività, composizione e numero.

DNA Pol III è l'enzima principale della replicazione: replica l'intero cromosoma (4.6 Mb), lavorando su 2 forcelle soltanto (altamente processiva), come componente di un grande complesso (DNA Pol III oloenzima).

DNA Pol I: specializzata nella rimozione e sostituzione dei corti primer ad RNA (< 10 basi), tramite la sua attività 5' esonucleasica; poco processiva (20-100 basi/volta).

Entrambi gli enzimi possiedono l'attività di proofreading, necessaria per mantenere alta la fedeltà.

Le rimanenti 3 DNA pol, specializzate nel riparo, non hanno bisogno di questa attività.

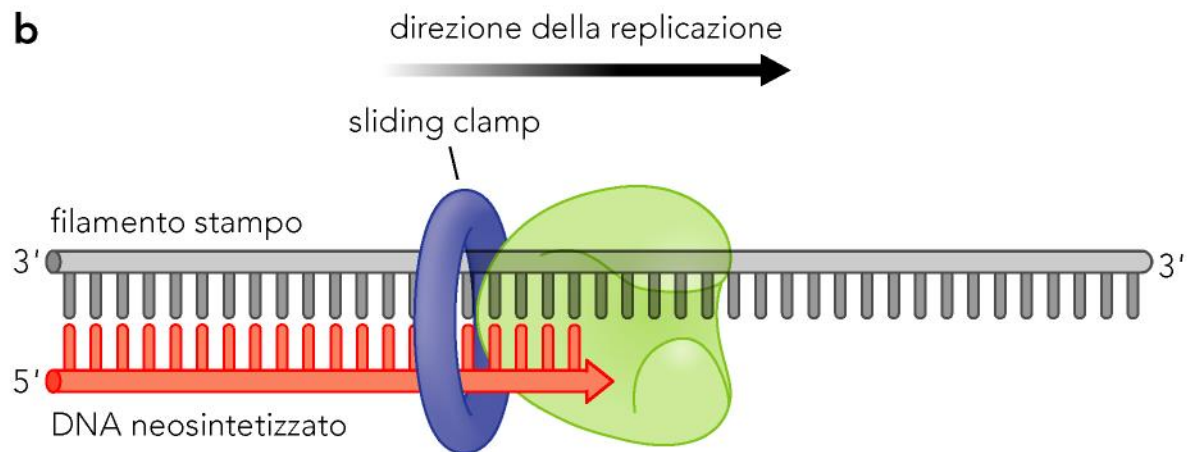
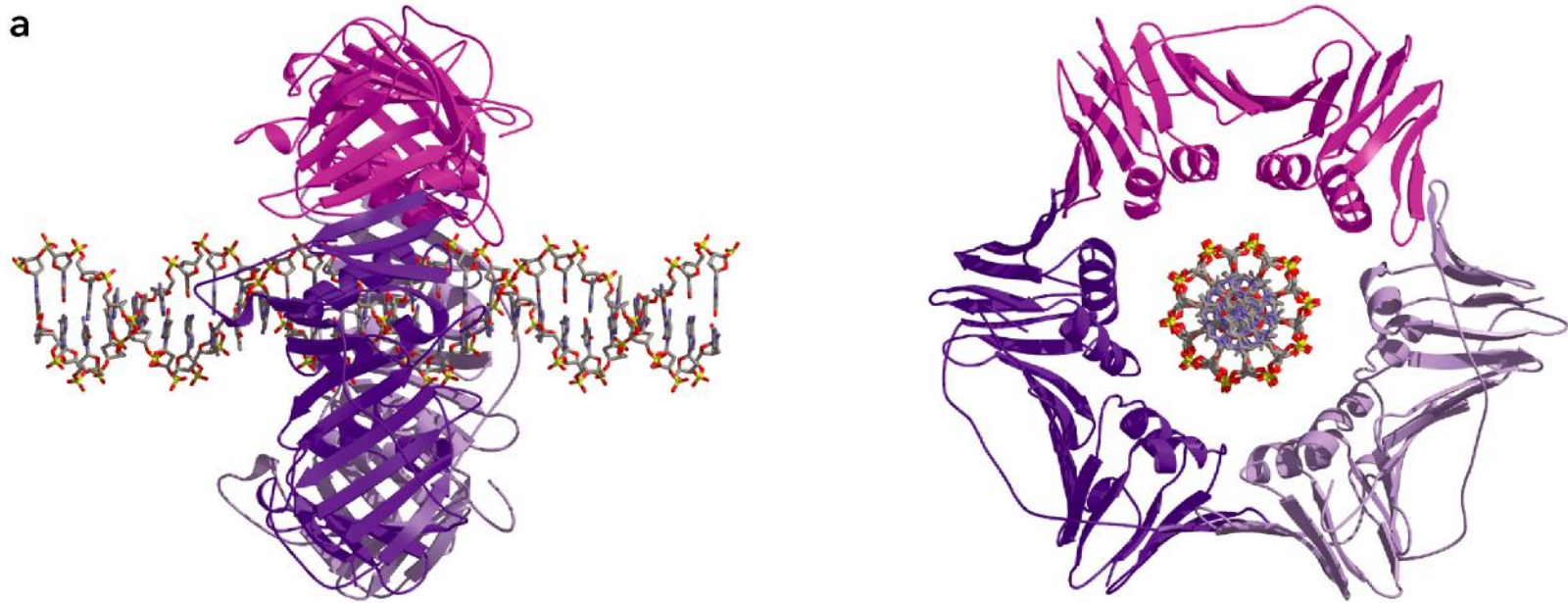
Una **tipica cellula eucariotica** possiede > 15 DNA Pol: 3 sono essenziali per la replicazione (δ , ϵ e α /primasi) e composte di molte subunità. δ e ϵ sono altamente processive (100-10.000), rimpiazzano rapidamente α , dopo la sintesi (lenta) dei primer (50-100b). Le altre DNA Pol sono coinvolte nel riparo.

DNA sliding clamp

L'alta processività della DNA Pol III alla forcella dipende in gran parte da una proteina ausiliaria a forma di pinza scorrevole, che scivola sul DNA senza mai dissociarsi e mantenendo la Pol associata all'innescamento-stampo.

Lo scorrimento è facilitato dalla presenza di 1-2 strati di molecole d'acqua fra proteina e DNA.

In assenza di questa proteina anche la DNA Pol III è poco processiva (si dissocia ogni 20-100 basi).



In presenza della pinza la DNA Pol III non può dissociarsi dal DNA

La DNA Pol III può dissociarsi dal 3'-OH del primer, ma non dal DNA. Ciò assicura un rapido ripristino della sintesi, aumentando quindi la processività. Alla fine di un frammento di Okazaki, la DNA Pol si dissocia per una variazione di affinità con la pinza, che invece può restare legata al DNA e richiamare altre proteine, ad es. di riparo o di assemblaggio della cromatina negli eucarioti.

Quindi la DNA polimerasi non funziona da sola, ma ha bisogno durante la replicazione del supporto della primasi, delle elicasi, delle SSB e delle topoisomerasi

Tabella 8.1

Enzimi in funzione a livello della forza replicativa

	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Uomo
Primasi	DnaG	Primasi (PRI 1/PRI 2)	Primasi
DNA elicasi	DnaB	Complesso Mcm	Complesso Mcm
SSB	SSB	RPA	RPA
Topoisomerasi	Girasi, Topoisomerasi I	Topoisomerasi I, II	Topoisomerasi I, II

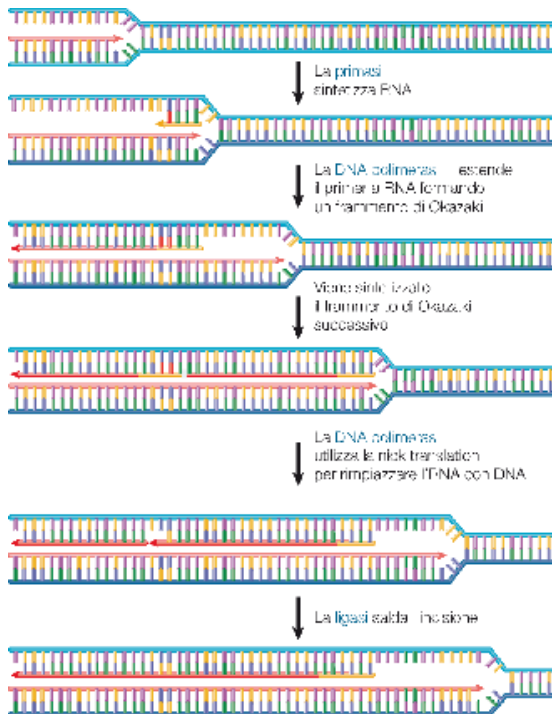
Da notare che:

Sebbene i nomi delle proteine cambino da organismo ad organismo, tuttavia le attività enzimatiche associate a questi nomi diversi sono evolutivamente conservate.

Che le elicasi e le topoisomerasi svolgono la loro funzione senza alterare in modo permanente la struttura chimica del DNA.

Che le interazioni di tutte queste proteine con il DNA sono sequenza-indipendente (i fosfati sono riconosciuti dal pollice della DNA polimerasi, i donatori accettori di H nel solco minore dal palmo della DNA polimerasi, fosfati ed interazioni di impilamento consentono le interazioni con le SSB).

E' anche importante notare che conformazioni proteiche a cerchio (elicasi), o che avvolgono il DNA (la polimerasi) sono funzionali a meccanismi "processivi"

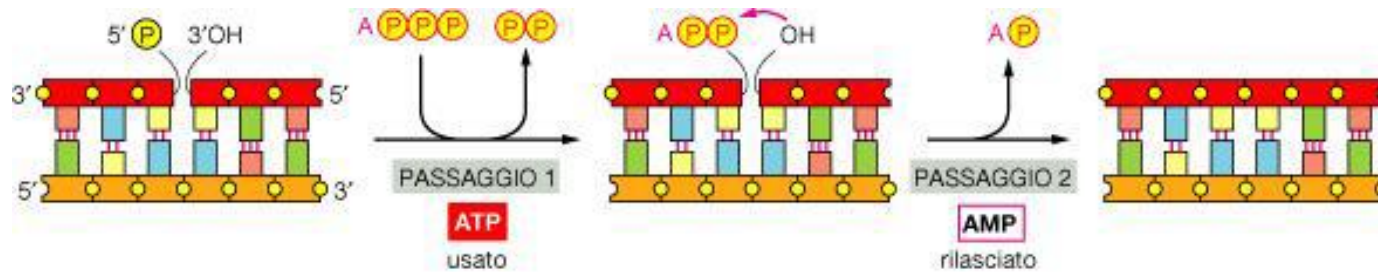


I diversi frammenti di Okazaki devono essere uniti tra loro.

- La sintesi di un frammento termina subito prima del sito di *annealing* del primer ad RNA del frammento che lo precede.
- Il primer viene rimosso, e la regione a singola elica **viene riempita dalla DNA polimerasi I**:
mutanti *polA* sono difettivi nella capacità di unire in maniera corretta i frammenti di Okazaki.

L'attività 5'–3' esonucleasica della DNA polimerasi I rimuove il primer ad RNA e simultaneamente lo rimpiazza con DNA sintetizzato a partire dalla estremità 3'–OH del frammento di Okazaki successivo.

La DNA Ligasi catalizza la formazione del legame fosfodiesterico tra due basi contigue



Fasi della replicazione

1.INIZIO

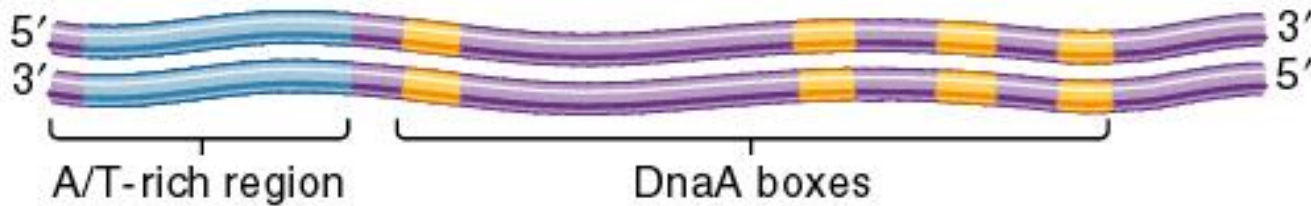
2.ALLUNGAMENTO

3.TERMINE

Protein	Function
Helicase	Unwinds parental double helix at replication forks
Single-strand binding protein	Binds to and stabilizes single-stranded DNA until it can be used as a template
Topoisomerase	Relieves “overwinding” strain ahead of replication forks by breaking, swiveling, and rejoining DNA strands
Primase	Synthesizes an RNA primer at 5′ end of leading strand and of each Okazaki fragment of lagging strand
DNA pol III	Using parental DNA as a template, synthesizes new DNA strand by covalently adding nucleotides to the 3′ end of a pre-existing DNA strand or RNA primer
DNA pol I	Removes RNA nucleotides of primer from 5′ end and replaces them with DNA nucleotides
DNA ligase	Joins 3′ end of DNA that replaces primer to rest of leading strand and joins Okazaki fragments of lagging strand

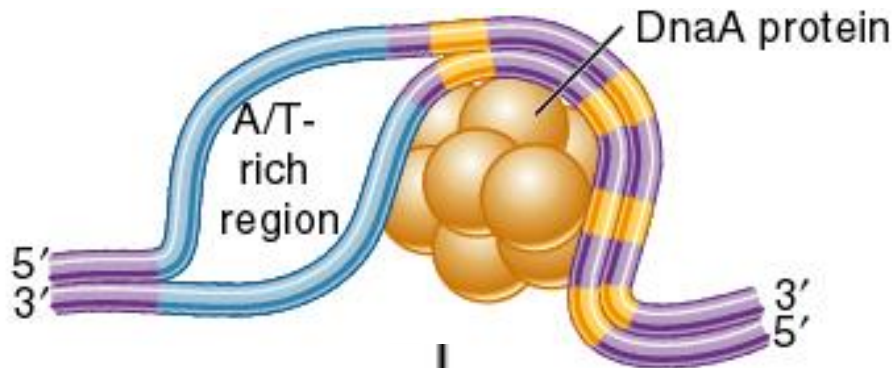
Inizio di Replicazione

- L'origine di replicazione in *E. coli* è chiamata *oriC*
 - origin of Chromosomal replication
- Ci sono tre tipi di sequenze *oriC* che sono funzionalmente attive
 - AT-rich region
 - DnaA boxes
 - GATC siti di metilazione



- Other proteins such as HU and IHF also bind.
 - This causes the region to wrap around the DnaA proteins and separates the AT-rich region

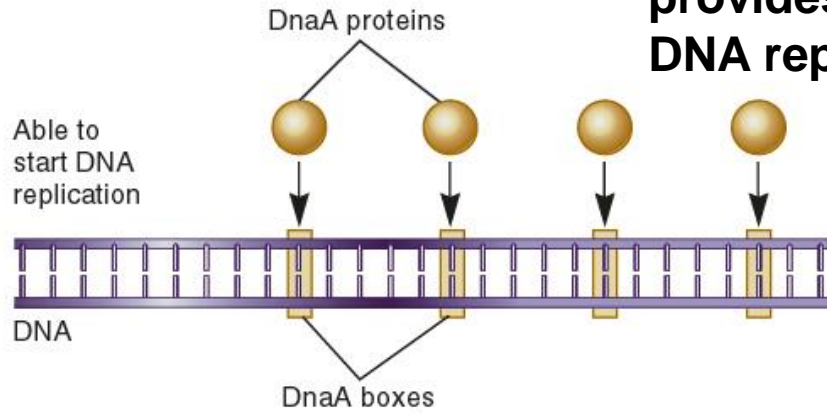
- DNA replication is initiated by the binding of DnaA proteins to the DnaA box sequences
 - This binding stimulates the cooperative binding of an additional 20 to 40 DnaA proteins to form a large complex



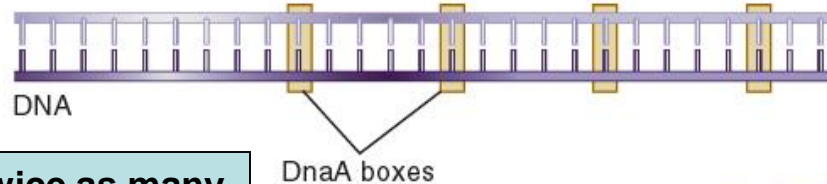
DnaB protein (helicase) binds to the origin (DnaC protein assists this process, but DnaC is released).

The amount of DNA protein provides a way to regulate DNA replication

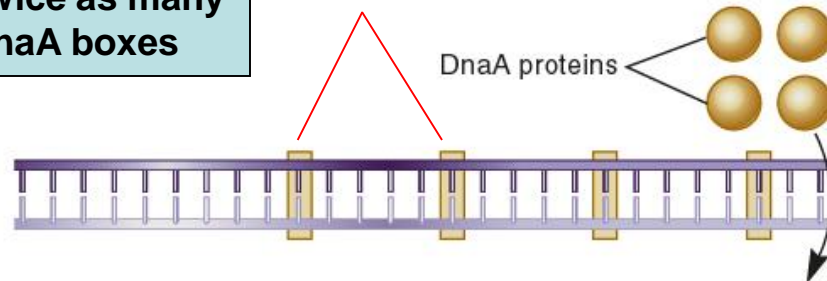
To begin DNA replication:



After DNA replication:

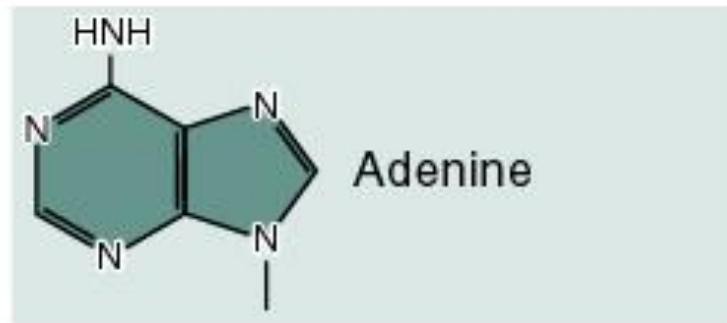


Twice as many DnaA boxes



Some degraded: some stuck to cell membrane

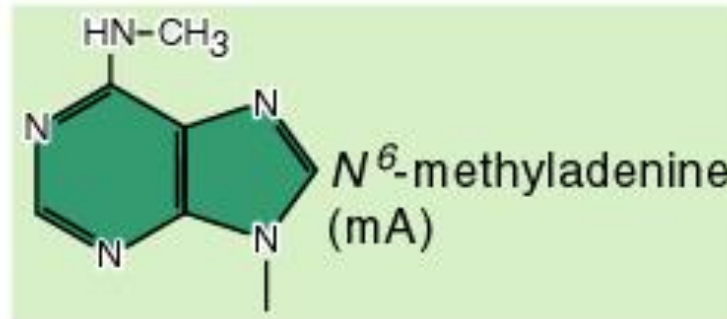
Insufficient amount of DnaA proteins



Recognizes the 5' – GATC – 3' sequence and attaches a methyl group onto the adenine

Dam
methylase

DNA adenine
methyltransferase

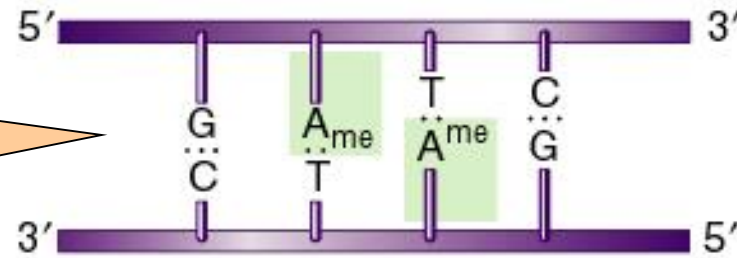


(a) Structure of adenine and methyladenine

Methylation of GATC sites in *oriC*

Before replication, GATC sites are methylated on both strands

This full methylation facilitates initiation of DNA replication

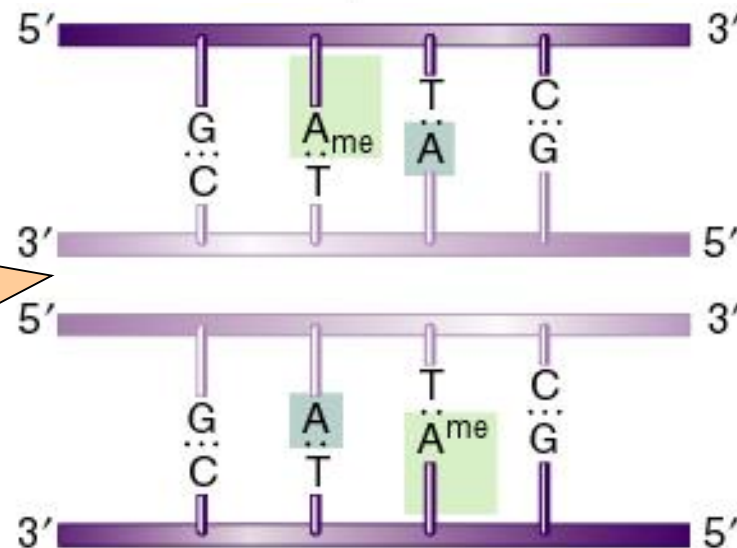


Replication

Following replication, GATC sites are not methylated on the daughter strands

This half-methylation does not efficiently initiate replication

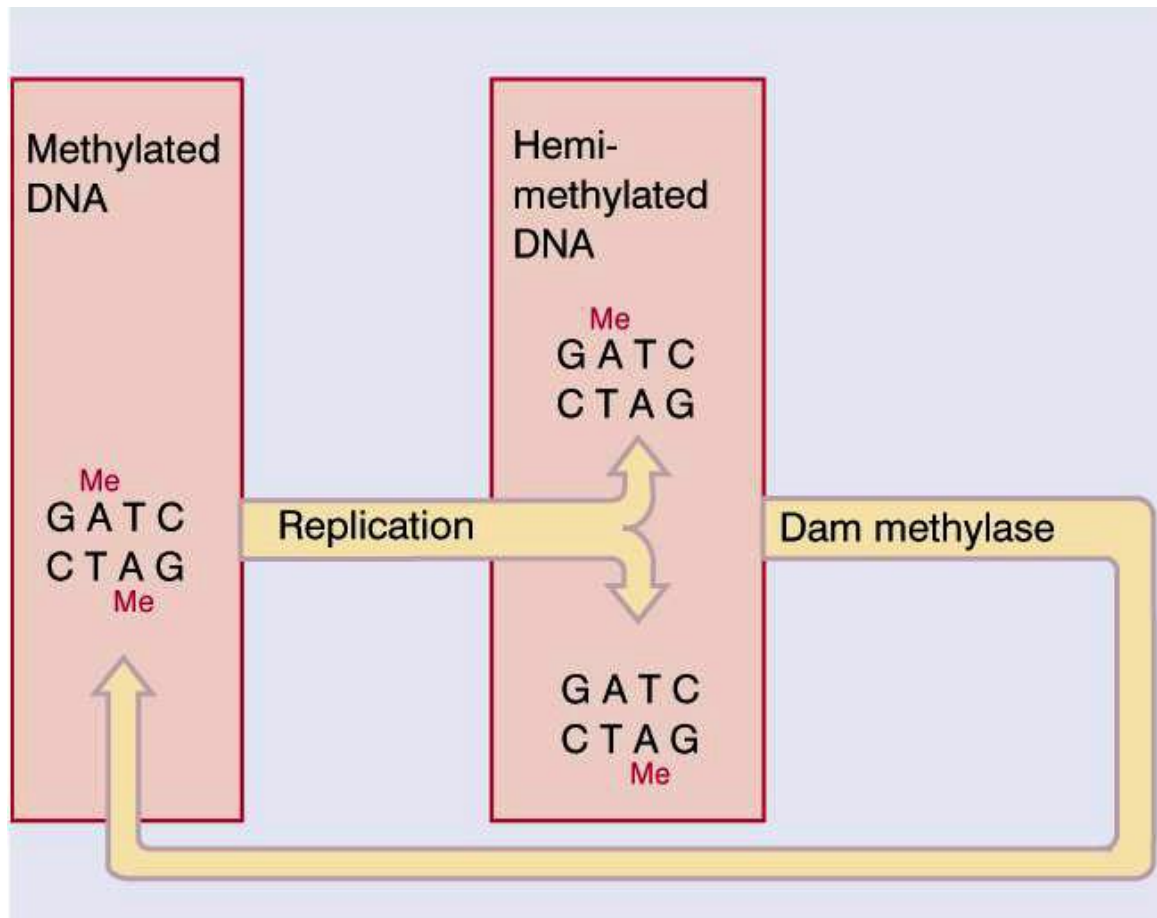
Several minutes will pass before Dam methylase will methylate the GATC sites in the daughter strands



(b) Results immediately after DNA replication

Methylation of GATC sites in *oriC*

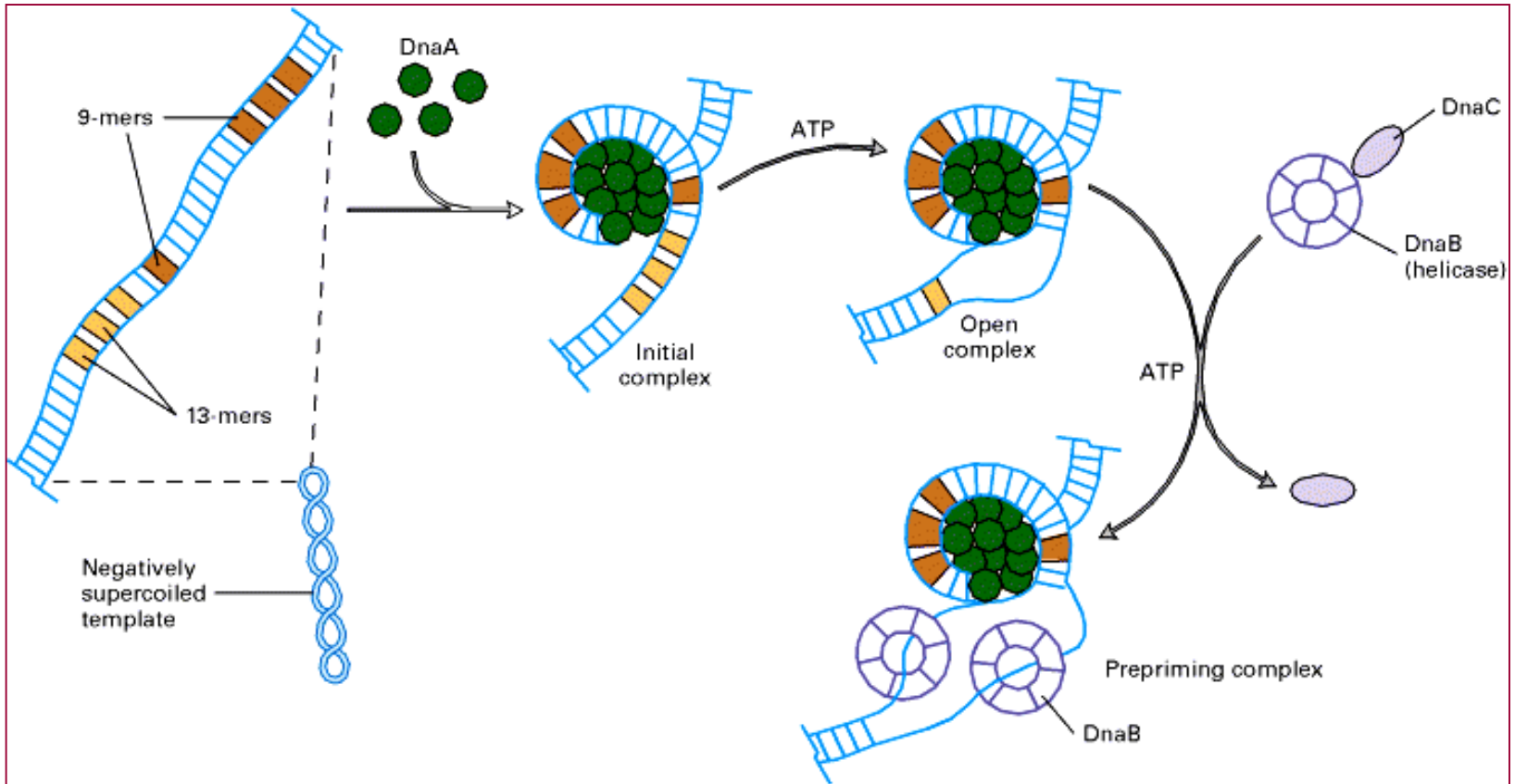
Perché il DNA si replica soltanto una volta per ciclo cellulare?



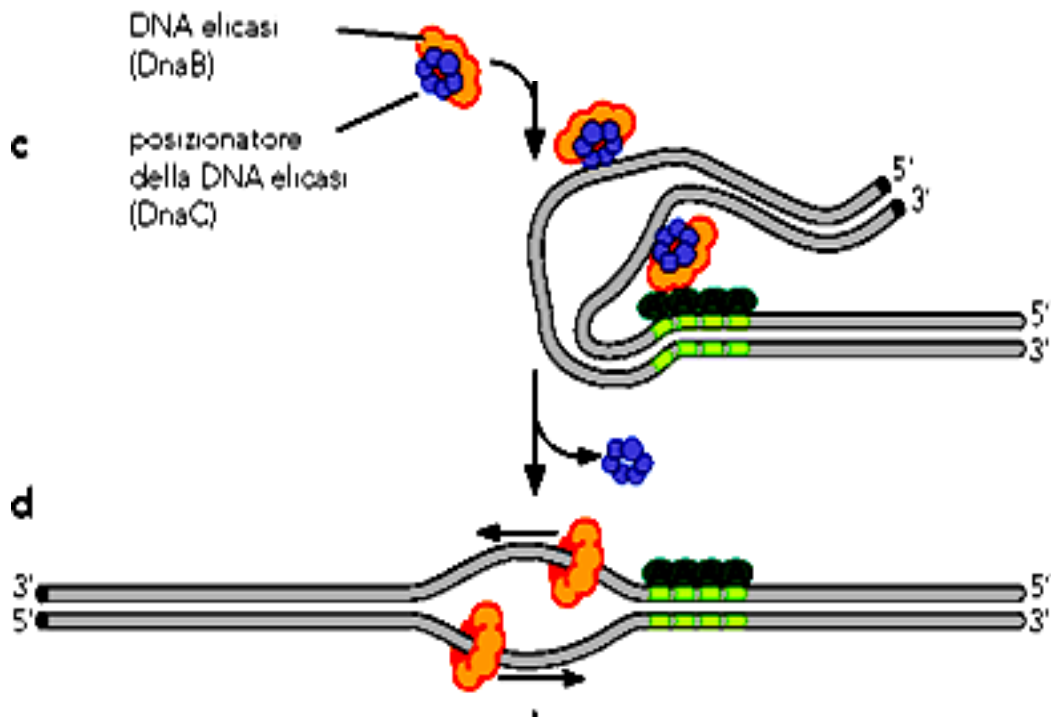
La replicazione del DNA metilato (ad a livello delle sequenze GATC) genera DNA emimetilato, che si mantiene in questa condizione, finché la metilasi Dam non ristabilisce lo stato di completa metilazione.

In *E. coli* è stato dimostrato che solo le origini completamente metilate possono dare inizio alla replicazione; le origini figlie, emimetilate, non possono essere riutilizzate fino a quando non è stata ristabilita la condizione di completa metilazione.

Modello dell'inizio della replicazione in *E.coli*



Dna A lega (cooperativamente) inizialmente le ripetizioni di 9 bp “organizzando” una superelica. In un secondo momento in presenza di ATP lega anche le ripetizioni di 13 bp denaturando circa 20 bp all’interno di questa regione ricca in A e T (l’ATP viene quindi convertito in ADP che comporta una non funzionalità della Dna A, almeno fino a quando l’ADP non sarà sostituito dall’ATP che è un processo lento). Ciò provoca la formazione di una certa quantità di DNAss su cui le elicasi (Dna B) possono “atterrare” veicolate da un caricatore delle elicasi (Dna C)



Sia Dna B che C sono complessi esamERICI che interagiscono tra di loro. Tali interazioni inattivano l'attività elicastica e consentono il caricamento delle elicasi sul singolo filamento.

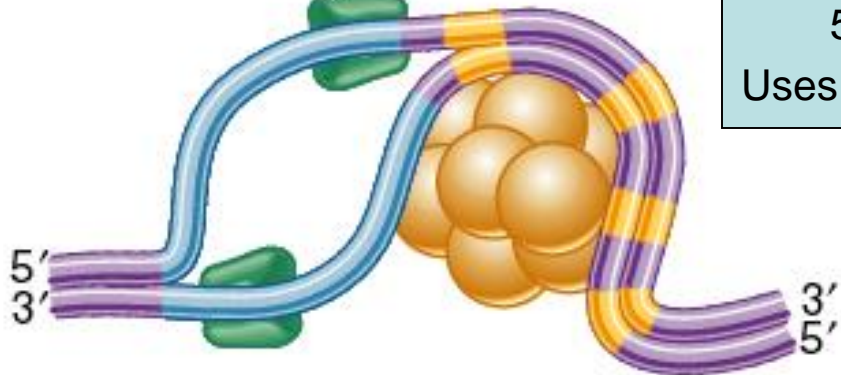
Una volta caricate le elicasi la Dna C viene rilasciata attivando l'elicasi.

Ognuna delle molecole di elicasi caricata scorre in direzione 5' - 3' all'interno della bolla posizionandosi su ognuna delle due forche

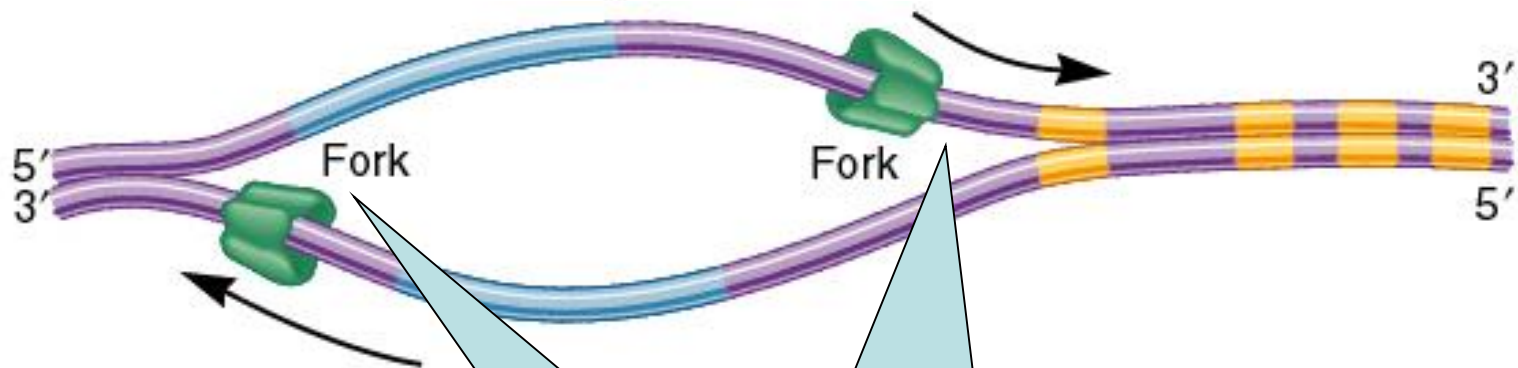
- DNA helicase separates the two DNA strands by breaking the hydrogen bonds between them
- This generates positive supercoiling ahead of each replication fork
 - DNA gyrase travels ahead of the helicase and alleviates these supercoils
- Single-strand binding proteins bind to the separated DNA strands to keep them apart
- Then short (10 to 12 nucleotides) RNA primers are synthesized by DNA primase
 - These short RNA strands start, or prime, DNA synthesis
 - They are later removed and replaced with DNA

Helicase

Composed of six subunits
Travels along the DNA in the
5' to 3' direction
Uses energy from ATP



Helicase separates the DNA in both directions, creating 2 replication forks.



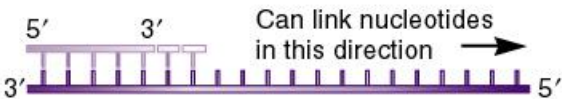
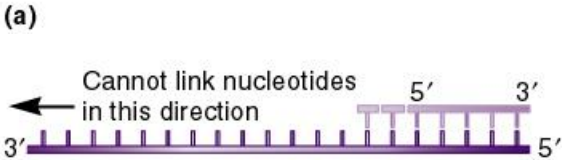
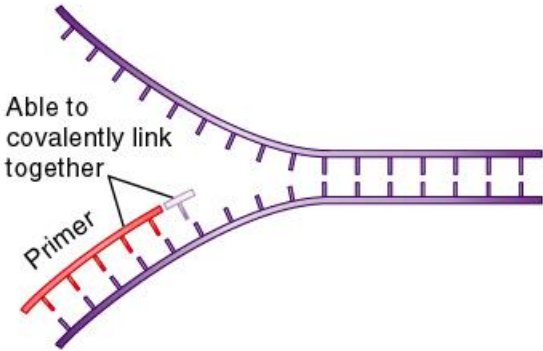
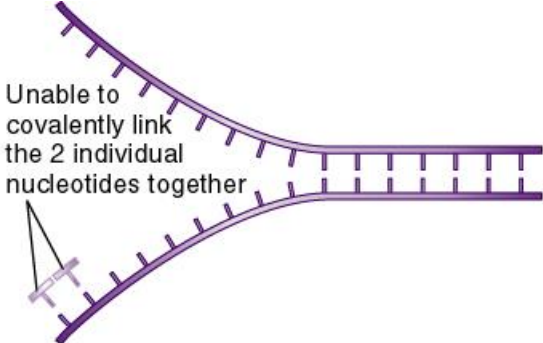
Bidirectional replication

DNA polymerases cannot initiate DNA synthesis

Problem is overcome by the RNA primers synthesized by primase

Problem is overcome by synthesizing the 3' to 5' strands in small fragments

DNA polymerases can attach nucleotides only in the 5' to 3' direction



(b)

Unusual features of DNA polymerase function



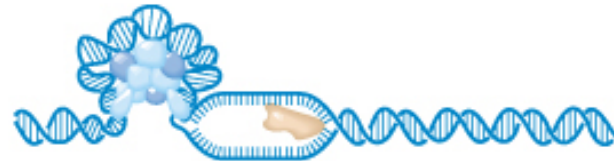
1 Initiator proteins bind to replication origin



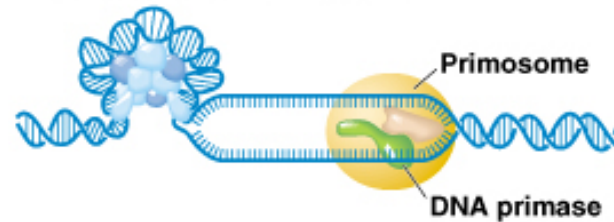
2 DNA helicase binds to initiator proteins



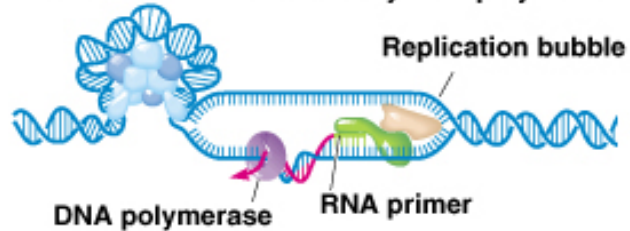
3 Helicase loads onto DNA

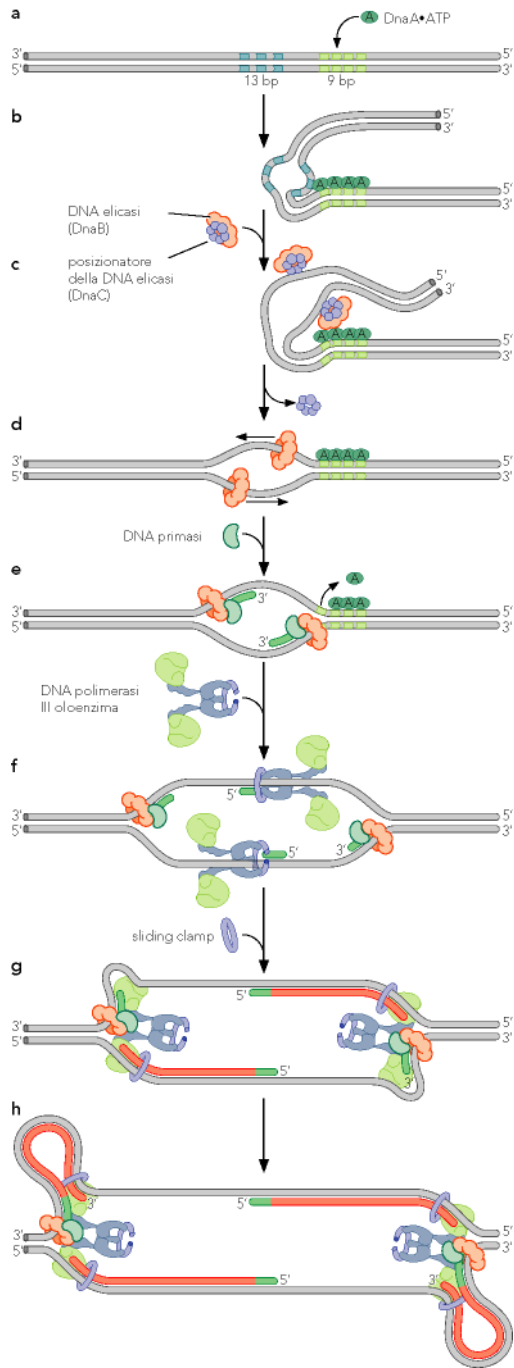


4 Helicase denatures helix and binds with DNA primase to form primosome



5 Primase synthesizes RNA primer, which is extended as DNA chain by DNA polymerase





Modello per l'inizio della replicazione in *E.coli*

Dopo che un certo numero di molecole iniziatore (DnaA), complessate ad ATP, si sono legate ad OriC ed hanno aperto la doppia elica, vengono reclutate due elicasi (DnaB), complessate al posizionatore (DnaC). Una volta posizionate sul ssDNA, con rilascio di DnaC, le elicasi migrano verso le due opposte forcelle. Le elicasi richiamano prima le primasi, per la sintesi dei primer, poi il DNA Pol III oloenzima, alla giunzione innesco-stampo di ciascuna forcella, dando inizio alla sintesi dei due filamenti guida. Dopo che ciascuna DNA Pol si è spostata di ~1000 basi, vengono sintetizzati i primer degli Okazaki.

DNA Polymerases

- DNA polymerases are the enzymes that catalyze the attachment of nucleotides to make new DNA
- In *E. coli* there are five proteins with polymerase activity
 - DNA pol I, II, III, IV and V
 - DNA pol I and III
 - Normal replication
 - DNA pol II, IV and V
 - DNA repair and replication of damaged DNA

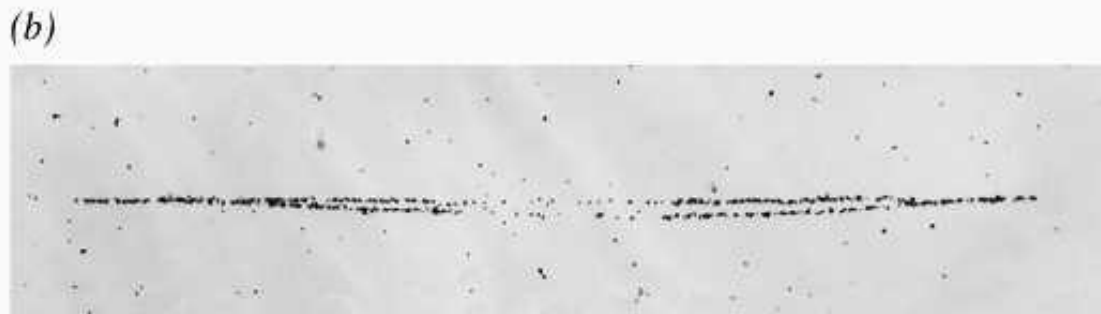
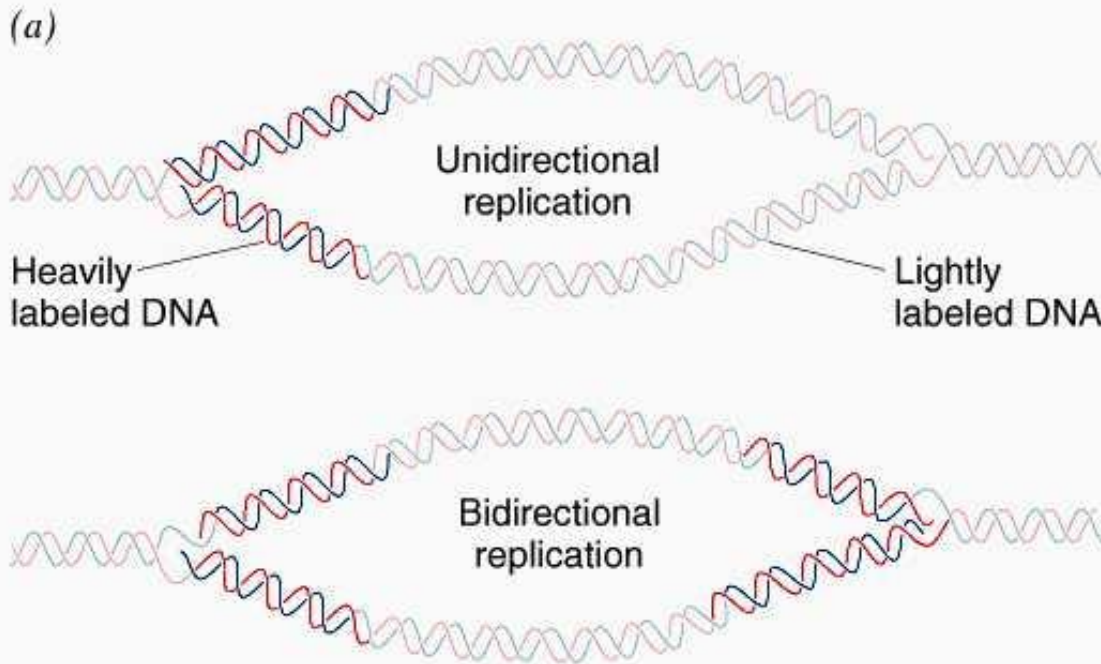
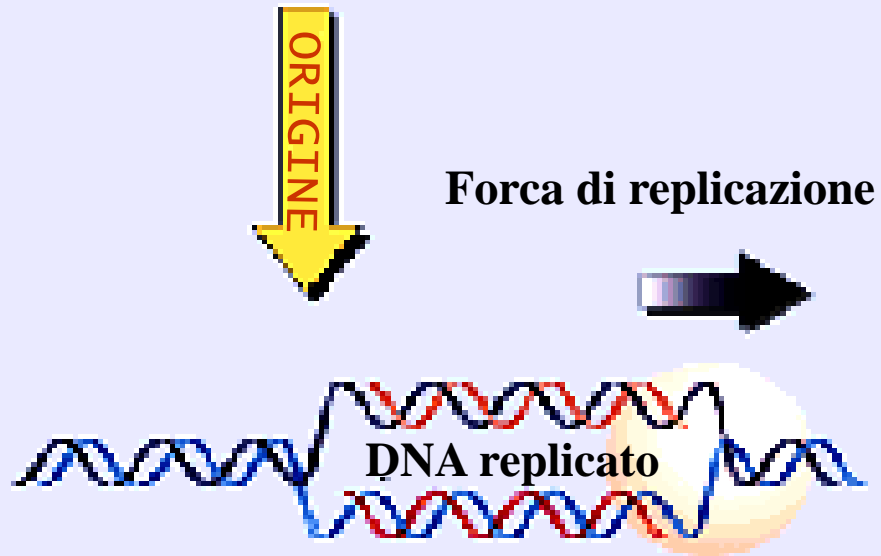


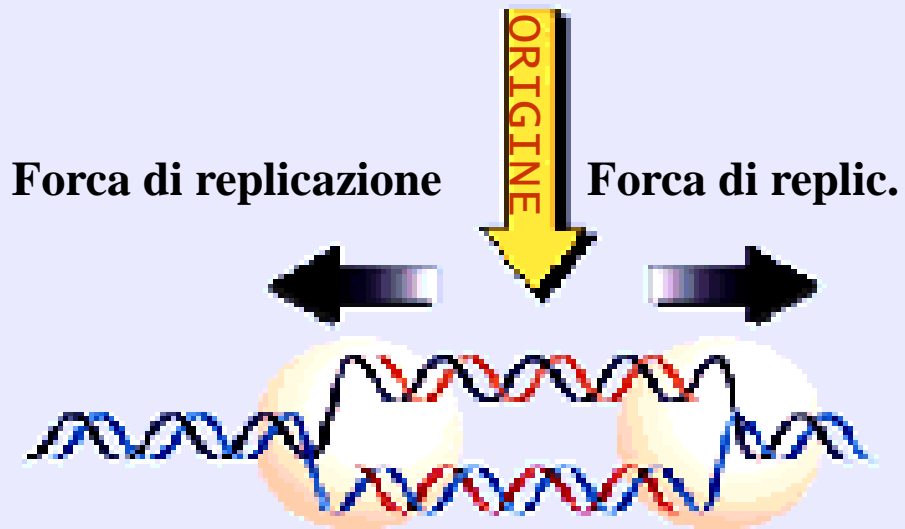
Figure 24-4. The autoradiographic differentiation of unidirectional and bidirectional θ replication of DNA. [Courtesy of David M. Prescott and P.L. Kuempel, University of Colorado.]

Tipicamente la replicazione del DNA cellulare è bidirezionale: due forche replicative procedono a partire da un sito origine di replicazione.

REPLICAZIONE UNIDIREZIONALE



REPLICAZIONE BIDIREZIONALE



I repliconi possono essere replicati in maniera uni- o bidirezionale, a seconda che nell'origine si formino una o due forche di replicazione

Allungamento

DNA Polymerases

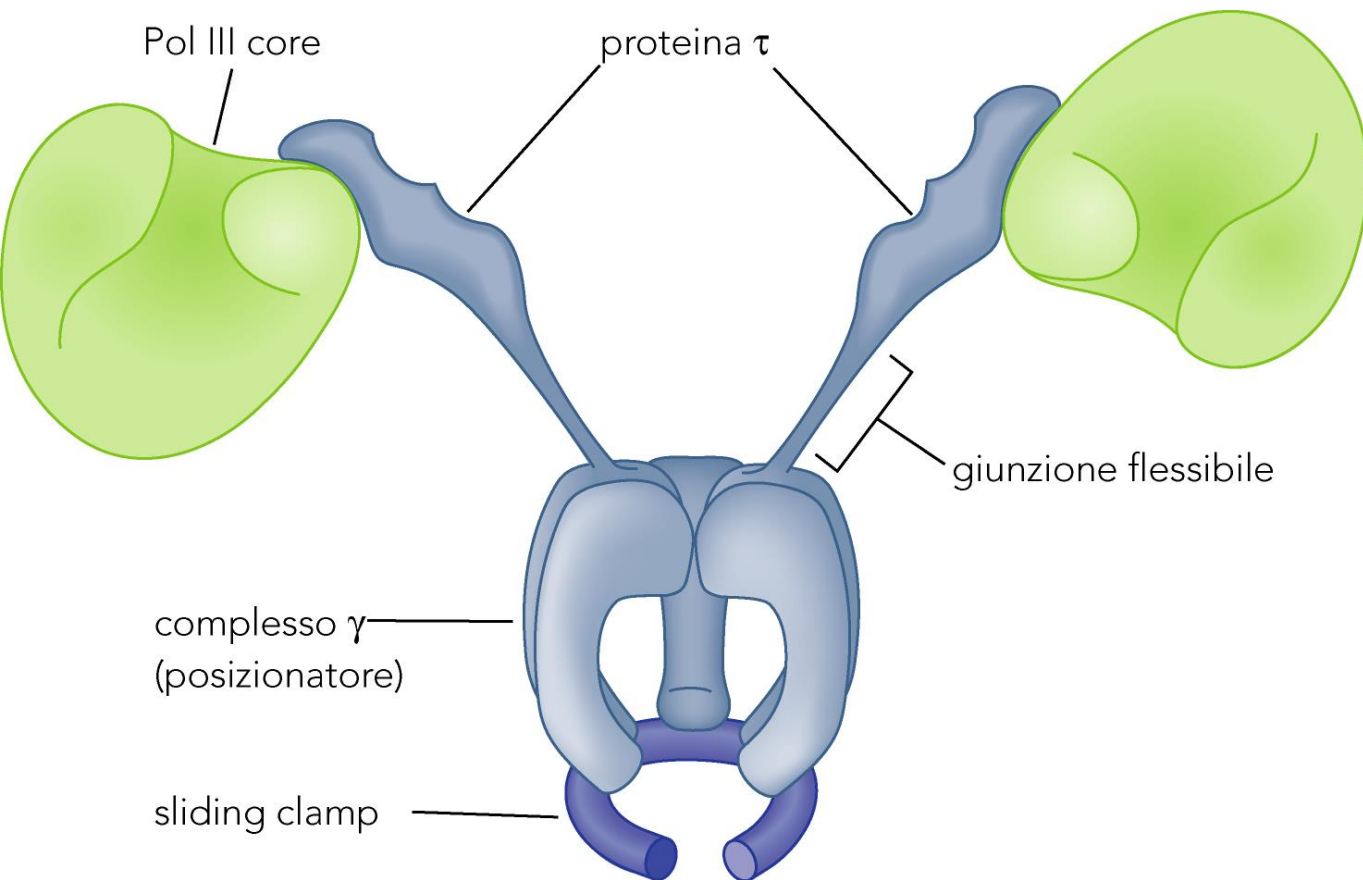
■ DNA pol I

- Composed of a single polypeptide
- Removes the RNA primers and replaces them with DNA

■ DNA pol III

- Composed of 10 different subunits
- The α subunit synthesizes DNA
 - The other 9 fulfill other functions
- The complex of all 10 is referred to as the **DNA pol III holoenzyme**

- The two new daughter strands are synthesized in different ways
 - **Leading strand**
 - One RNA primer is made at the origin
 - DNA pol III attaches nucleotides in a 5' to 3' direction as it slides toward the opening of the replication fork
 - **Lagging strand**
 - Synthesis is also in the 5' to 3' direction
 - However it occurs away from the replication fork
 - Many RNA primers are required
 - DNA pol III uses the RNA primers to synthesize small DNA fragments (1000 to 2000 nucleotides each)
 - These are termed **Okazaki fragments** after their discoverers



DNA pol III oloenzima

I due filamenti vengono sintetizzati contemporaneamente per ridurre il tempo di permanenza del DNA come singolo filamento più fragile: una sua rottura fortuita spezzerebbe il cromosoma (riparo molto difficile).

2 molecole di DNA Pol III (core) agiscono di concerto alla forcella, come parti del complesso formato da una proteina γ (posizionatore della pinza, pentamero) e due copie di proteina τ (giunzioni flessibili).

Table 5-2
Major subunits and subassemblies of pol III holoenzyme

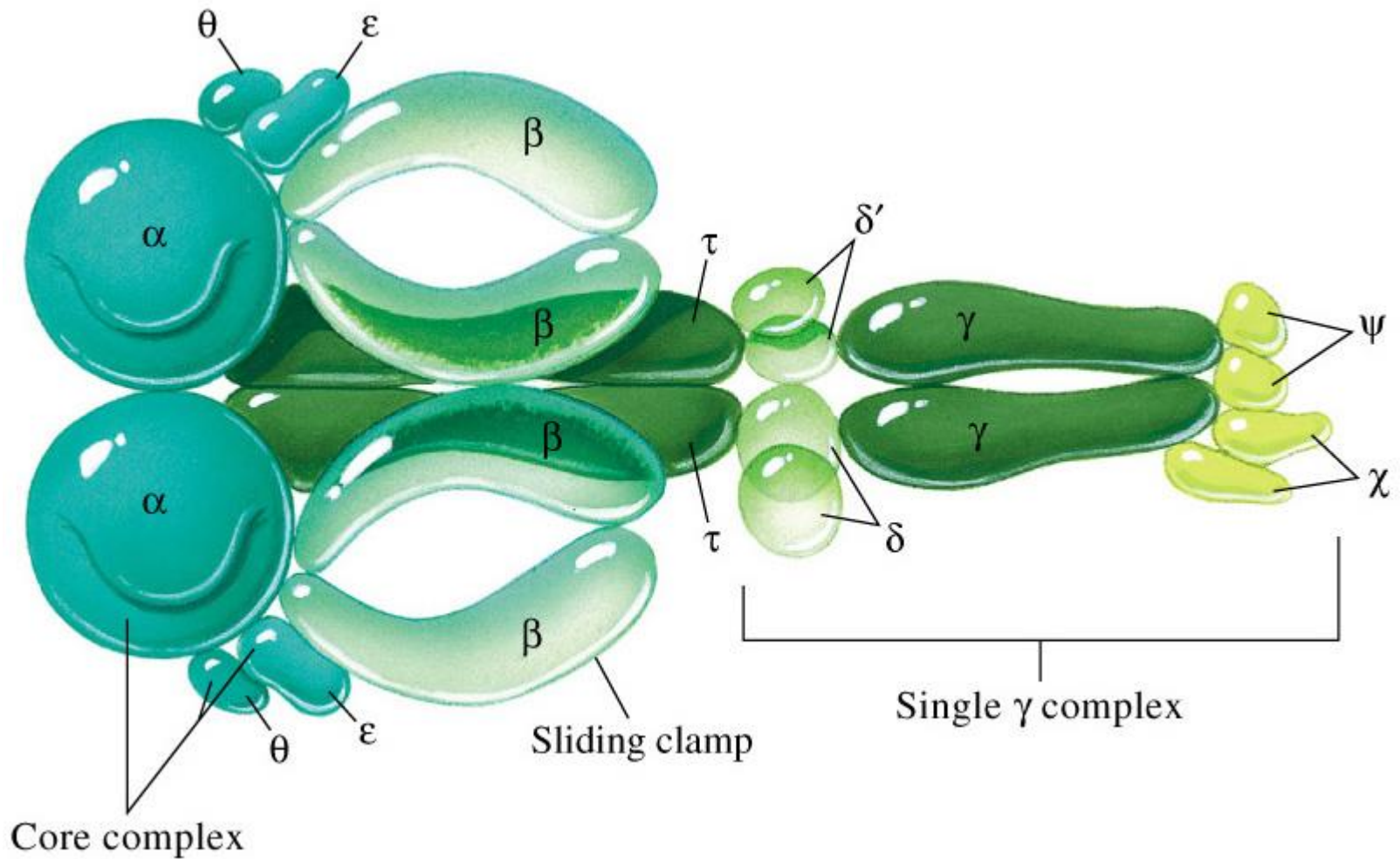
Subunit	Mass (kDa)	Gene	Subassembly		
α	130 ^a	<i>dnaE</i>	} pol III (core)	} pol III'	} pol III* } holoenzyme
ϵ	27.5 ^a	<i>dnaQ (mutD)</i>			
θ	10				
τ	71 ^a	<i>dnaX</i>	} γ complex		
γ	47.5 ^a	<i>dnaX</i>			
δ	35				
δ'	33				
χ	15				
ψ	12				
β	40.6 ^a	<i>dnaN</i>			

^a Based on DNA sequence; others are based on electrophoresis.

TABLE 11.2

Subunit Composition of DNA Polymerase (polIII) Holoenzyme from *E. coli*

Subunit	Function
α	Synthesizes DNA
ϵ	3' to 5' proofreading (removes mismatched nucleotides)
θ	Accessory protein that stimulates the proofreading function
τ	Promotes the dimerization of two polIII proteins together at the replication fork; also, stimulates DNA helicase
β	Clamp protein, which allows DNA polymerase to slide along the DNA without falling off
γ	Clamp loader protein; initially helps the clamp protein to bind to the DNA
δ	Accessory protein that binds to β
δ'	Accessory protein that stimulates γ
ψ	Accessory protein that stimulates γ
χ	Accessory protein that binds to single-strand binding protein



Structure of E. coli DNA polymerase III. The holoenzyme consists of two core complexes (containing α , ε , and θ), paired copies of β and τ , and a single γ complex (two copies each of γ , δ , δ' , χ and ψ). The structure is thus an asymmetric dimer. Other models of the holoenzyme structure have been proposed. [Adapted from O'Donnell, M. (1992).]

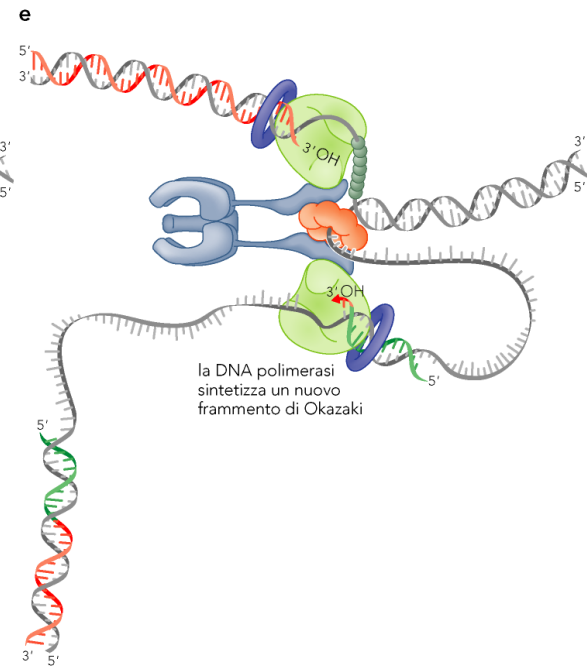
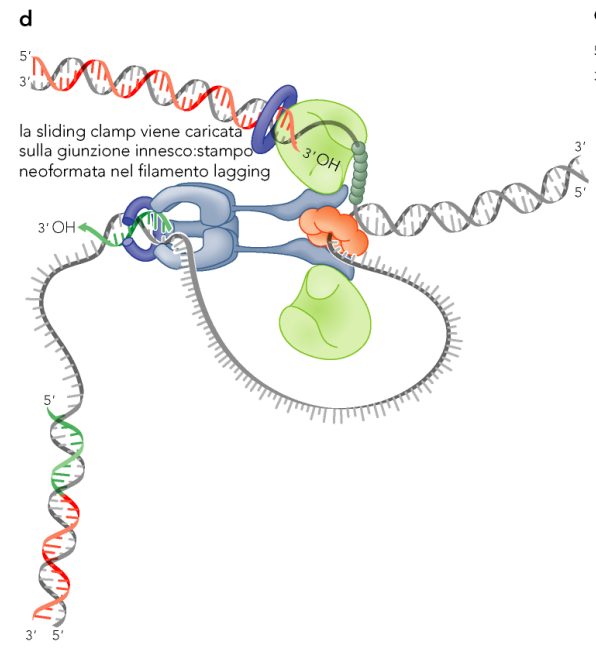
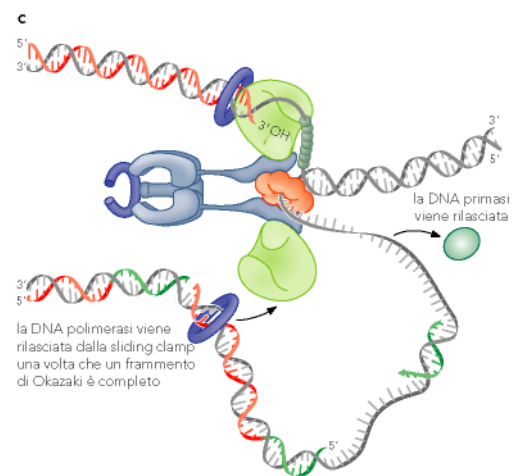
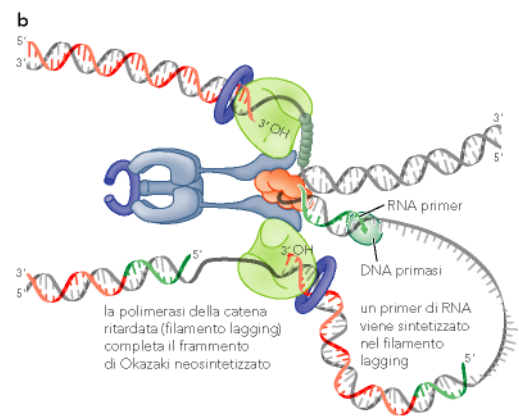
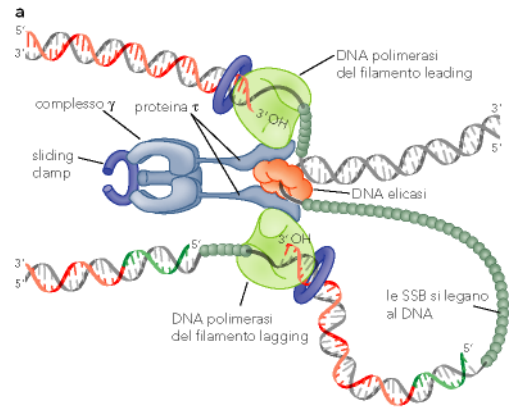
Modello a trombone del meccanismo di replicazione

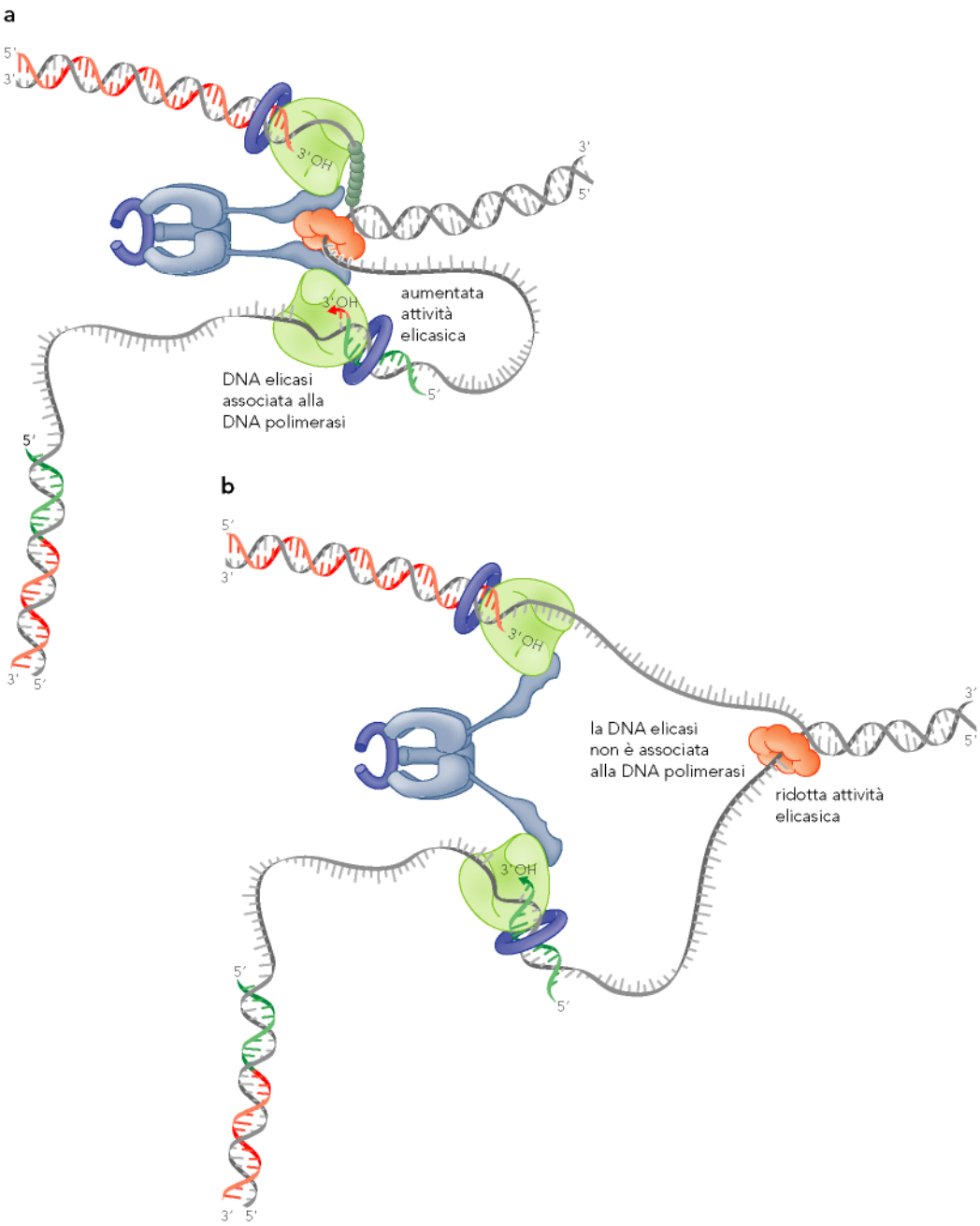
Man mano che la elicasi apre la doppia elica, scorrendo sul filamento lagging, il filamento leading viene copiato rapidamente, mentre l'altro viene mantenuto a singolo filamento dalle SSB. A intervalli +/- regolari viene sintetizzato su questo filamento un innesco, quindi un frammento di Okazaki da parte di Pol III, rilasciata dal frammento precedente, ma non dall'oloenzima.

Il modello è detto a trombone perché il laccio a singolo filamento, che si forma sul filamento lento, aumenta e cala di dimensioni durante la sintesi, mimando il movimento di un trombone.

In associazione con l'elicasi, la primasi aumenta la propria affinità per il DNA di circa 1000 volte, sintetizzando così un primer /s. E' la debole interazione primasi-elicasi, che permette di regolare la lunghezza dei frammenti di Okazaki.

Negli eucarioti 3 diverse DNA Pol agiscono alla forcella replicativa: DNA pol α /primasi, pol δ e pol ϵ , ognuna di queste ultime due su un diverso filamento (non ancora chiaro quale), ma le proteine che ne coordinano l'azione sono ancora poco conosciute.



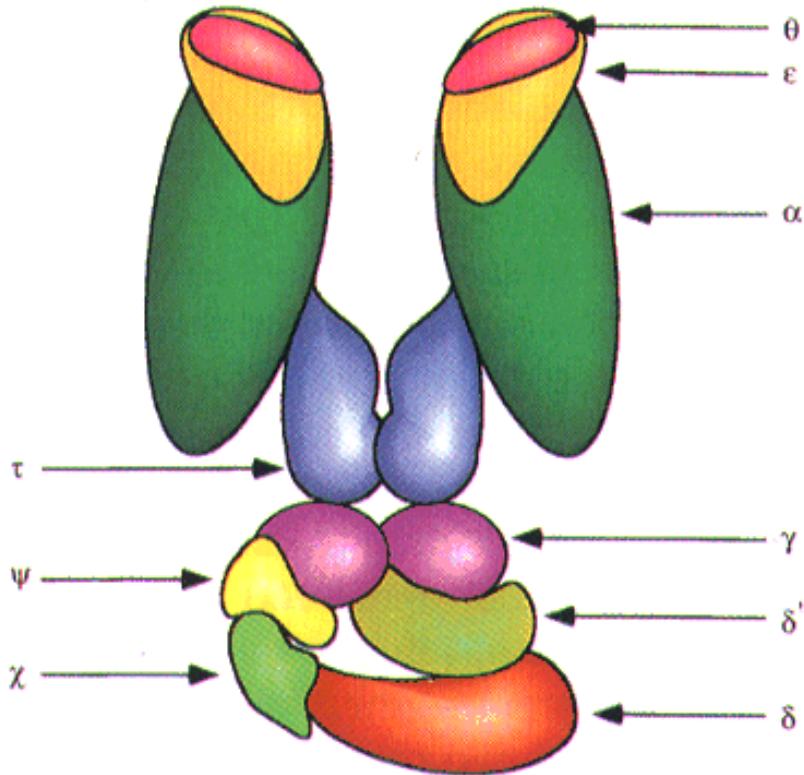


Interazione fra elicasi e DNA pol III

La proteina τ interagisce non solo con la DNA Pol III ma anche con l'elicasi, in modo che l'apertura del DNA proceda assieme alla sintesi. Poiché l'elicasi, quando non è associata alla Pol III, procede 10 volte più lentamente, ciò assicura una rapida formazione del complesso di replicazione completo (replisoma).

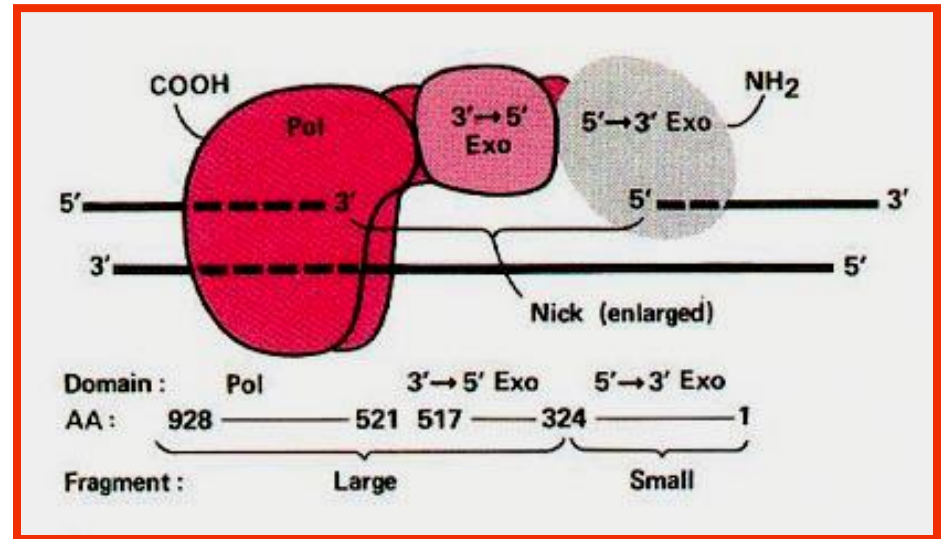
In E.coli il cromosoma è replicato in 40' da 2 sole forcelle, mediamente con un solo errore di copiatura.

DNApol III



È un oloenzima con due centri catalitici, altamente processiva, con attività di proof-reading

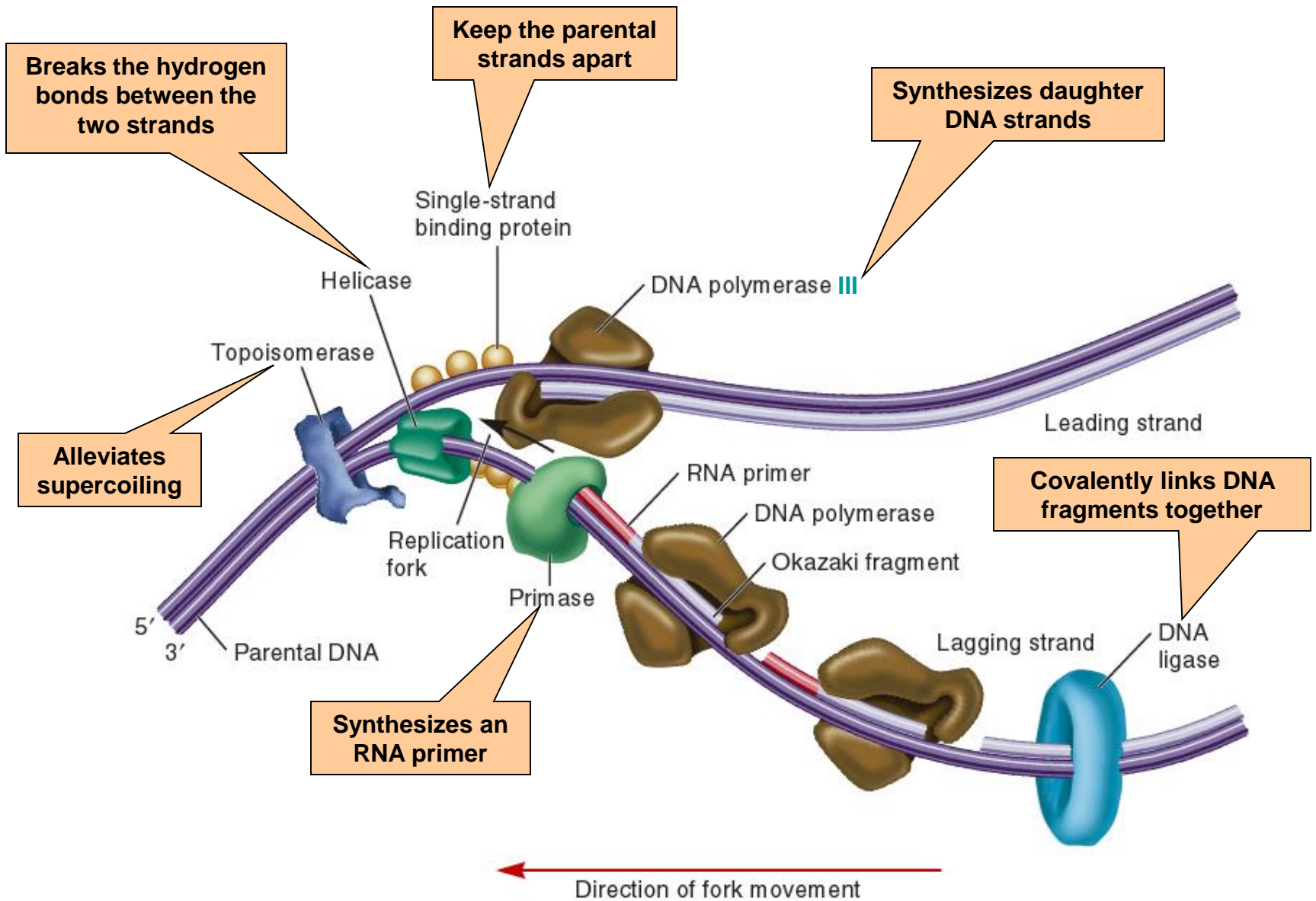
DNApol I



È un enzima monomero con tre diversi domini funzionali. È scarsamente processiva, presenta attività di proof-reading ed attività esonucleasica 5'-3' (quest'ultima caratteristica la rende capace della rimozione dei primers).



- **DNA pol I** removes the RNA primers and fills the resulting gap with DNA
 - It uses its 5' to 3' exonuclease activity to digest the RNA and its 5' to 3' polymerase activity to replace it with DNA
- After the gap is filled a covalent bond is still missing
- **DNA ligase** catalyzes a phosphodiester bond
 - Thereby connecting the DNA fragments



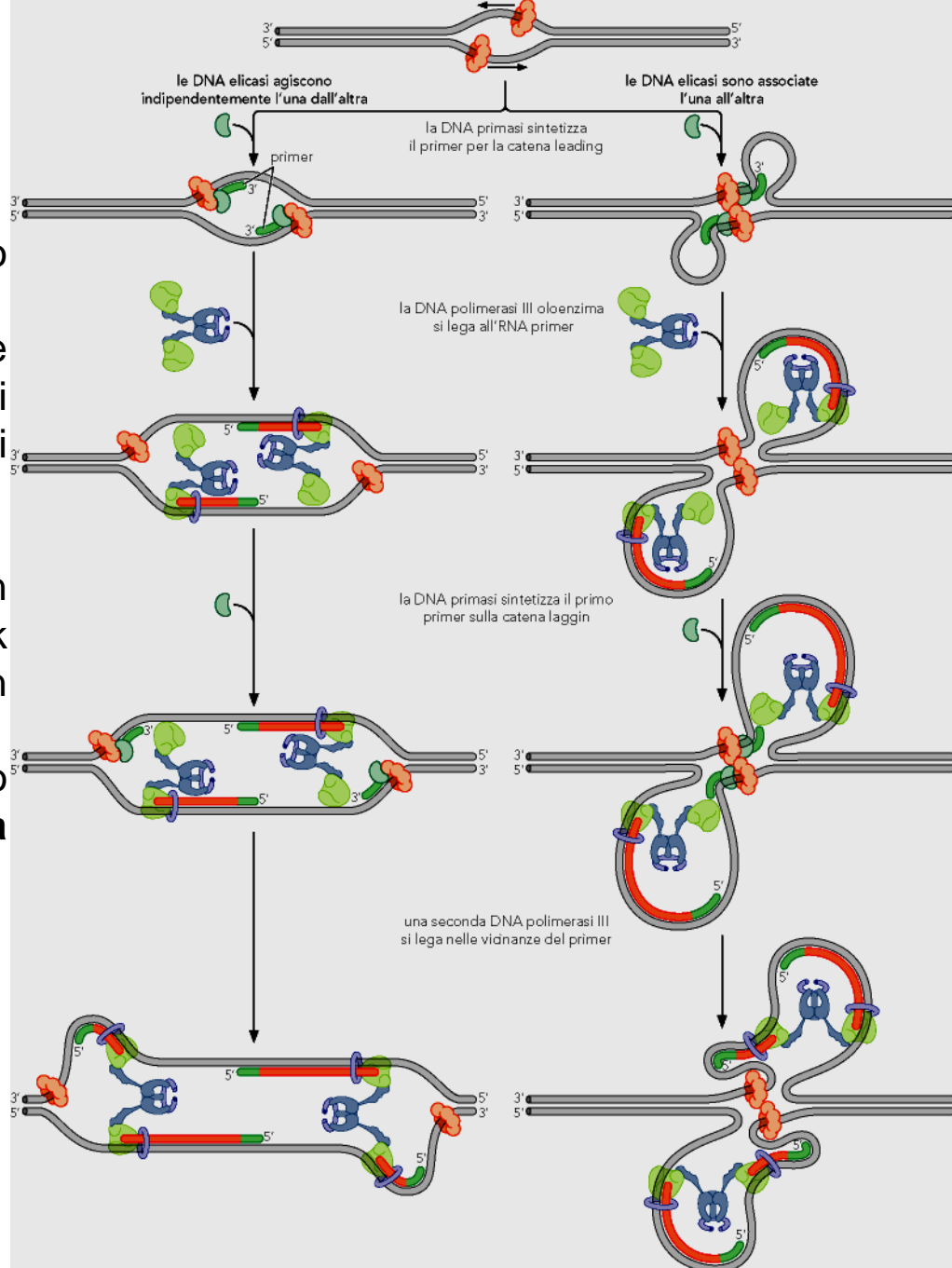
DNA Polymerase III is a Processive Enzyme

- DNA polymerase III remains attached to the template as it is synthesizing the daughter strand
- This **processive** feature is due to several different subunits in the DNA pol III holoenzyme
 - β subunit is in the shape of a ring
 - It is termed the clamp protein
 - γ subunit is needed for β to initially clamp onto the DNA
 - It is termed the clamp-loader protein
 - δ , δ' and ψ subunits are needed for the optimal function of the α and β subunits

DNA Polymerase III is a Processive Enzyme

- The effect of processivity is quite remarkable
 - In the absence of the β subunit
 - DNA pol III falls off the DNA template after a few dozen nucleotides have been polymerized
 - Its rate is ~ **20** nucleotides per second
 - In the presence of the β subunit
 - DNA pol III stays on the DNA template long enough to polymerize up to 50,000 nucleotides
 - Its rate is ~ **750** nucleotides per second

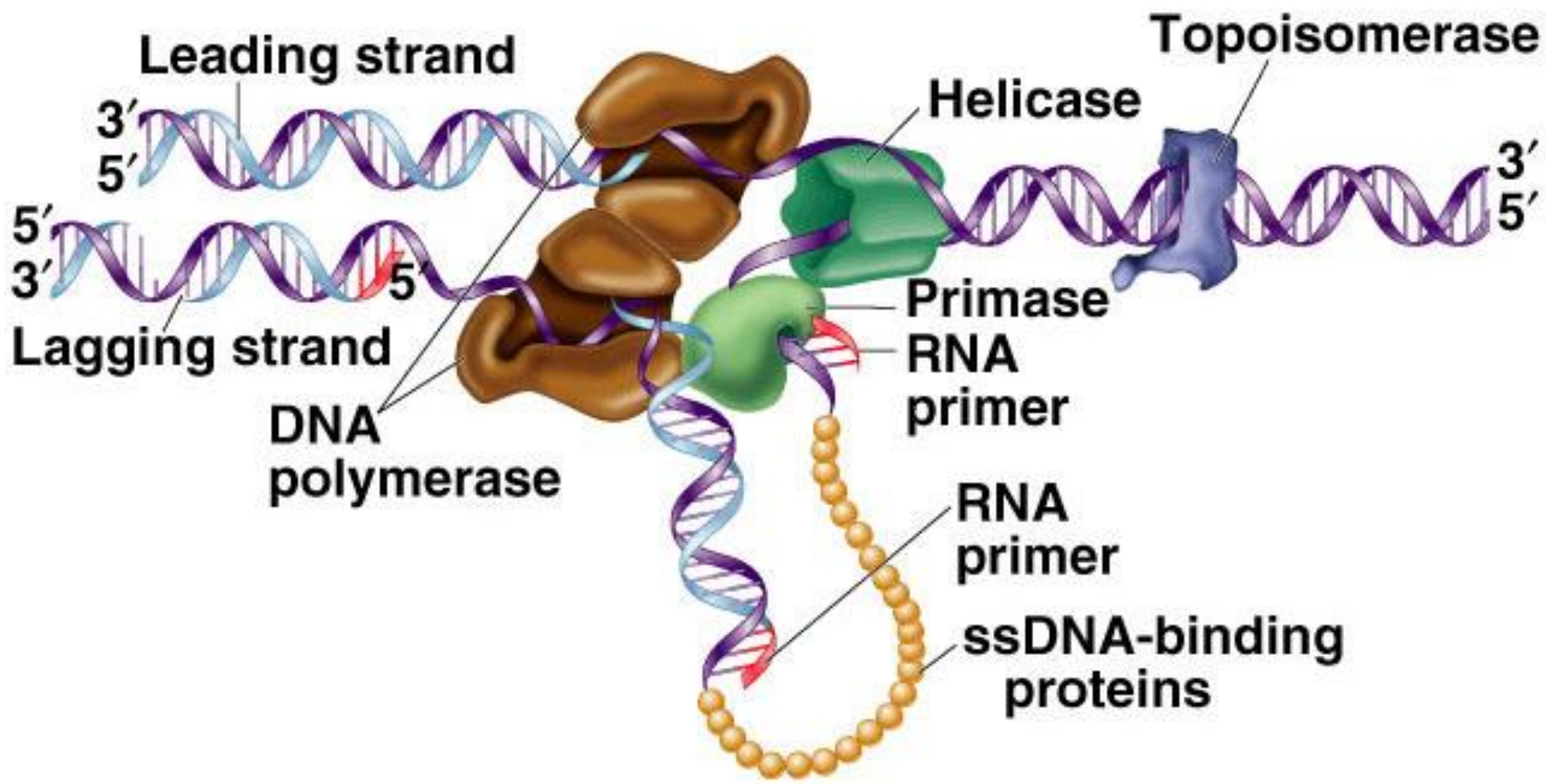
Il modello dei binari :
 Le elicasi lavorano indipendentemente, ed ognuno dei due complessi replicativi seguendo l'elicasi duplica contemporaneamente sia il filamento Watson che il filamento Crick come correndo su un doppio binario. In questo modello quindi è **il replisoma a muoversi**.



Il modello del doppio esamero :
 Le elicasi dopo l'inizio della replicazione interagiscono tra di loro rimanendo unite per tutto il processo di replicazione. In questo modello quindi il replisoma è statico ed è invece il DNA a muoversi attraverso; inoltre ognuno dei due oloenzimi lavora (dimericamente) su uno soltanto dei filamenti o su quello di Watson o su quello di Crick

DNA Replication Complexes

- DNA helicase and primase are physically bound to each other to form a complex called the **primosome**
 - This complex leads the way at the replication fork
- The primosome is physically associated with the DNA polymerase holoenzyme forming the **replisome**



DNA Replication Complexes

- Two DNA pol III proteins act in concert to replicate both the leading and lagging strands
 - The two proteins form a **dimeric DNA polymerase** that moves as a unit toward the replication fork
- DNA polymerases can only synthesize DNA in the 5' to 3' direction
 - So synthesis of the leading strand is continuous
 - And that of the lagging strand is discontinuous

DNA Replication Complexes

- Lagging strand synthesis is summarized as such:
 - The lagging strand is looped
 - This allows the attached DNA polymerase to synthesize the Okazaki fragments in the normal 5' to 3' direction
 - Upon completion of an Okazaki fragment, the enzyme releases the lagging template strand
 - Another loop is then formed
 - This process is repeated over and over again

Proofreading Mechanisms

- DNA replication exhibits a high degree of **fidelity**
 - Mistakes during the process are extremely rare
 - DNA pol III makes only one mistake per 10^8 bases made
- There are several reasons why fidelity is high
 - 1. Instability of mismatched pairs
 - 2. Configuration of the DNA polymerase active site
 - 3. Proofreading function of DNA polymerase

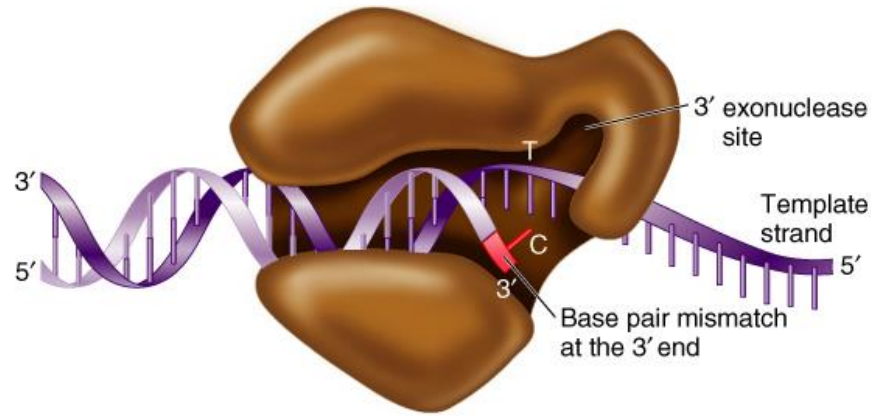
Proofreading Mechanisms

- 1. Instability of mismatched pairs
 - Complementary base pairs have much higher stability than mismatched pairs
 - This feature only accounts for part of the fidelity
 - It has an error rate of 1 per 1,000 nucleotides
- 2. Configuration of the DNA polymerase active site
 - DNA polymerase is unlikely to catalyze bond formation between mismatched pairs
 - This induced-fit phenomenon decreases the error rate to a range of 1 in 100,000 to 1 million

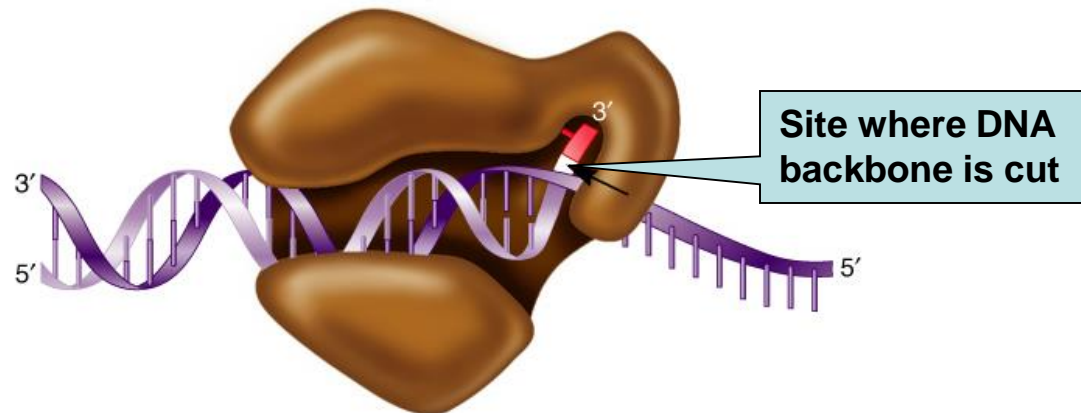
Proofreading Mechanisms

- 3. Proofreading function of DNA polymerase
 - DNA polymerases can identify a mismatched nucleotide and remove it from the daughter strand
 - The enzyme uses its 3' to 5' **exonuclease** activity to remove the incorrect nucleotide
 - It then changes direction and resumes DNA synthesis in the 5' to 3' direction

Mismatch causes DNA polymerase to pause, leaving mismatched nucleotide at the 3' end.

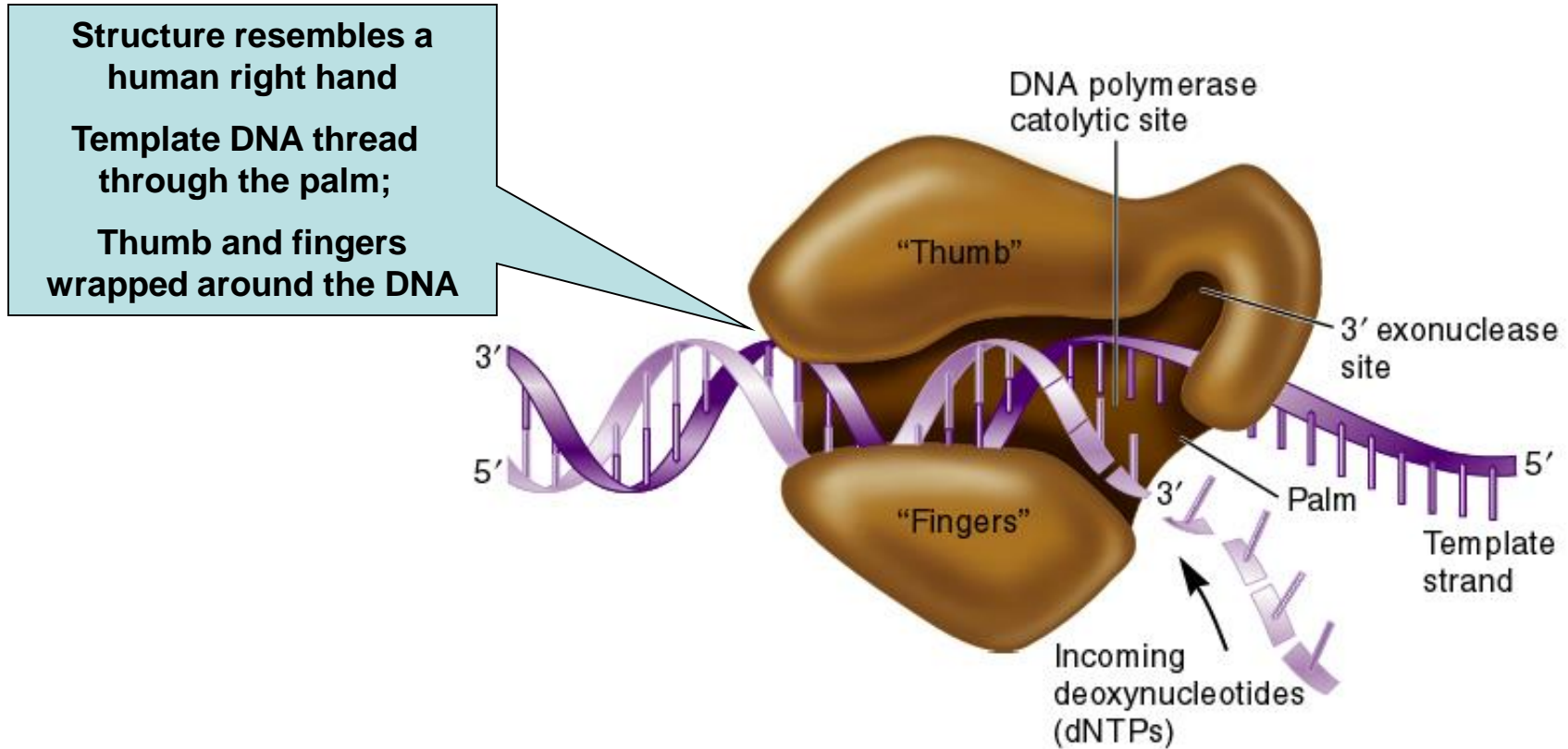


The 3' end enters the exonuclease site, which cuts the DNA backbone to release the mismatched nucleotide,



A schematic drawing of proofreading

- Bacterial DNA polymerases may vary in their subunit composition
 - However, they have the same type of catalytic subunit

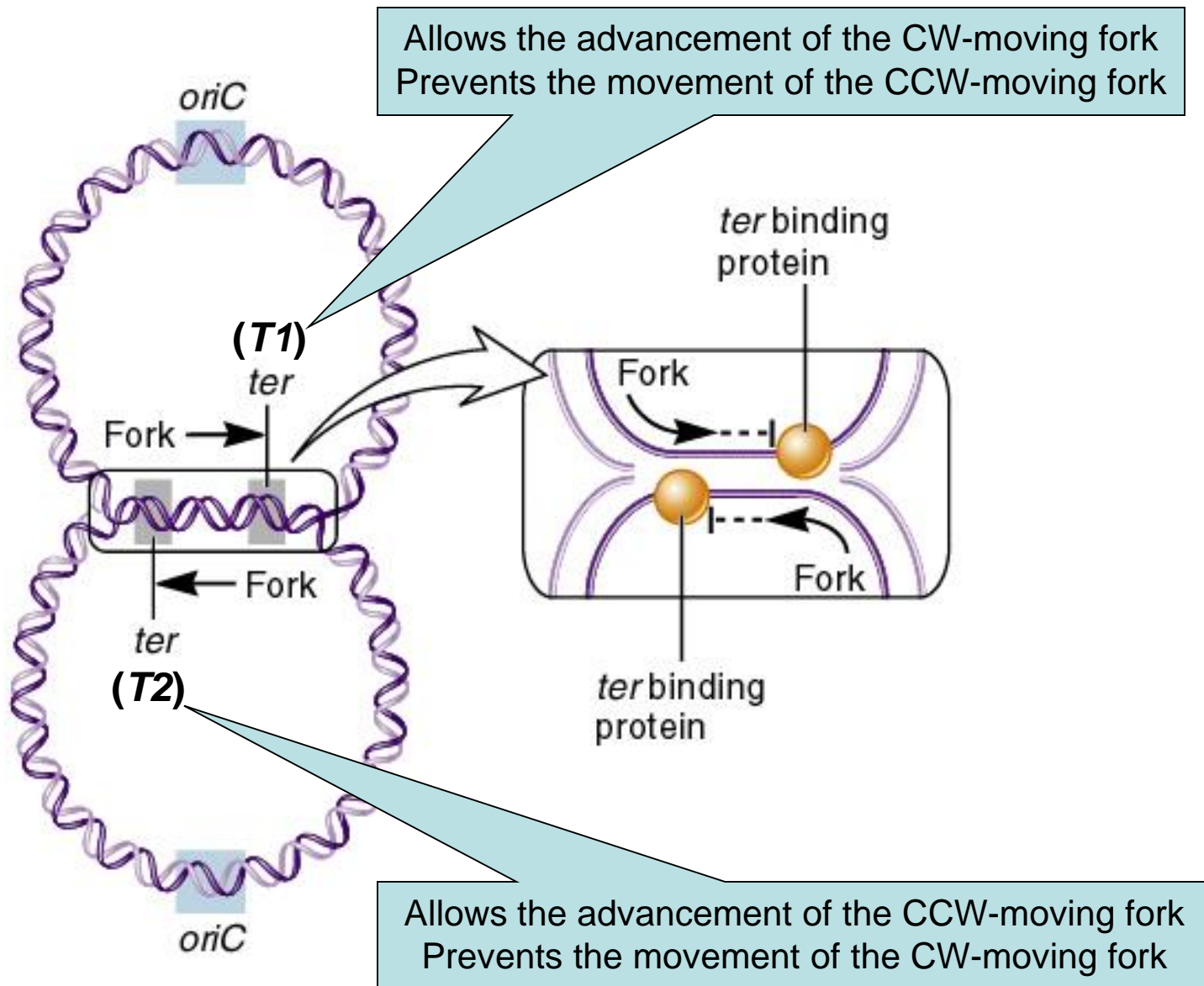


(a) Schematic side view of DNA polymerase

Terminazione

Termination of Replication

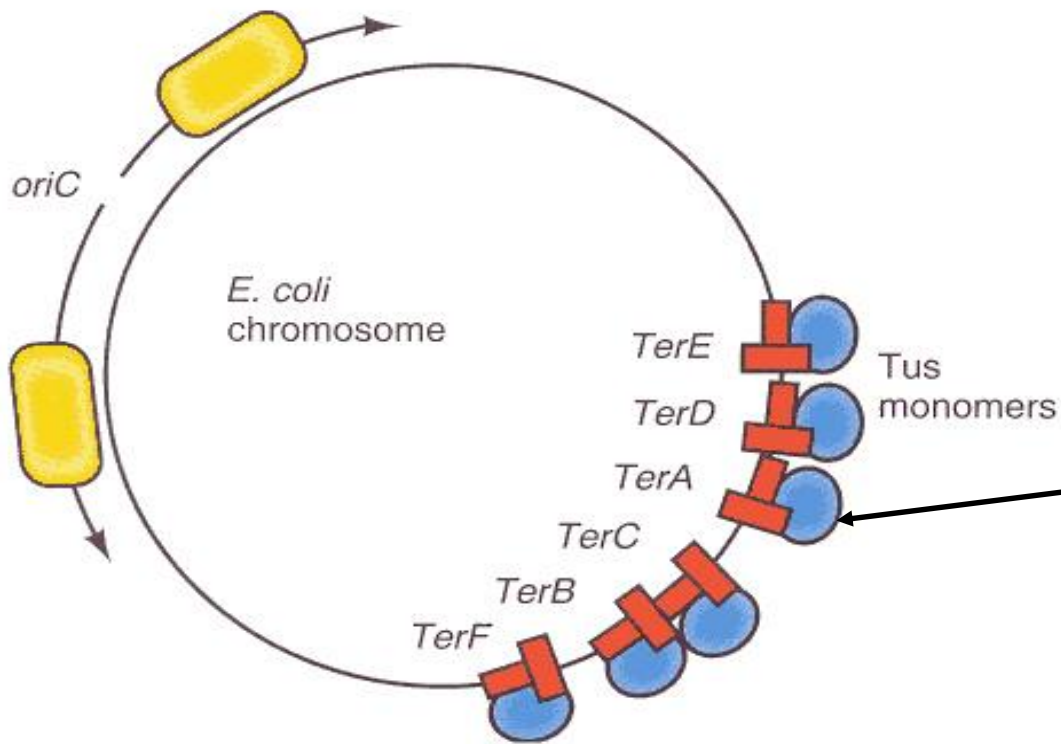
- Opposite to *oriC* is a pair of **termination sequences** called *ter* sequences
 - These are designated *T1* and *T2*
- The protein **tus** (**t**ermination **u**tilization **s**ubstance) binds to these sequences
 - It can then stop the movement of the replication forks



Termination of Replication

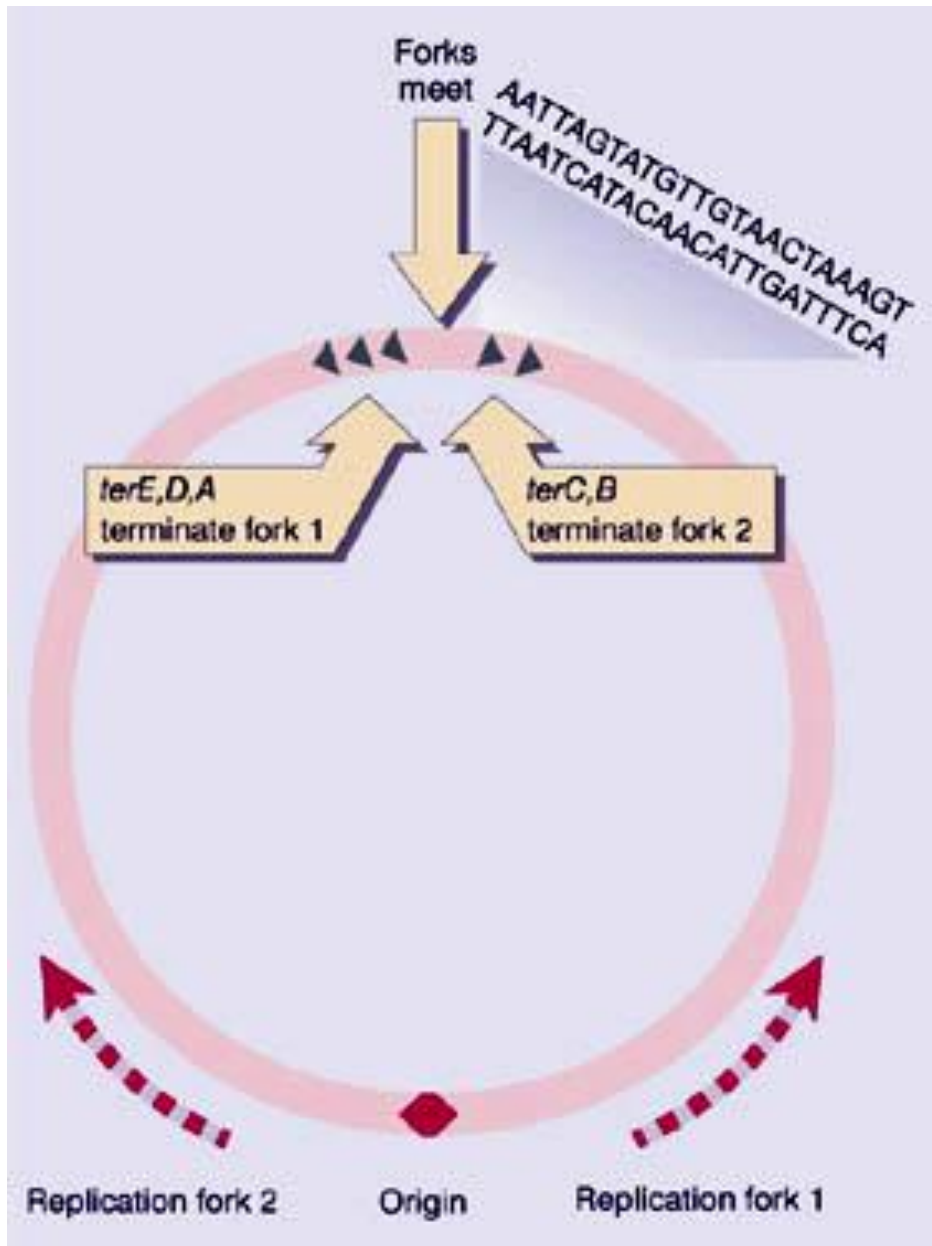
- DNA replication ends when oppositely advancing forks meet (usually at *T1* or *T2*)
- Finally DNA ligase covalently links all four DNA strands
- DNA replication often results in two intertwined molecules
 - Intertwined circular molecules are termed **catenanes**
 - These are separated by the action of topoisomerases

Termination of Replication



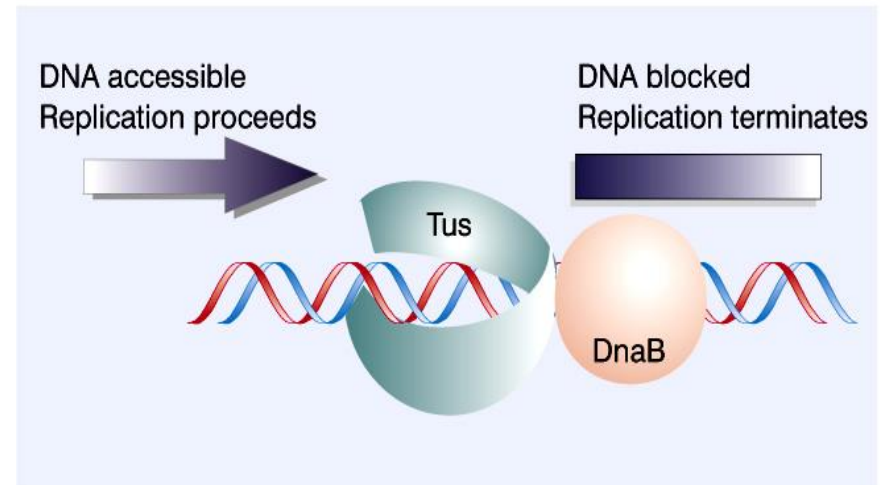
Tus Protein-arrests replication fork motion

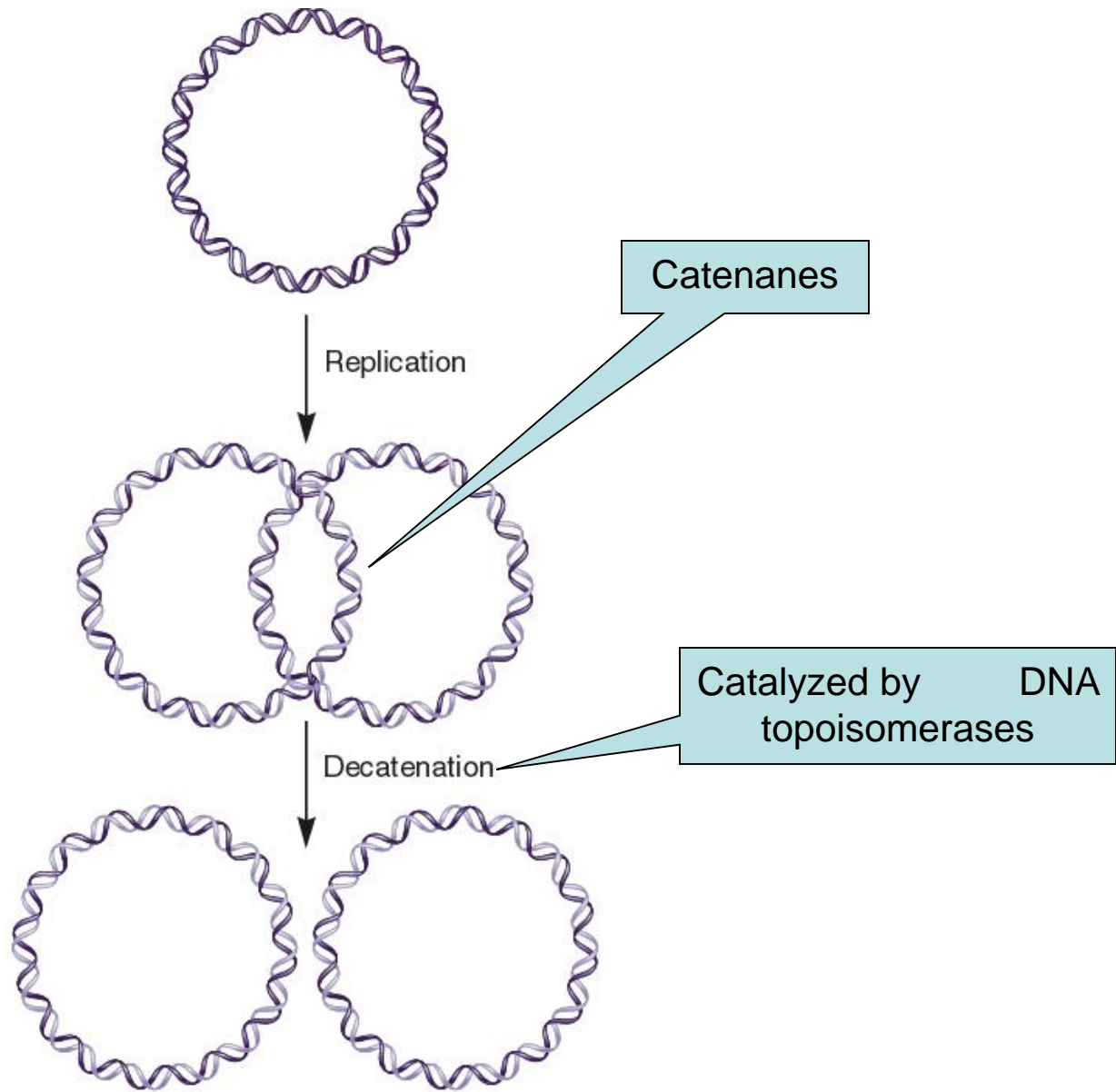
- Occurs at specific site opposite *ori c*
- ~350 kb
- Flanked by 6 nearly identical *non-palindromic*^{*}, 23 bp terminator (*ter*) sites

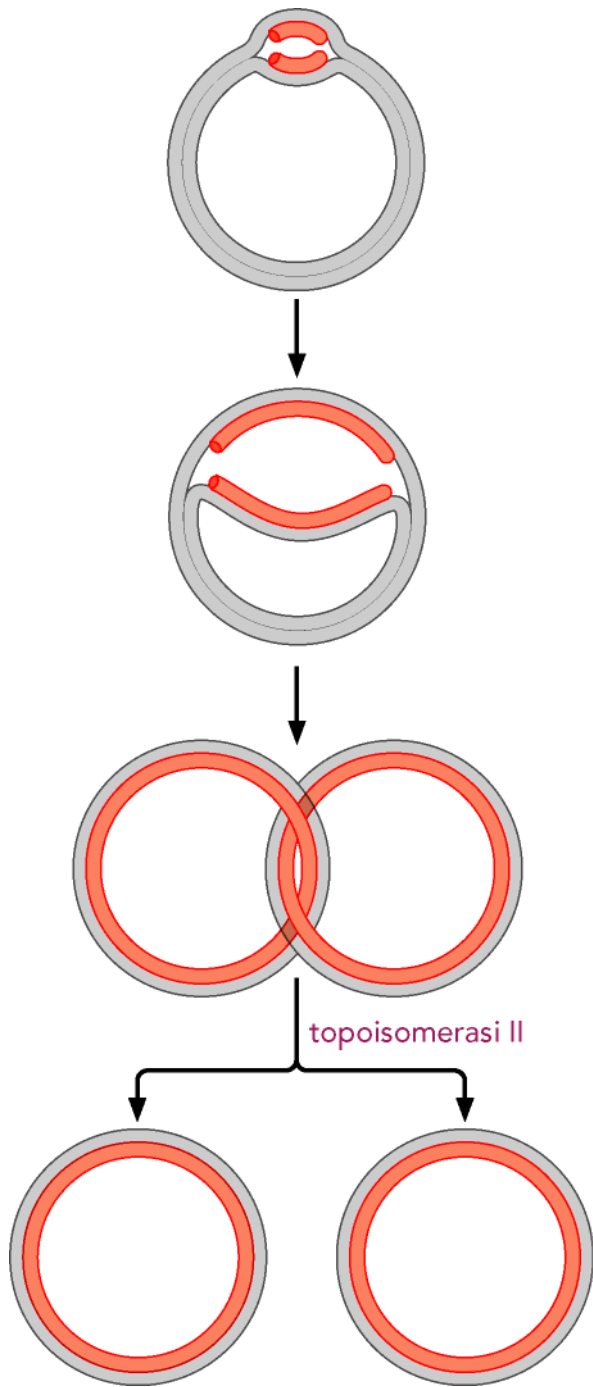


In *E. coli* i siti in cui termina la replicazione sono localizzati al di là del punto in cui si incontrano le due forcelle replicative.

Tus si lega a ter in modo asimmetrico e blocca la replicazione in una sola direzione.



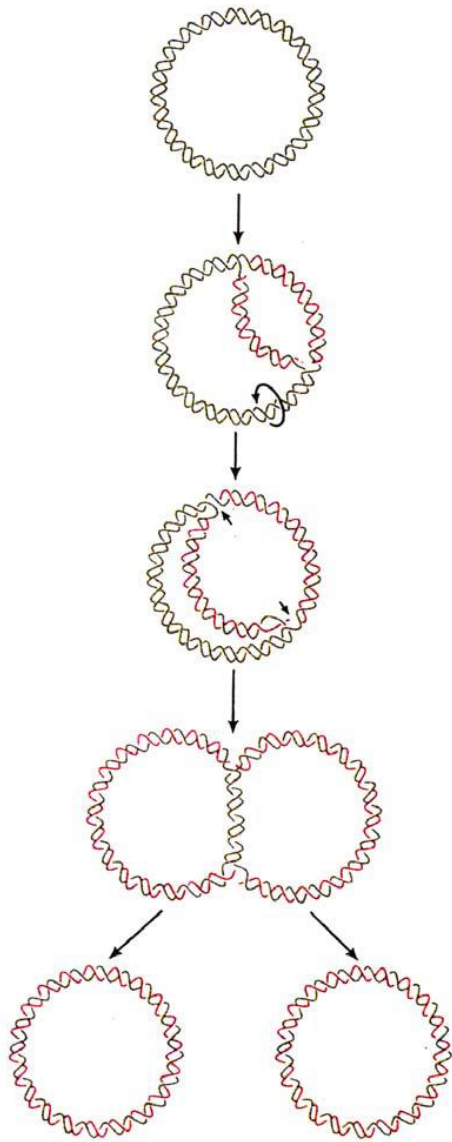




Terminazione della replicazione

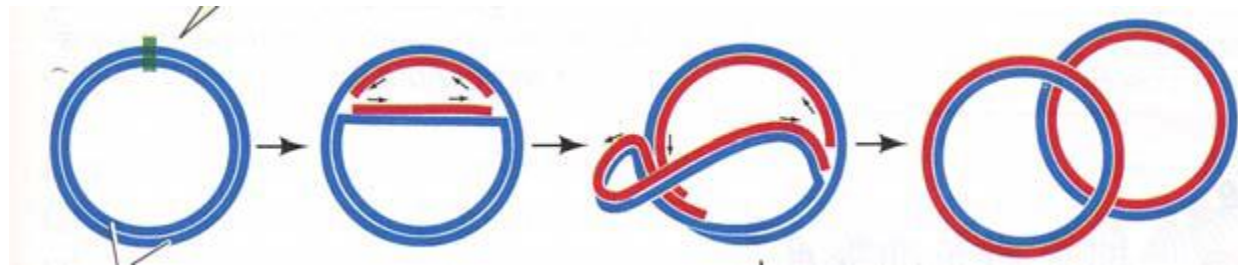
E' diversa a seconda che i cromosomi siano circolari o lineari. Se sono circolari il complesso replicativo può terminare la replicazione ma i cromosomi replicati restano incatenati, mentre se sono lineari non può replicare completamente i terminali.

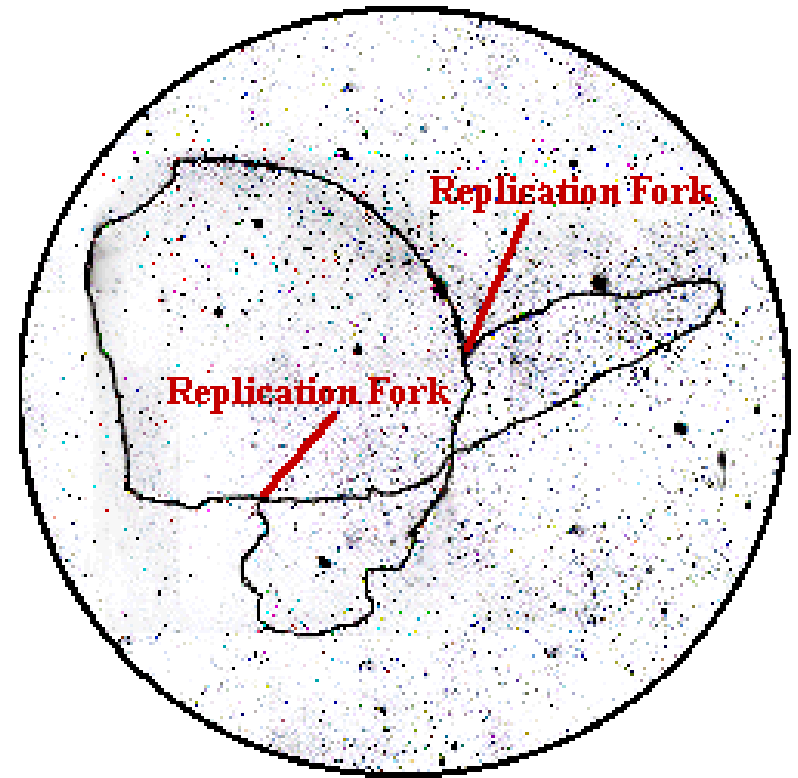
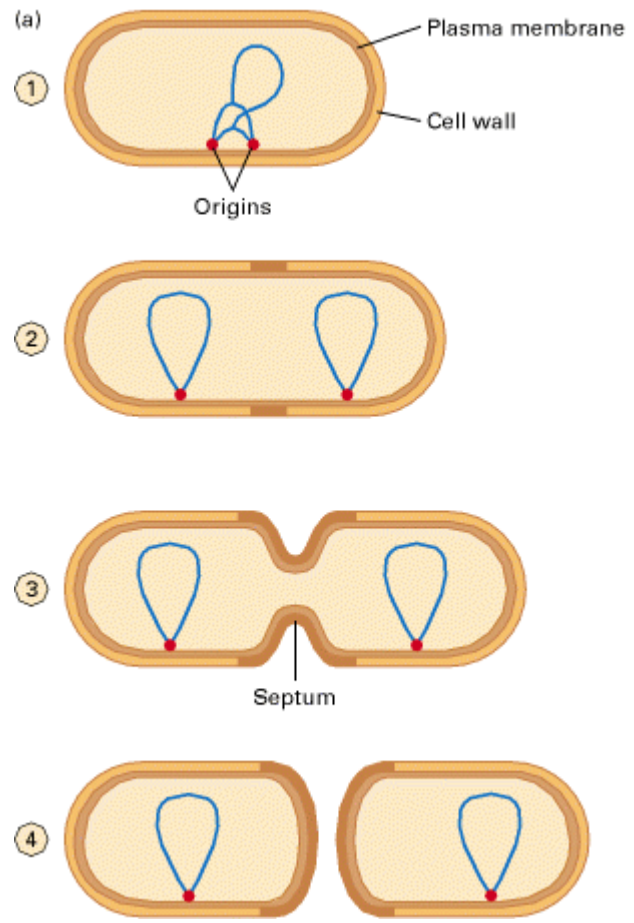
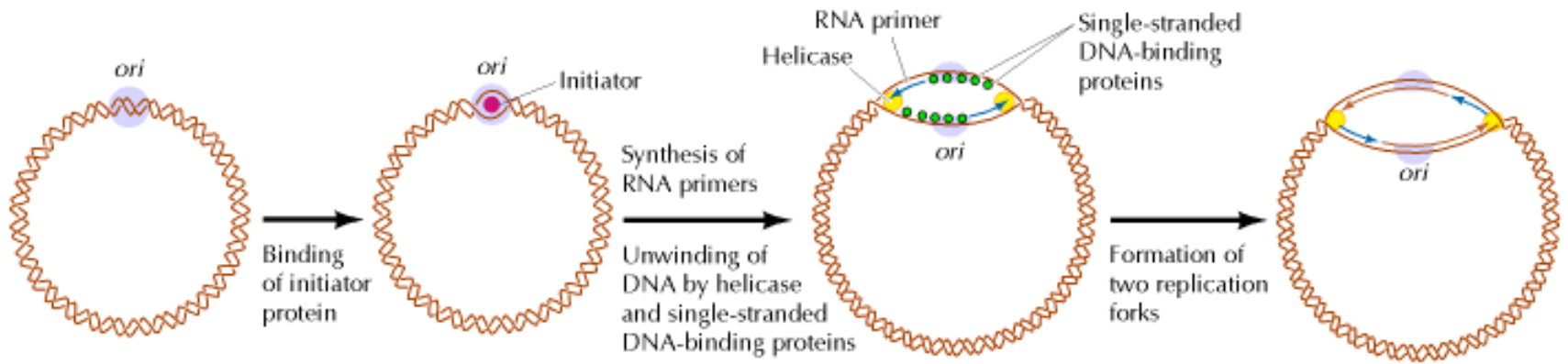
I cromosomi circolari replicati vengono separati da topoisomerasi di tipo II, che è necessaria anche per la corretta segregazione dei cromosomi lineari, formati da molte anse topologicamente indipendenti.



Meccanismo di replicazione a theta (θ)

Nei procarioti anche meccanismo di replicazione a sigma (σ)





Nella replicazione di *Escherichia coli*

DNA stampo (elica singola) + primer + dATP, dCTP, dGTP, dTTP



La **DNAP III**:

1. Allunga la doppia elica in direzione 5'—3'
2. Controlla l'appaiamento fra basi, e se è imperfetto rimuove l'ultimo nucleotide aggiunto (attività proof-reading)

La **DNAP I**:

1. Degrada l'RNA nella doppia elica in direzione 5'—3'
2. Allunga la doppia elica, estendendo il frammento in direzione 5'—3' e rimpiazzando l'RNA stampo

La **DNA PII** ripara il DNA danneggiato

Initiation of replication, major elements:

- ✓ **Segments of single-stranded DNA are called template strands.**
- ✓ **Gyrase (a type of topoisomerase) relaxes the supercoiled DNA.**
- ✓ **Initiator proteins and DNA helicase binds to the DNA at the replication fork and untwist the DNA using energy derived from ATP (adenosine triphosphate).
(Hydrolysis of ATP causes a shape change in DNA helicase)**
- ✓ **DNA primase next binds to helicase producing a complex called a primosome (primase is required for synthesis),**
- ✓ **Primase synthesizes a short RNA primer of 10-12 nucleotides, to which DNA polymerase III adds nucleotides.**
- ✓ **Polymerase III adds nucleotides 5' to 3' on both strands beginning at the RNA primer.**
- ✓ **The RNA primer is removed and replaced with DNA by polymerase I, and the gap is sealed with DNA ligase.**
- ✓ **Single-stranded DNA-binding (SSB) proteins (>200) stabilize the single-stranded template DNA during the process.**

TABLE 11.1

Proteins Involved in *E. coli* DNA Replication

Common Name	Function
DnaA protein	Binds to DnaA boxes within the origin to initiate DNA replication
DNA helicase (DnaB)	Separates double-stranded DNA
DnaC protein	Aids DnaA in the recruitment of helicase to the origin
Topoisomerase	Removes supercoils ahead of the replication fork
DNA primase	Synthesizes short RNA primers
DNA polymerase (polIII)	Synthesizes DNA in the leading and lagging strands
DNA polymerase (polI)	Removes RNA primers, fills in gaps
DNA ligase	Covalently attaches adjacent Okazaki fragments
Tus	Binds to <i>ter</i> sequences and prevents the advancement of the replication fork

Bacterial DNA Replication is Coordinated with Cell Division

- Bacterial cells can divide into two daughter cells at an amazing rate
 - *E. coli* → 20 to 30 minutes
 - Therefore it is critical that DNA replication take place only when a cell is about to divide
- Bacterial cells regulate the DNA replication process by controlling the initiation of replication at *oriC*
 - *E. coli* does this via two different mechanisms

Inizio della replicazione negli eucarioti

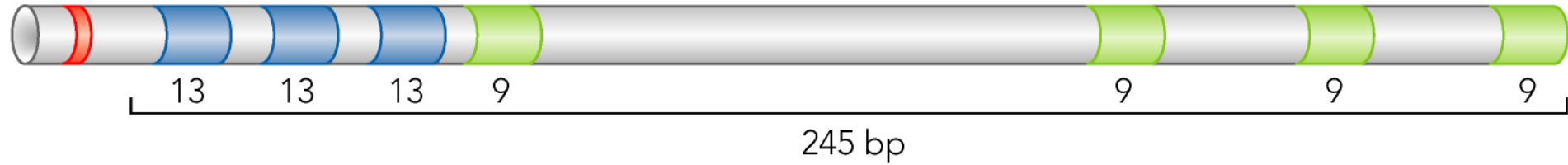
E.coli: la proteina iniziatore (Dna A) si lega alle 4 sequenze di 9 bp. Dopo aver legato ATP, riesce ad interagire anche con la regioni di 13 bp, denaturando ~20 bp, poi recluta le altre proteine di inizio.

Eucarioti: l'iniziatore è una proteina esamerica (ORC, origin recognition complex), ben studiata solo nel lievito. Anche ORC lega ATP, ma a differenza di DnaA, per separare i filamenti deve prima reclutare tutte le proteine di inizio.

Il replicatore include siti di legame (sequenze di DNA) per l'inziatore, e siti (sequenze di DNA) facilmente denaturabili

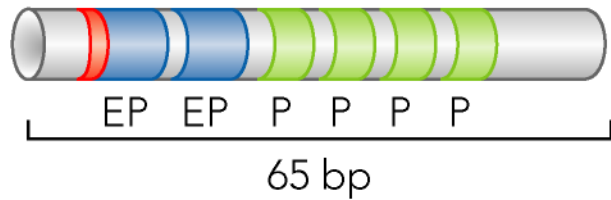
a

oriC (E. coli)



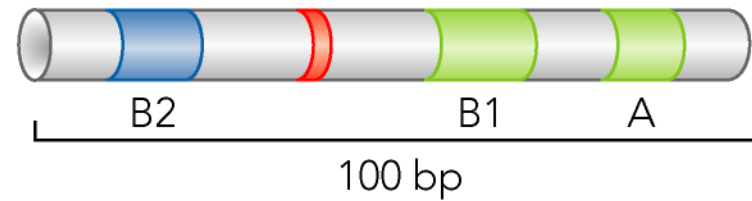
b

SV40



c

S. cerevisiae



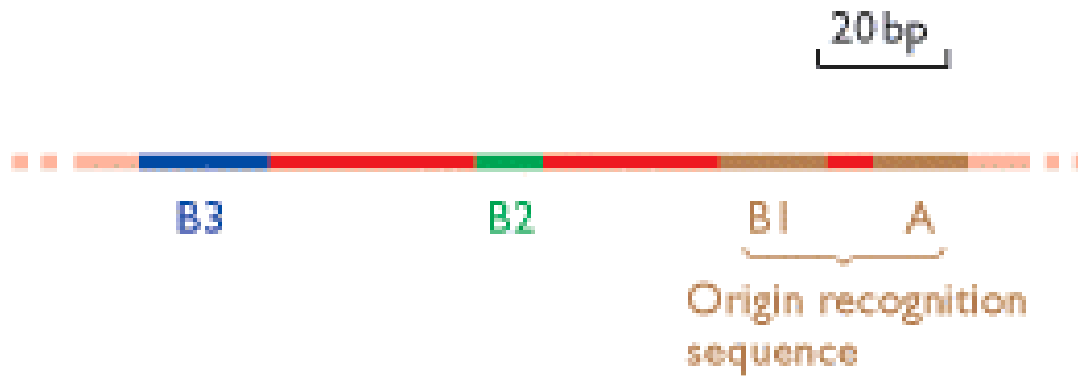
Caratteristiche queste comuni a tutti i replicatori dei vari organismi

- **Each eukaryotic chromosome is one linear DNA double helix**
- **Average $\sim 10^8$ base pairs long**
- **With a replication rate of 2 kb/minute, replicating one human chromosome would require ~ 35 days.**
- **Solution ---> DNA replication initiates at many different sites simultaneously.**

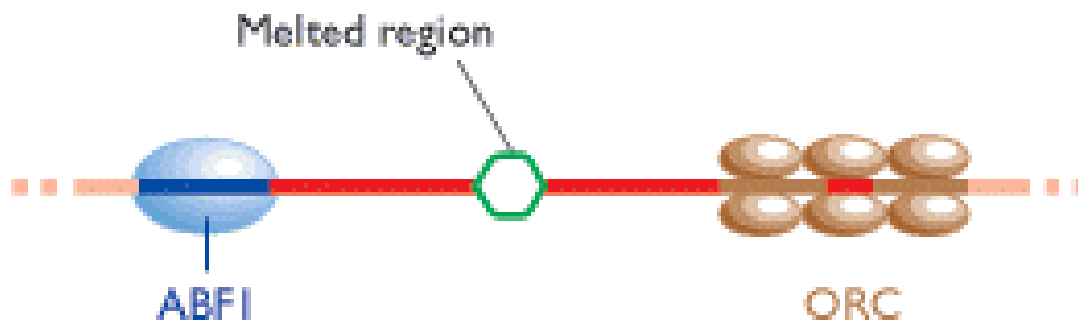
ORIGINE DELLA REPLICAZIONE DI LIEVITO (*S. CEREVISIAE*).

ARS1

(A) Structure of a yeast origin of replication



(B) Melting of the helix



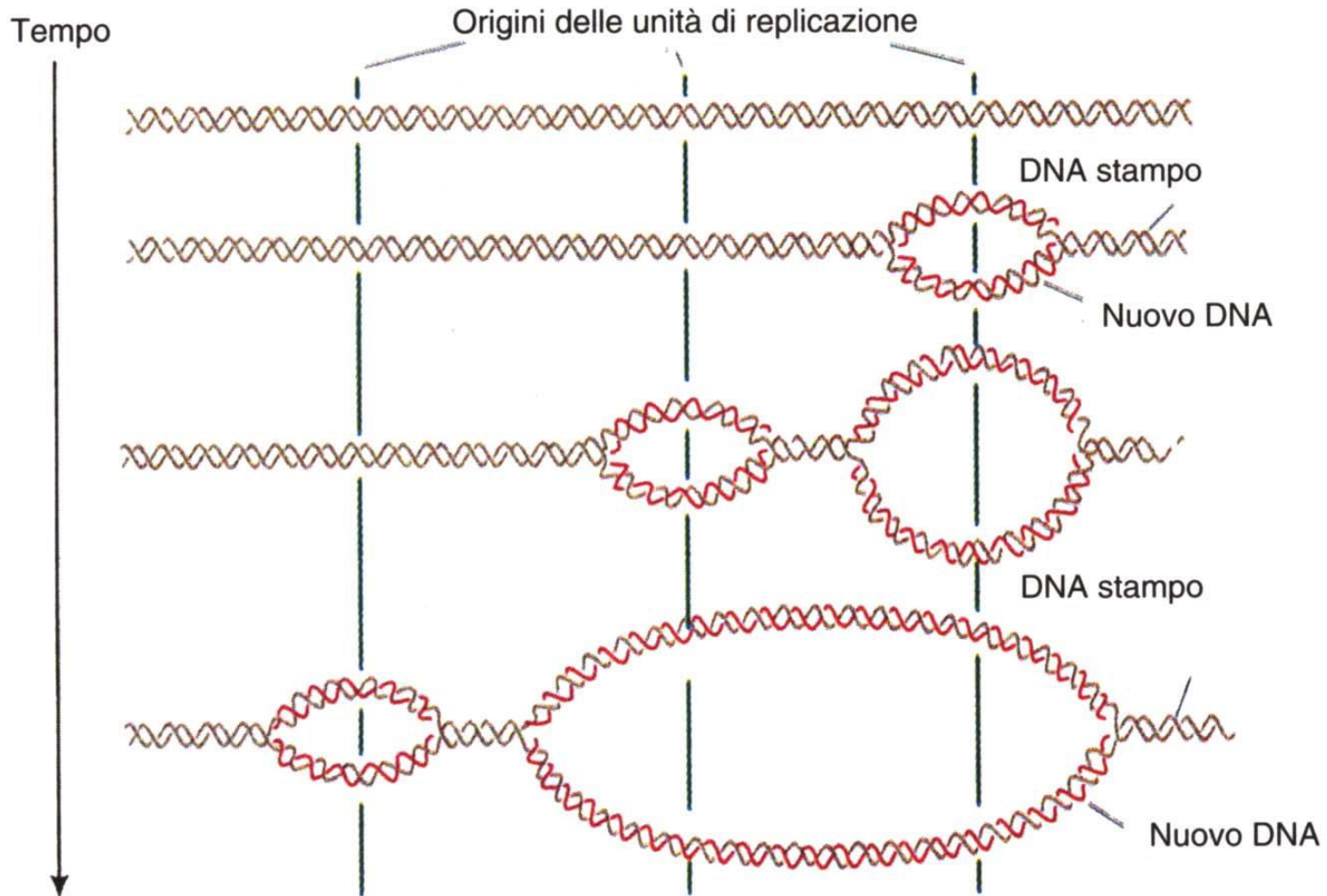
Il melting (denaturazione) della doppia elica avviene nel sub-dominio B2, ed è indotto dall'attacco di ABF1 (ARS binding protein 1) al sub-dominio B3.

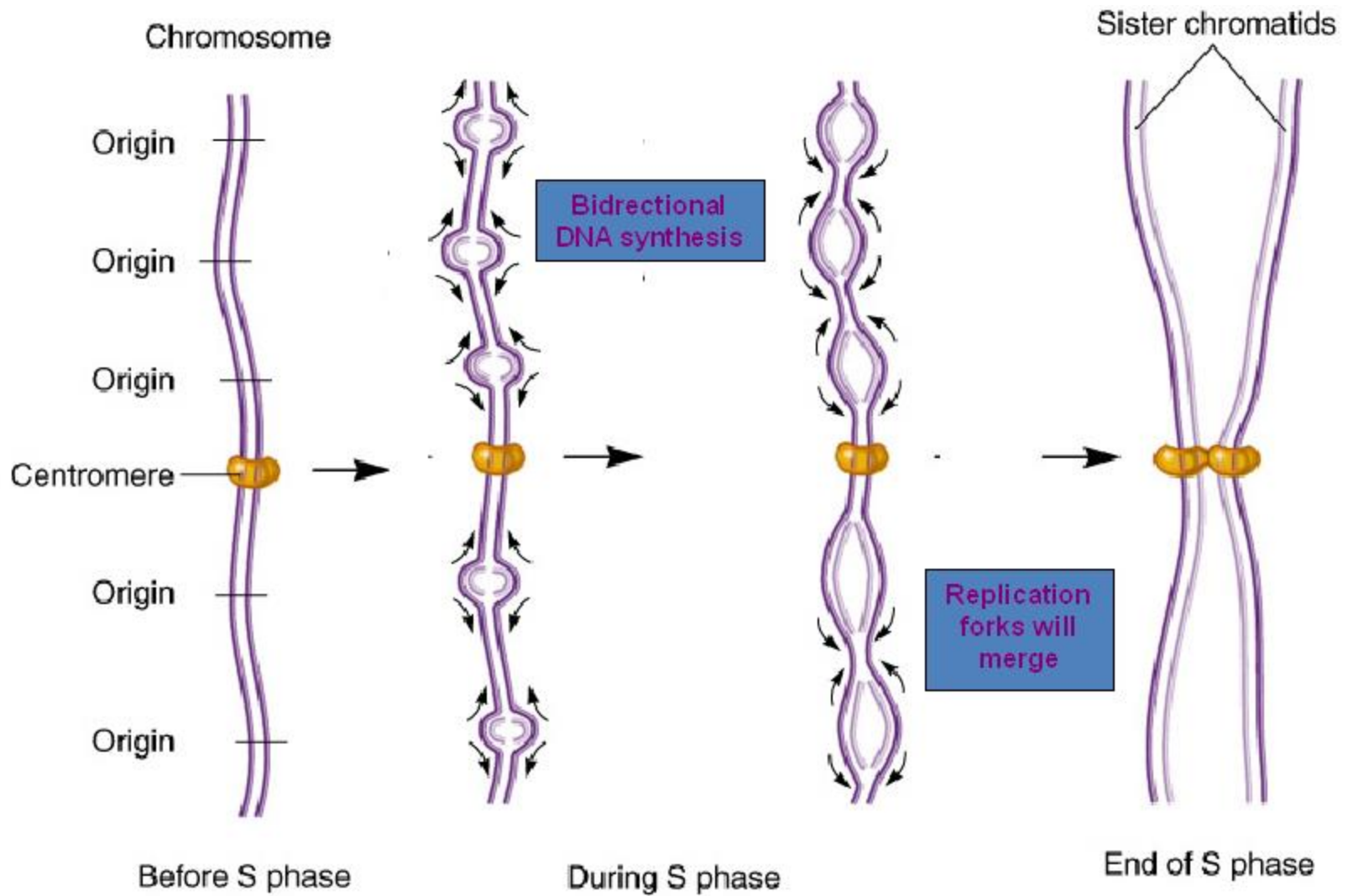
Le proteine del complesso di origine della replicazione (ORC) sono permanentemente attaccate ai sub-domini A e B1.

Le origini di replicazione in tutti gli organismi in cui siano state identificate mostrano proprietà simili

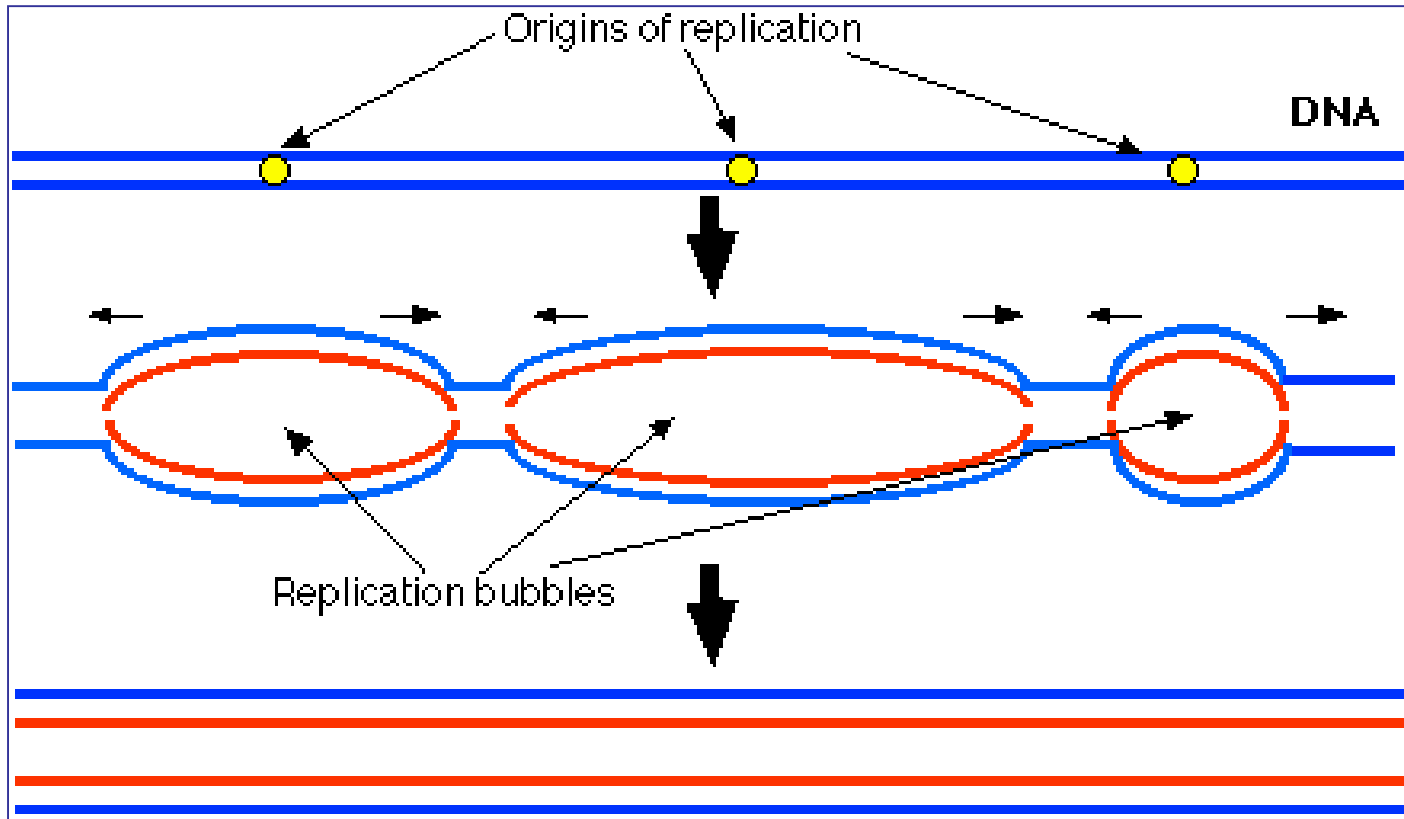
- Le origini sono segmenti di DNA che contengono brevi sequenze ripetute multiple**
- Queste sequenze vengono riconosciute e legate da proteine multimeriche specifiche, che giocano un ruolo chiave nell'attivazione dell'origine e nel successivo assemblaggio della DNA polimerasi**
- Le regioni dell'origine contengono sequenze ricche in AT (appaiamenti che facilitano la denaturazione dell'elica)**

ORI Eucarioti (ARS sequences nel lievito): asincrona e repliconi diversi





ORIGINI DI REPLICAZIONE (Eucarioti multicellulari)



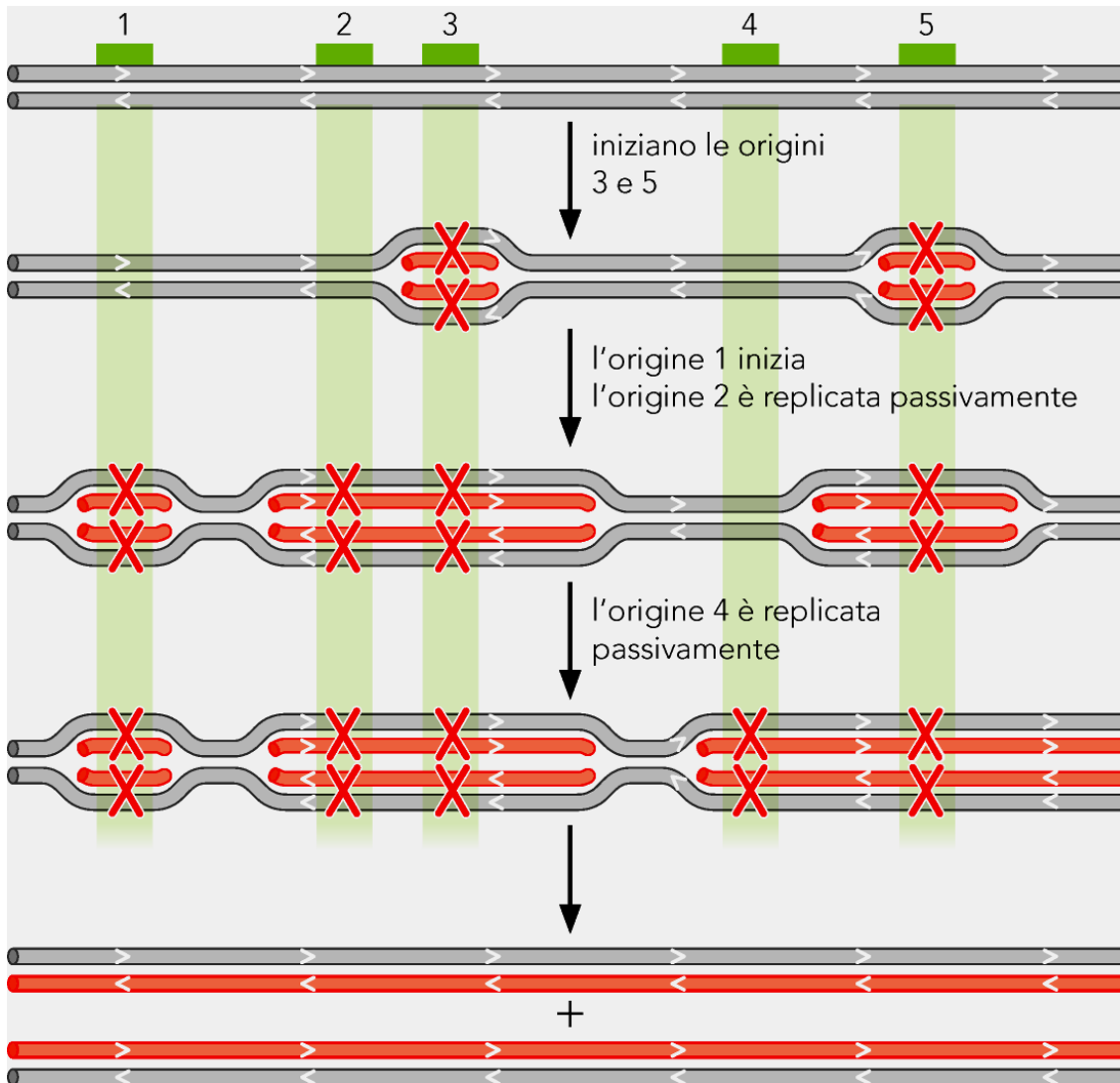
Negli eucarioti multicellulari esistono da 20.000 a 50.000 origini di replicazione (ne sono state mappate una ventina)

Sono tutte localizzate in siti specifici , hanno lunghezza variabile e non mostrano sequenze consensus.

Le origini potrebbero essere definite da diverse combinazioni di elementi di sequenza.

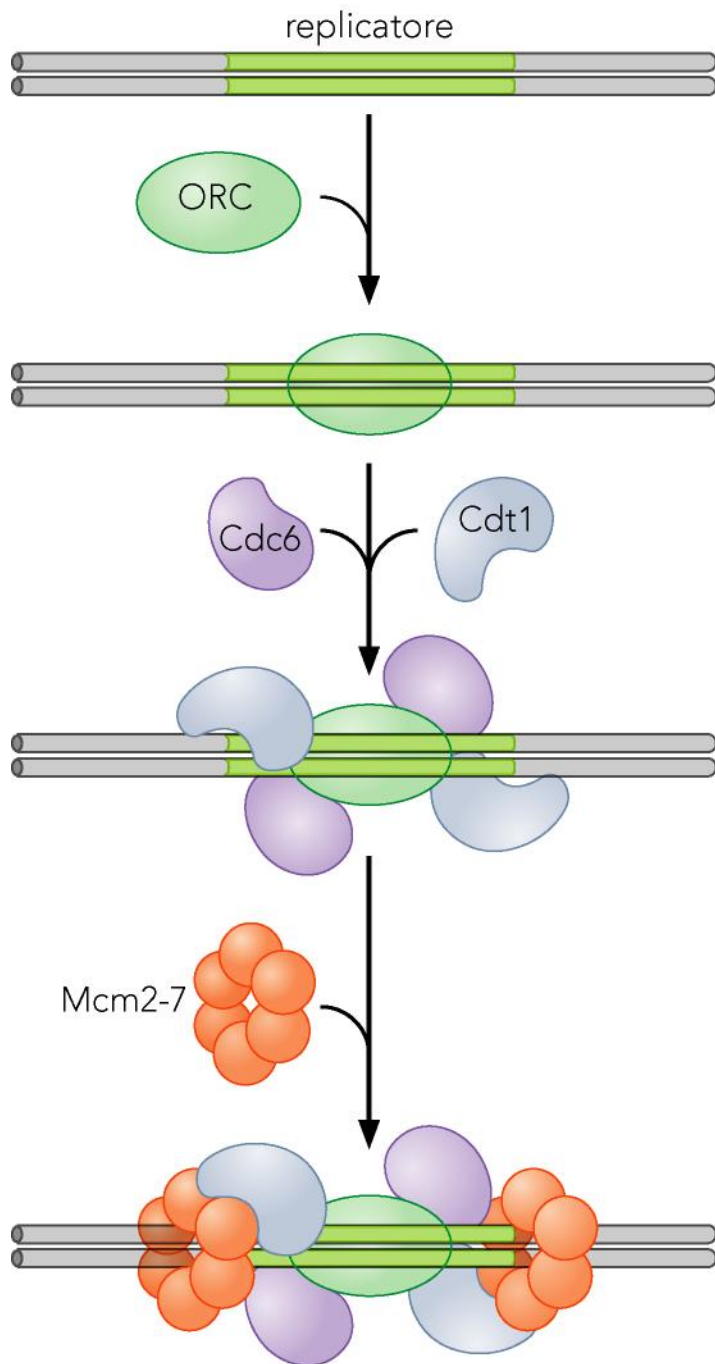
Non è detto che ci sia una singola combinazione consensus che definisce un'origine.

Negli eucarioti non tutte le origini vengono attivate contemporaneamente



Una volta attivate le origini non possono ulteriormente essere attivate (contengono DNA neosintetizzato)

Alcune origini sono replicate passivamente (per estensione della/e bolla/e adiacenti); e non verranno quindi attivate poiché "contengono" DNA neosintetizzato

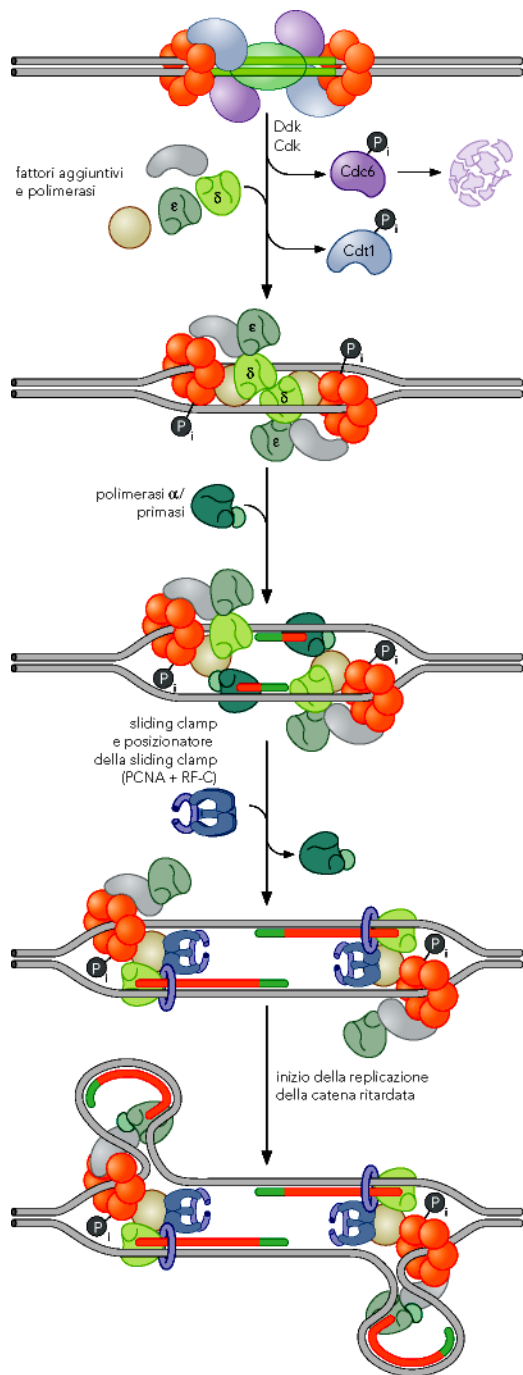


Perché la replicazione inizi, ciascuna origine deve essere legata da un complesso di pre-replicazione (preRC):

- **il complesso ORC (Origin Recognition Complex), il cui ruolo principale è quello di reclutare ulteriori componenti del complesso di selezione/attivazione**

- **proteine accessorie chiamate “licensing factors”(Cdc6 e Cdt1), che si accumulano nel nucleo durante la fase G1, si legano a ORC e sono essenziali per il reclutamento delle MCM (sono i caricatori delle elicasi)**

- **le proteine MCM (elicasi)**



L'attivazione del pre-RC porta all'assemblaggio della forza replicativa degli eucarioti:

Una volta attivato il pre-RC vengono rilasciati e degradati i caricatori delle elicasi (Cdc6 e Cdt1).

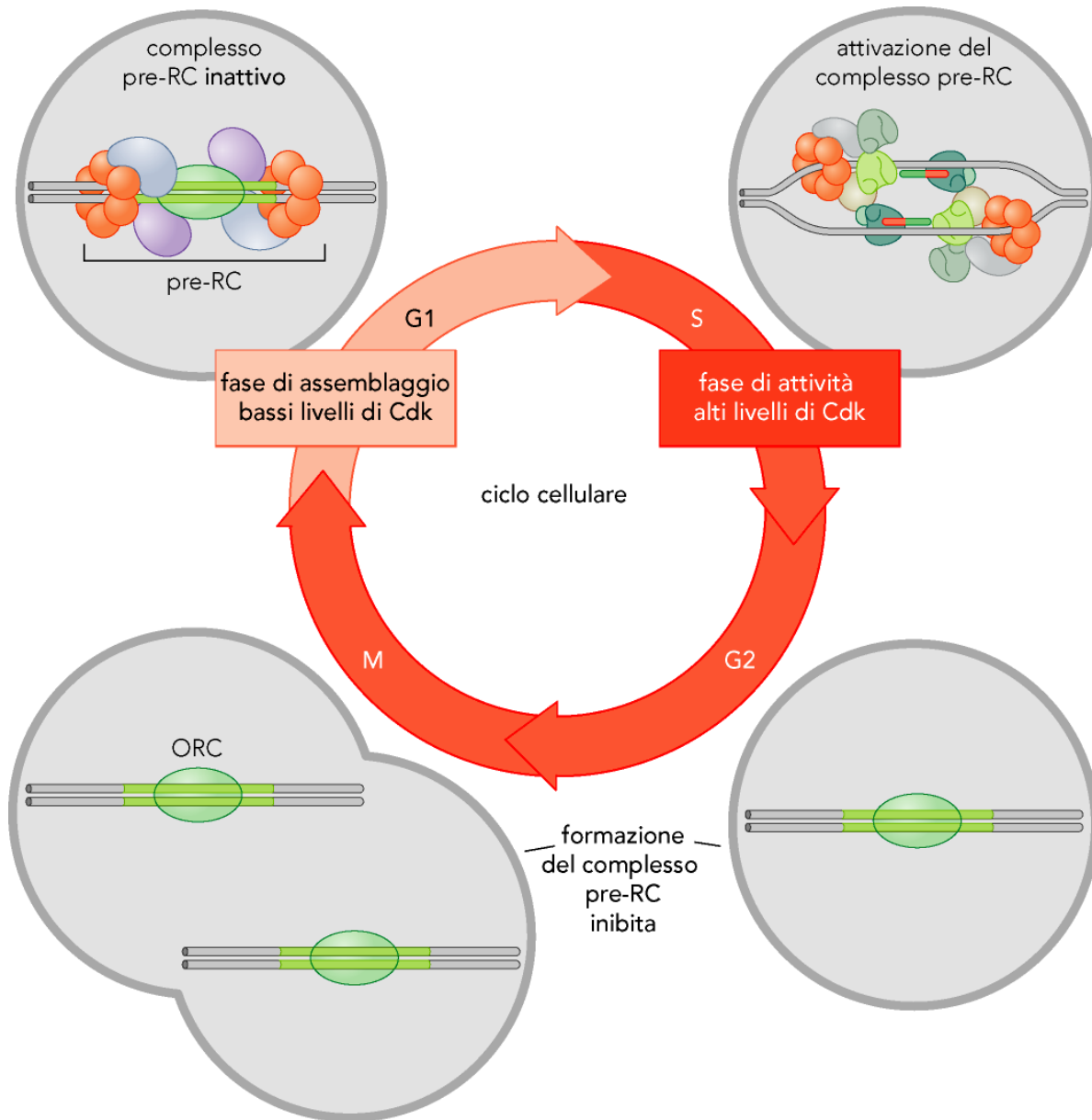
Vengono reclutate le polimerasi delta ed epsilon su entrambi le forche

Viene quindi reclutata la polimerasi alfa (la primasi) su entrambi i filamenti anticipati

Ed infine su entrambi i filamenti la viene reclutata la pinza beta (PCNA) insieme con il caricatore della pinza (RF-C)

Parte la sintesi dei filamenti anticipati
Ed in seguito quella dei filamenti ritardato che coinvolge ancora il caricatore di (una nuova) pinza beta

Il complesso di pre-replicazione è assemblato in fase G1, ma attivato in S

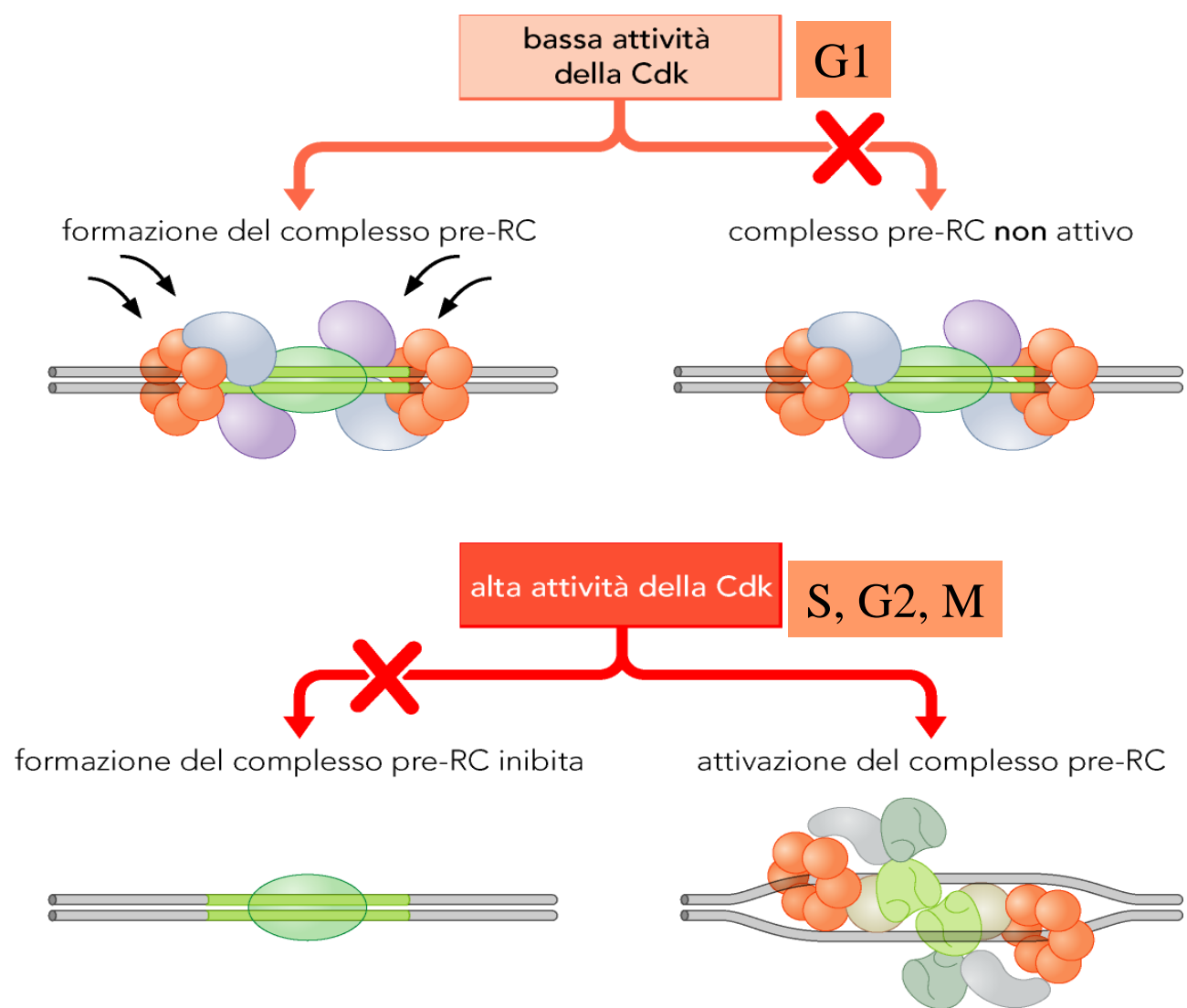


In condizioni normali (in cellule non trasformate), avviene una sola volta per ciclo cellulare ed in fasi ben precise dello stesso: viene assemblato in G1, ed attivato in S.

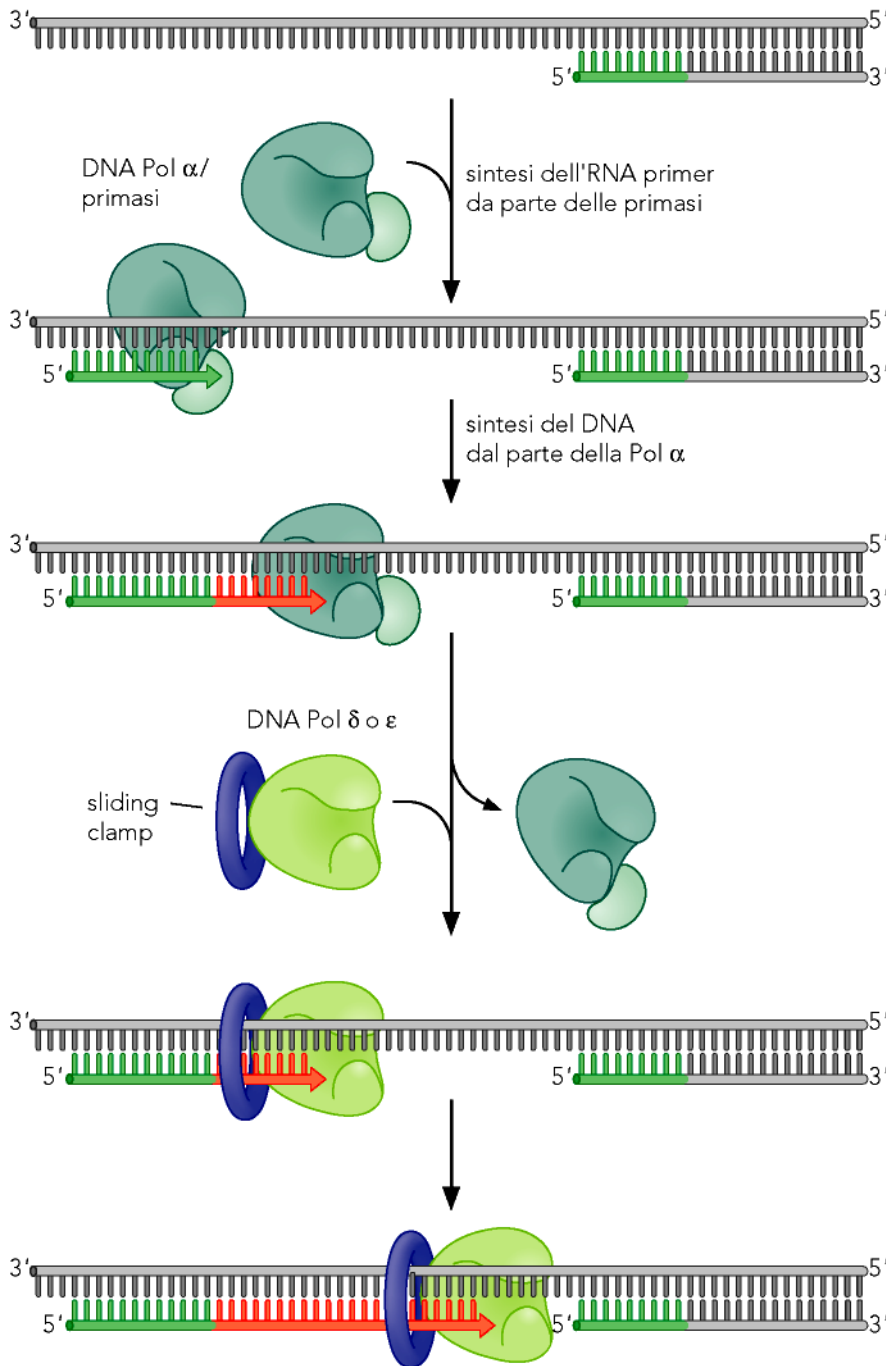
Per questo motivo controlla anche il numero delle copie di genoma replicate

Ruolo di CDK

CDK
impedisce la
formazione di
nuovi com-
plessi pre-RC e
attiva i com-
plessi pre-RC
già assemblati



Quindi controlla il numero di replicazioni/ciclo Tale controllo dipende anche dalla possibilità -per le proteine che devono formare il complesso di pre-replicazione- di avere libero accesso al replicatore, e ciò è facilitato dall'assenza dell'involucro nucleare che dipende dall'attività CDK



Negli eucarioti non esiste un analogo della DNA polimerasi III, per cui al livello della forza vengono reclutate due diverse polimerasi.

Poiché le diverse polimerasi esistenti negli eucarioti (tre di queste sono essenziali) hanno caratteristiche diverse vengono diversamente e sequenzialmente implicate nella replicazione:

La polimerasi alfa ha attività primasica, bassa processività e manca di attività proof-reading (viene implicata soltanto nelle fasi iniziali)

Le polimerasi delta ed epsilon hanno alta processività (interagiscono con la PCNA = pinza beta) ed attività di proof-reading sono quindi coinvolte nella replicazione delle due eliche stampo

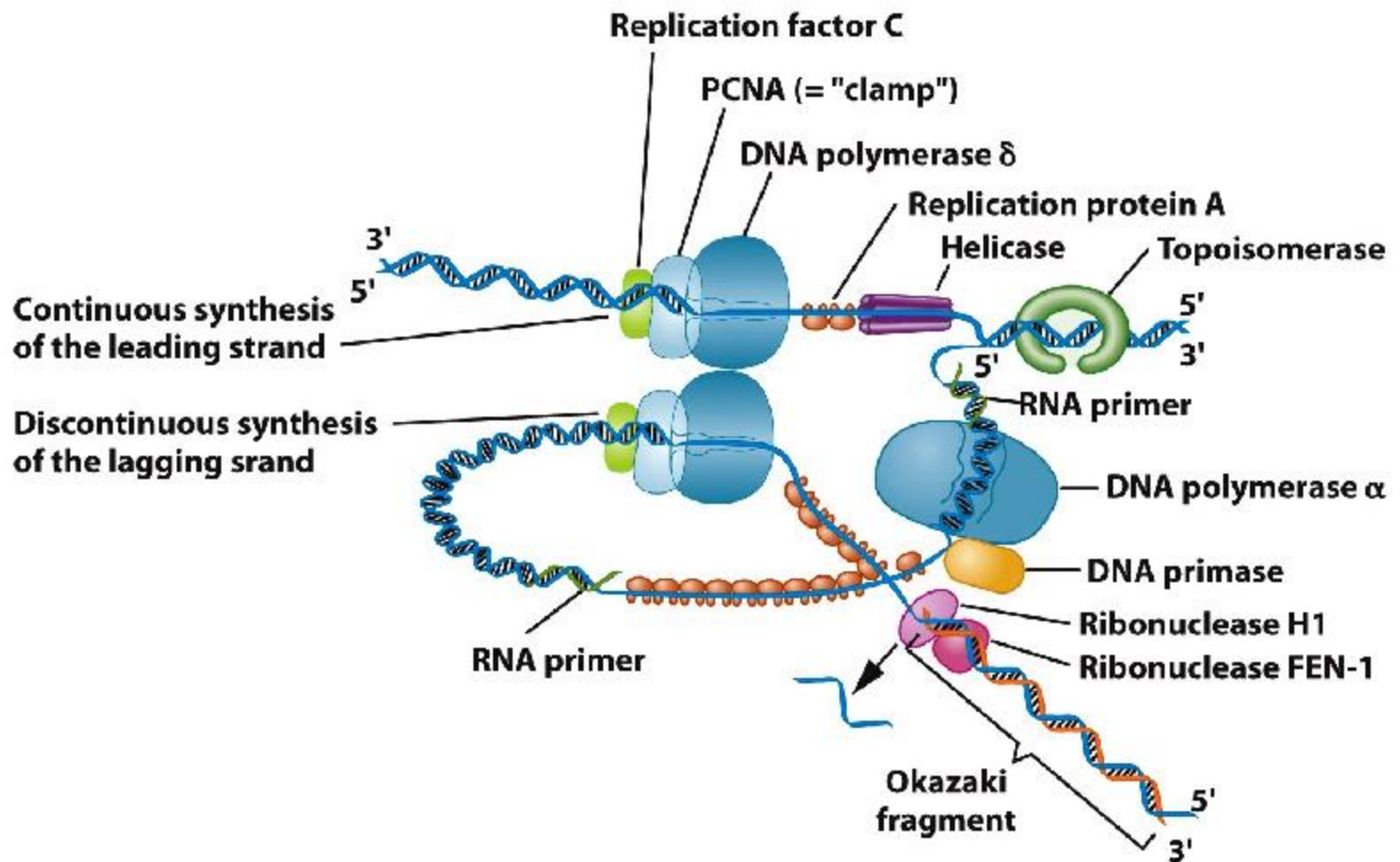


TABLE 11.4

Eukaryotic DNA Polymerases

Polymerase Types*	Function
$\alpha, \delta, \varepsilon$	Replication of nondamaged DNA in the cell nucleus during S phase
γ	Replication of mitochondrial DNA
(lesion-replicating polymerases)	Replication of damaged DNA
$\alpha, \beta, \delta, \varepsilon, \sigma, \lambda, \mu, \phi, \theta$	DNA repair or other functions [†]

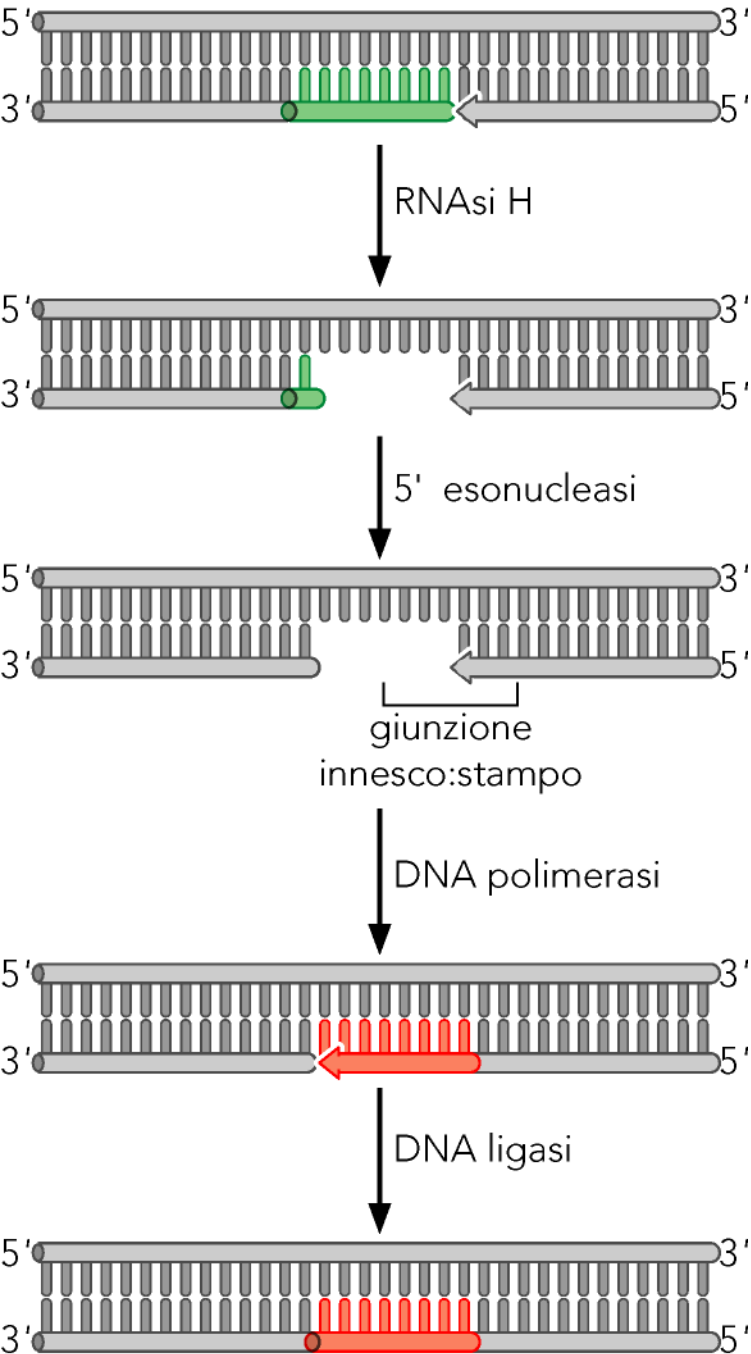
Le DNA polimerasi eucariotiche catalizzano la replicazione o la riparazione

DNA polimerasi	Funzione	Struttura
Replicasi ad alta fedeltà		
α	Replicazione nucleare	Tetramero di 350 kD
δ	"	Tetramero di 250 kD
ϵ	"	Tetramero di 350 kD
γ	Replicazione mitocondriale	Dimero di 200 kD
Riparazione ad alta fedeltà		
β	Riparazione per escissione delle basi	Monomero di 39 kD
Riparazione a bassa fedeltà		
ζ	Bypass dei dimeri di timina	Eteromero
η	Riparazione delle basi danneggiate	Monomero
ι	Necessaria alla meiosi	Monomero
κ	Delezione e sostituzione di basi	Monomero

Tabella 13.2 Le DNA polimerasi coinvolte nella replicazione dei genomi batterici ed eucariotici.

Enzima	Subunità	Attività esonucleasica		Funzione
		3' → 5'	5' → 3'	
DNA polimerasi batteriche				
DNA polimerasi I	1	Sì	Sì	Riparazione del DNA, replicazione
DNA polimerasi III	Almeno 10	Sì	No	Principale enzima della replicazione
DNA polimerasi eucariotiche				
DNA polimerasi α	4	No	No	Innescare la replicazione
DNA polimerasi γ	2	Sì	No	Replicazione del DNA mitocondriale
DNA polimerasi δ	2 o 3	Sì	No	Principale enzima della replicazione
DNA polimerasi ϵ	Almeno 1	Sì	No	Richiesto per l'individuazione dei danni al DNA durante la replicazione del genoma (Sezione 13.3.2)
DNA polimerasi κ	1 o 2?	?	?	Richiesto per l'attacco delle molecole di coesina che tengono uniti i cromatidi fratelli fino allo stadio di anafase della divisione nucleare (Sezione 13.2.3)

I batteri e gli eucarioti possiedono altre DNA polimerasi coinvolte principalmente nella riparazione del DNA danneggiato. Questi enzimi includono le DNA polimerasi II, IV e V di *Escherichia coli* e le DNA polimerasi β , ζ , η , θ e ι eucariotiche. I processi di riparazione sono descritti nella Sezione 14.2.



Rimozione dei primer ad RNA

La sostituzione dei primer ad RNA con DNA, necessaria per completare la replicazione, può essere vista come un riparo del DNA. Prima interviene RNAsi H, enzima che rimuove l'RNA primer ibridizzato al DNA stampo, tranne l'ultimo nucleotide, legato al DNA. L'ultimo nucleotide viene rimosso da una 5'-esonucleasi, che degrada sia RNA che DNA a partire dal terminale 5'.

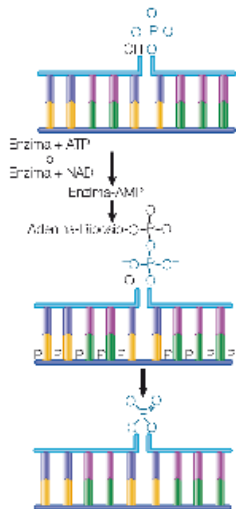
Il buco (gap) lasciato dal primer crea un complesso innesco-stampo, utilizzato poi dalla DNA Pol per riempire il gap. Il nick fra il terminale 3' del neo-frammento e quello 5' del DNA pre-esistente viene saldato dalla DNA ligasi, utilizzando ATP come cofattore.

Quando tutti i primer sono stati rimossi e tutti i nick saldati la sintesi del DNA è completa.

La rimozione dei primers negli eucarioti

- 1) la sintesi di un frammento di Okazaki scalza il primer del frammento precedente, che forma una coda (*flap*).
- 2) La base del *flap* viene tagliata dall'enzima **FEN1**: l'enzima in tale reazione funziona come endonucleasi, ma possiede anche attività 5'-3' esonucleasica.

I frammenti di Okazaki adiacenti sono quindi **uniti tra loro**: l'estremità 3'-OH di un frammento si trova adiacente all'estremità 5'-fosfato del frammento che lo precede.

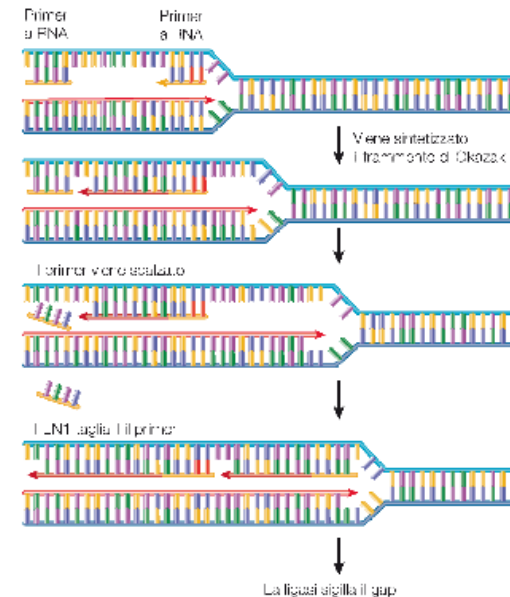


Le due estremità sono saldate dalla **DNA ligasi**, che forma un legame grazie ad un complesso con l'AMP:

l'AMP è attaccato al 5'-fosfato e poi viene formato un legame fosfodiesterico con l'estremità 3'-OH, con enzima e AMP che sono rilasciati.

Le ligasi sono presenti sia negli eucarioti che nei procarioti

Le ligasi di *E. coli* e fago T4 compiono appunto la reazione in due stadi, creando un complesso enzima-AMP, ma utilizzano cofattori diversi.

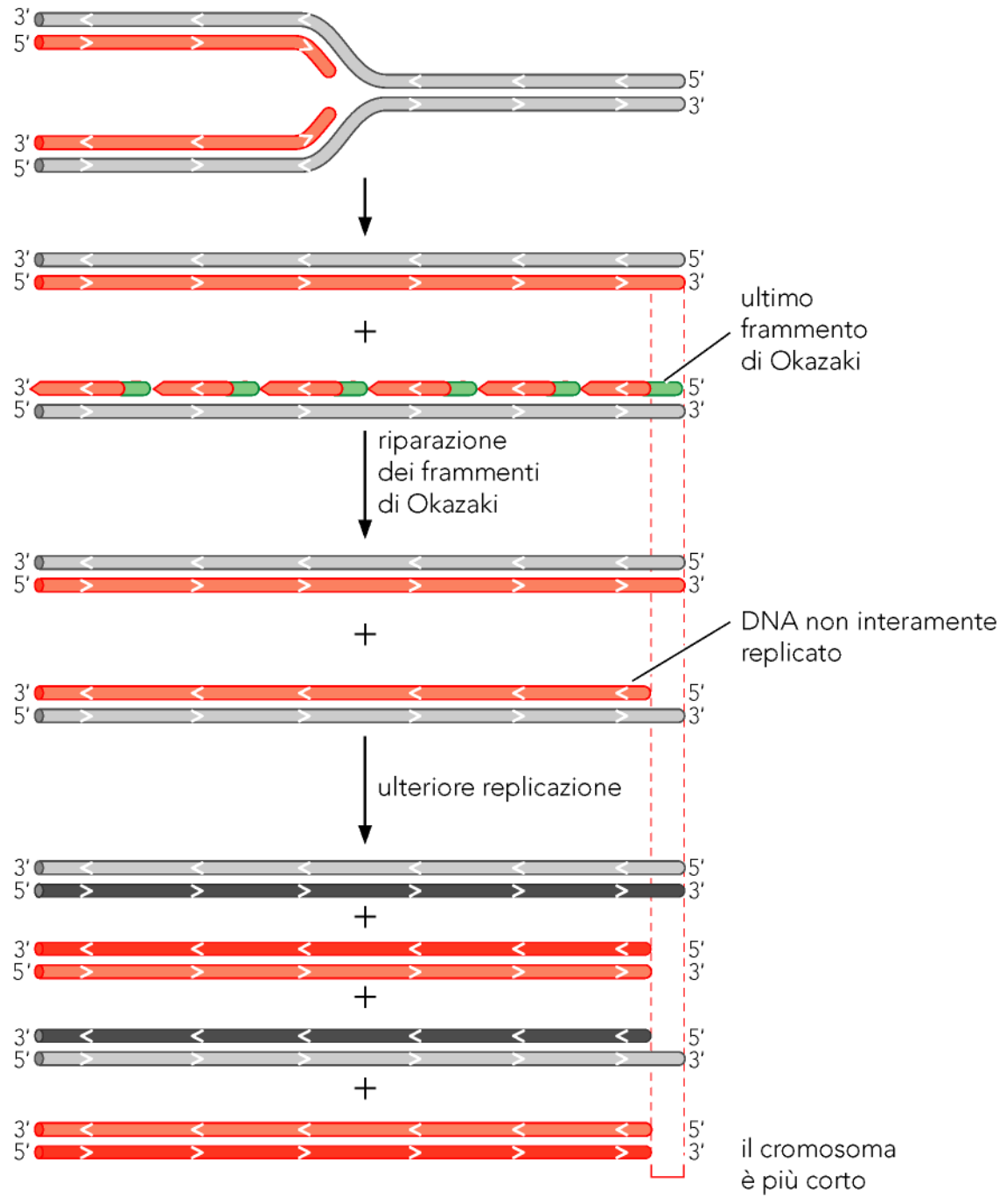


Enzimi e fattori che intervengono nella replicazione del DNA

Funzione	<i>E. coli</i>	Uomo
Elicasi	DnaB	Mcm2-7
Elicasi di caricamento/primasi	DnaC	Mcm2-7
Mantenimento del singolo filamento	SSB	RPA
Innesco	DnaG (primasi)	Pol α /primasi
Pinza scorrevole	β	PCNA
Caricamento della pinza (ATPasi)	Complesso $\gamma\delta$	RFC
Allungamento del filamento	Pol III	Pol δ /Pol ϵ
Rimozione dell'RNA primer	Pol I	FEN-1, Rnasi H1
Legatura dei frammenti di Okazaki	Ligasi	Ligasi 1

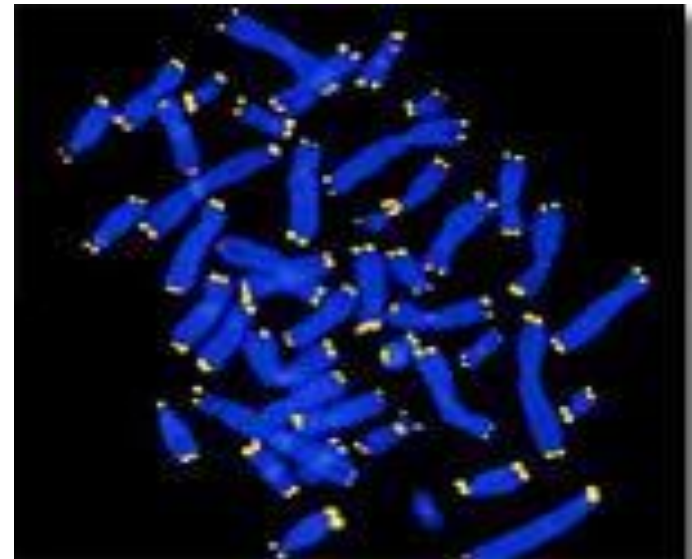
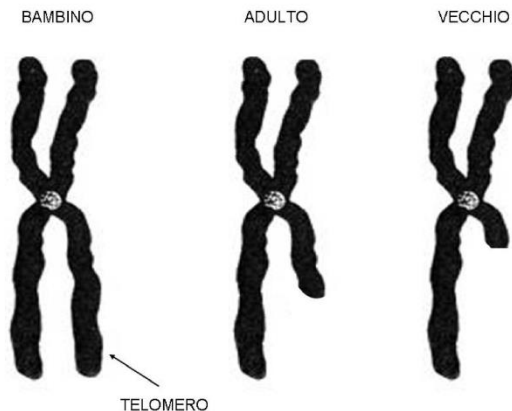
Il problema della replicazione dei terminali nei cromosomi lineari

Riguarda solo il filamento lagging (ritardato): infatti l'ultimo primer, anche se comincia a partire dal primo nucleotide 5' dello stampo, non può essere rimpiazzato da DNA polimerasi una volta rimosso. Questa situazione si ripresenta ad ogni nuova generazione, con progressivo accorciamento del cromosoma.



Telomeri

- Il **telomero** è la regione terminale del cromosoma, da cui deriva il nome stesso, composta di DNA altamente ripetuto, che non codifica per alcun prodotto proteico.
- Ha un ruolo determinante nell'evitare la perdita di informazioni durante la duplicazione dei cromosomi. La DNA polimerasi, infatti, non è in grado di replicare il cromosoma fino alla sua terminazione; se non ci fossero i telomeri, che quindi vengono accorciati ad ogni replicazione, la replicazione del DNA comporterebbe in ogni occasione una significativa perdita di informazione genetica



Telomere Length and Aging



- ▶ Most human somatic cells lack telomerase activity.
- ▶ Shorter telomeres are associated with cellular senescence and death.
- ▶ Diseases causing premature aging are associated with short telomeres.

TELOMERI

Problema:

replicazione terminale del filamento lento

-Manca l'estremità 3'OH utilizzabile per colmare il "gap" lasciato dalla rimozione dell'innesco

-Rischio catena sempre più corta ad ogni evento replicativo

Struttura delle sequenze telomeri:
sequenze ripetute ricche in G e C nel filamento con estremità 3'

Risoluzione:

Polimerasi specializzata in grado di aggiungere alle estremità cromosomiche blocchi ripetuti della sequenza telomerica

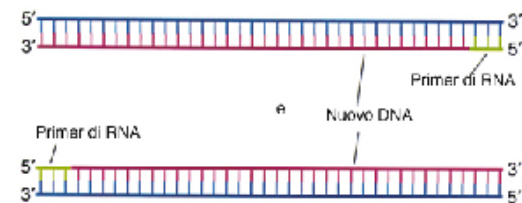
Figura 3.18

Il problema di replicare completamente un cromosoma lineare negli eucarioti. (a) Diagramma schematico di una molecola parentale di DNA a doppia elica rappresentante l'intera lunghezza di un cromosoma. (b) Dopo la replicazione semi-conservativa, nuovi segmenti di DNA uniti da ponti idrogeno all'elica stampo hanno primer di RNA all'estremità 5' (c) I primer di RNA sono rimossi, la DNA polimerasi riempie le interruzioni risultanti e la DNA ligasi congiunge i frammenti adiacenti. Tuttavia, ai due telomeri si trovano ancora interruzioni alle estremità 5' del nuovo DNA, derivanti dalla rimozione dei primer di RNA, perché nessuna sintesi ha potuto riempirle.

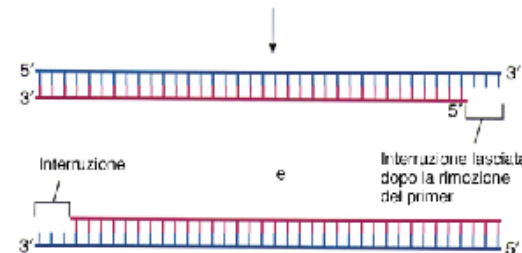
a) Cromosoma parentale con origini di replicazione multiple

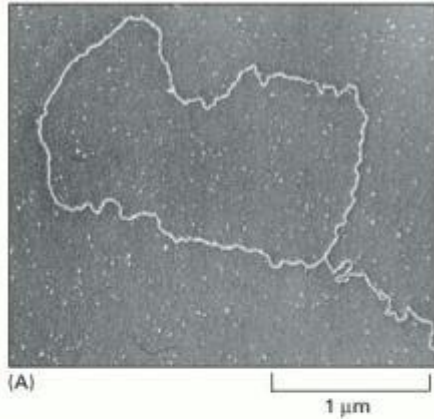


b) Dopo la replicazione

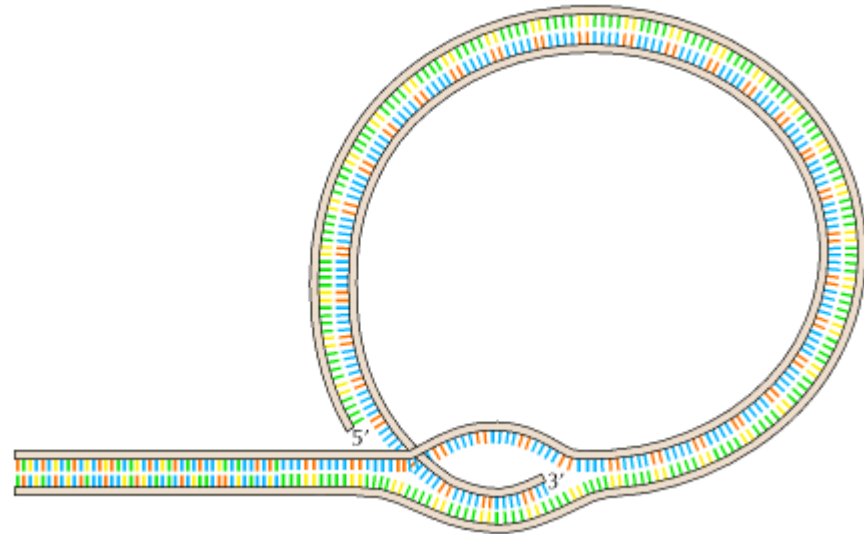


c) I primer di RNA sono rimossi, lasciando interruzioni ai telomeri





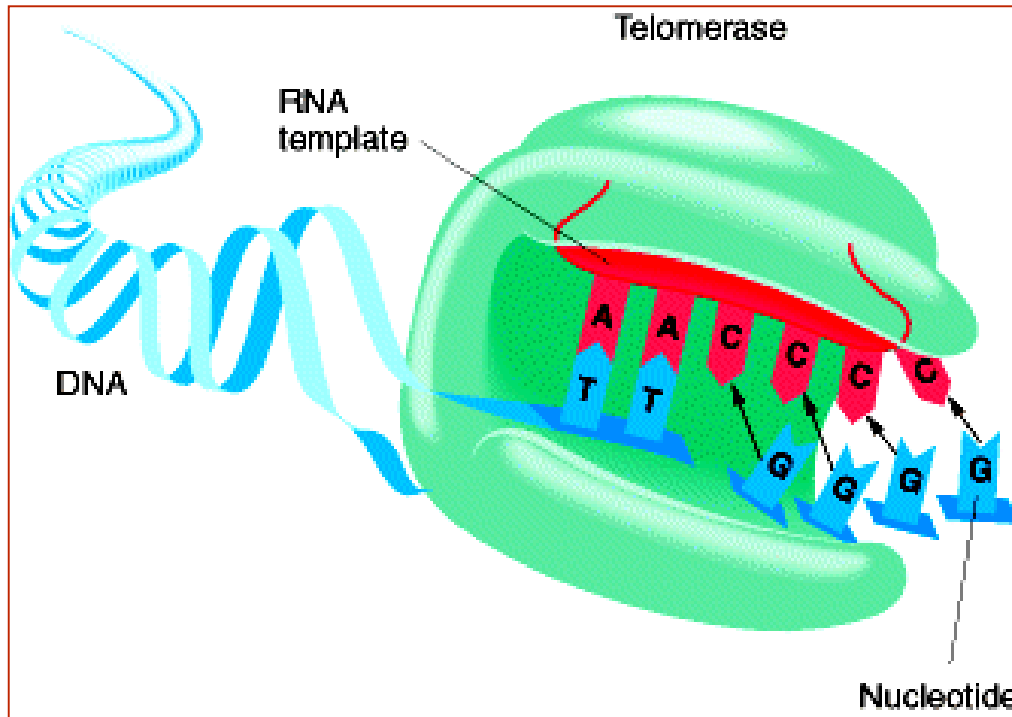
The t-loops at the end of mammalian chromosomes. (A) Electron micrograph of the DNA at the end of an interphase human chromosome. The chromosome was fixed, deproteinated, and artificially thickened before viewing. The loop seen here is approximately 15,000 nucleotide pairs in length.



Structure of a telomere

Telomere DNA loops back on itself to form a circular structure that protects the ends of chromosomes.

NEGLI EUCARIOTI



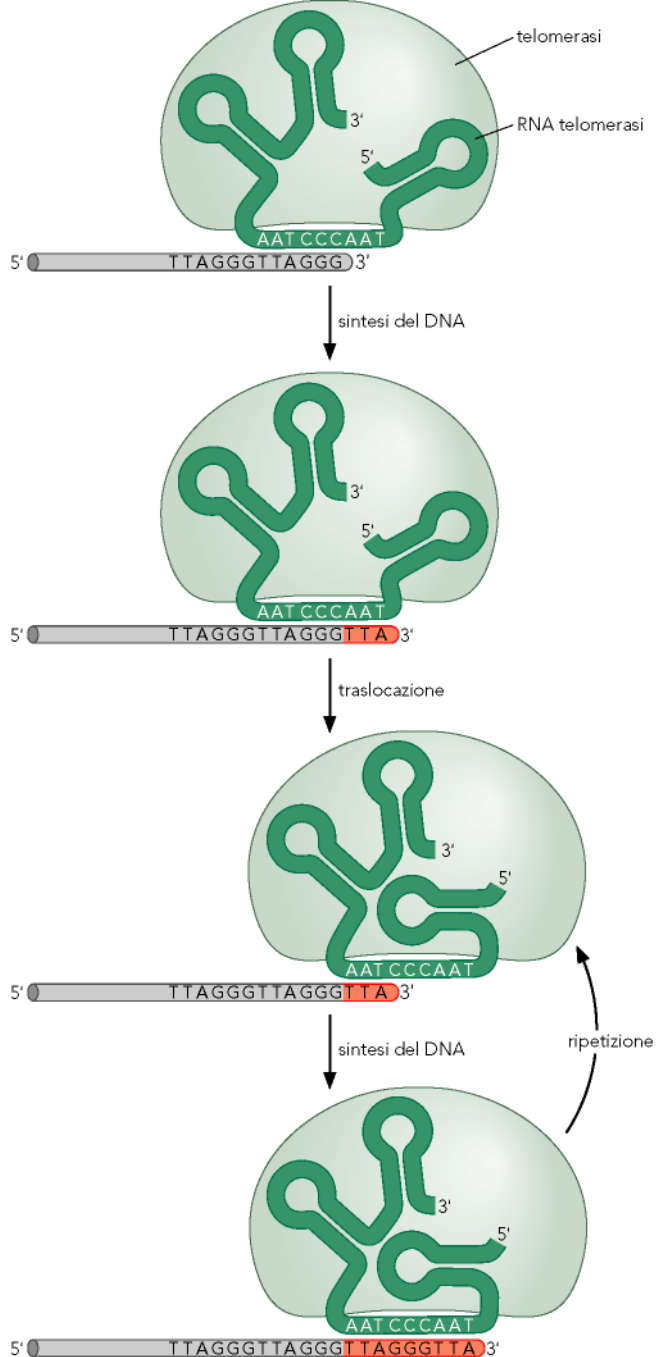
Telomeri e telomerasi

Allungamento del terminale 3' del telomero

La telomerasi permette l'allungamento del cromosoma, in quanto il filamento 3' allungato viene usato come stampo dal normale apparato replicativo per la sintesi di ulteriori frammenti di Okazaki.

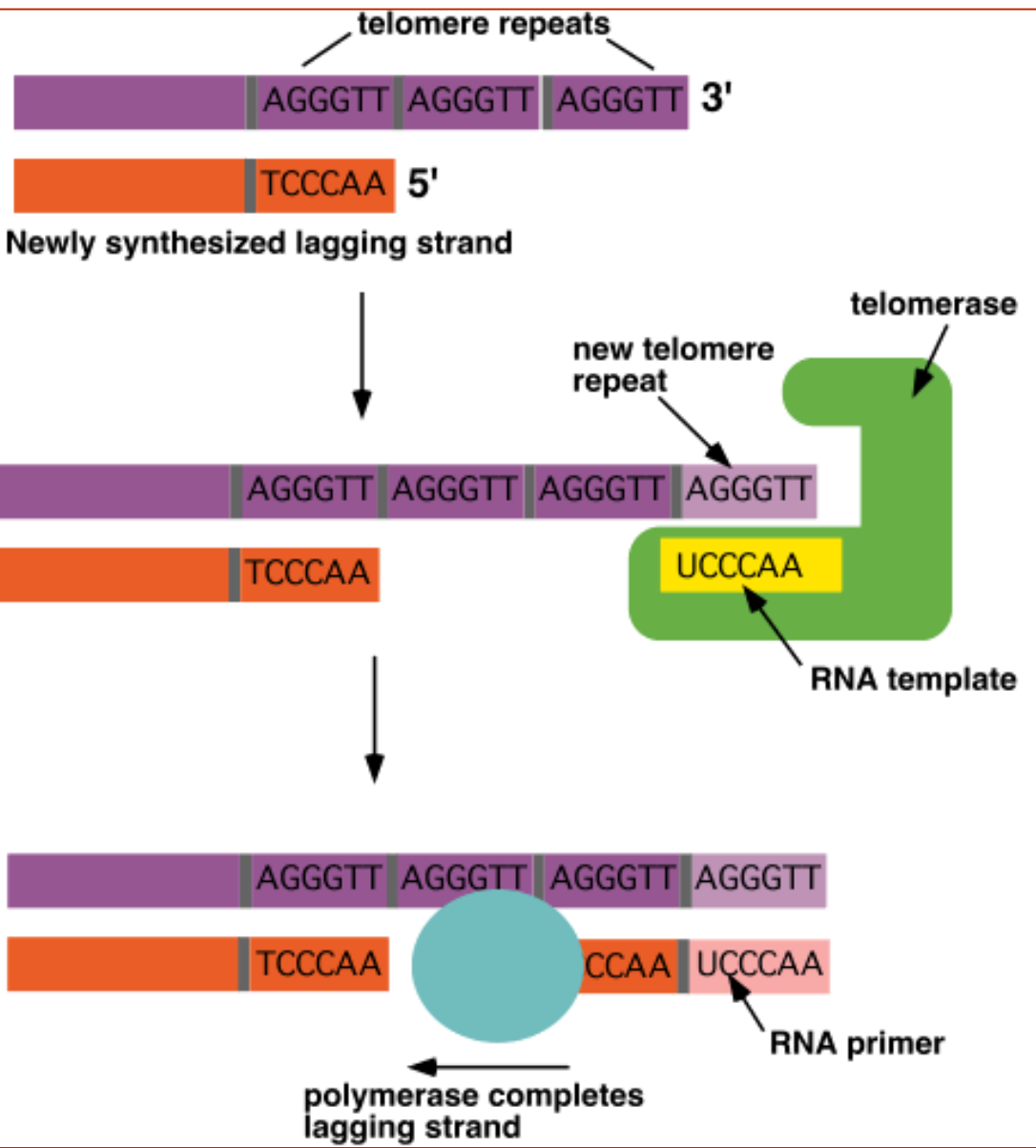
Da notare che resta comunque una porzione 3' terminale a singolo filamento. L'estensione viene regolata dal legame di proteine specifiche, che agiscono da attivatori della telomerasi quando sono poche, e da deboli inibitori quando sono molte.

La cellula tollera una lunghezza del telomero variabile fra 200 e 400 ripetizioni.



Replicazione dei telomeri da parte della telomerasi

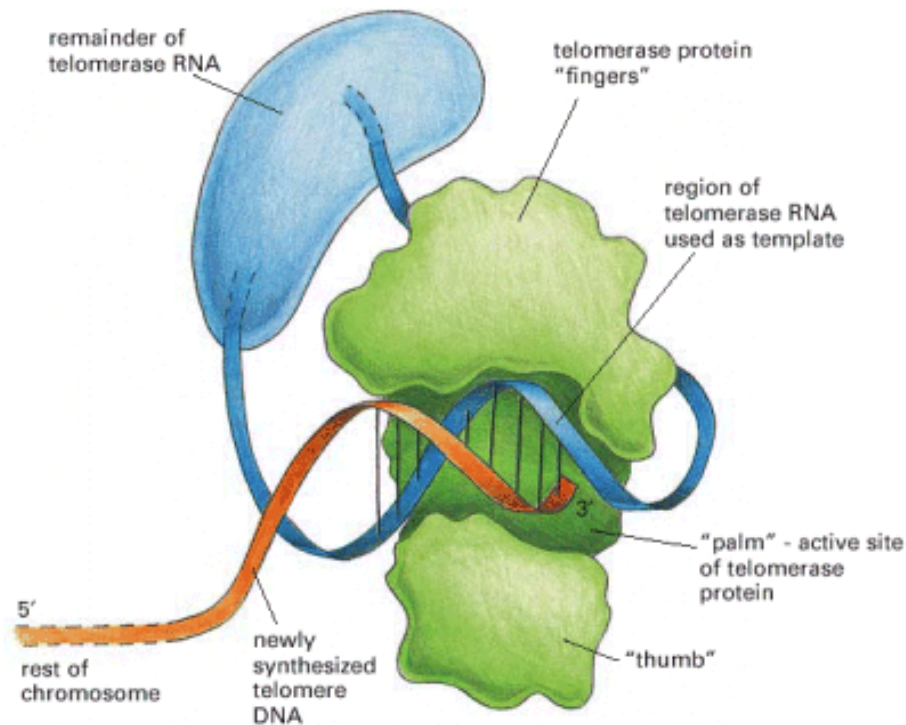
Le estremità dei cromosomi eucariotici, dette telomeri, sono formate da una corta sequenza ricca in TG ripetuta molte volte, presente anche come singolo filamento al terminale 3' (nell'uomo la sequenza è 5'-TTAGGG-3'). Tale sequenza viene usata come primer da una speciale DNA polimerasi, detta telomerasi, per estendere i terminali del cromosoma. Per far ciò la telomerasi utilizza uno stampo endogeno, fornito da una molecola di RNA componente della nucleoproteina, di 9 basi: 3'-AAT-CCC-AAT-5', che può appaiarsi alla sequenza 5'-TTA-GGG-3', con formazione di un innesco stampo, che ne permette una replicazione ripetuta, grazie ad un'attività elicastica endogena. La telomerasi è di fatto una particolare trascrittasi inversa processiva.



Probabilmente il meccanismo di scivolamento viene facilitato da un'attività RNA:DNA elicastica intrinseca alla Telomerasi.

La capacità della Telomerasi di effettuare cicli ripetuti è di estensione dei telomeri è un'attività regolata da proteine che si legano alle estremità telomeriche e che in base alla loro quantità (e quindi alla lunghezza dei telomeri) inibiscono l'attività telomerasica

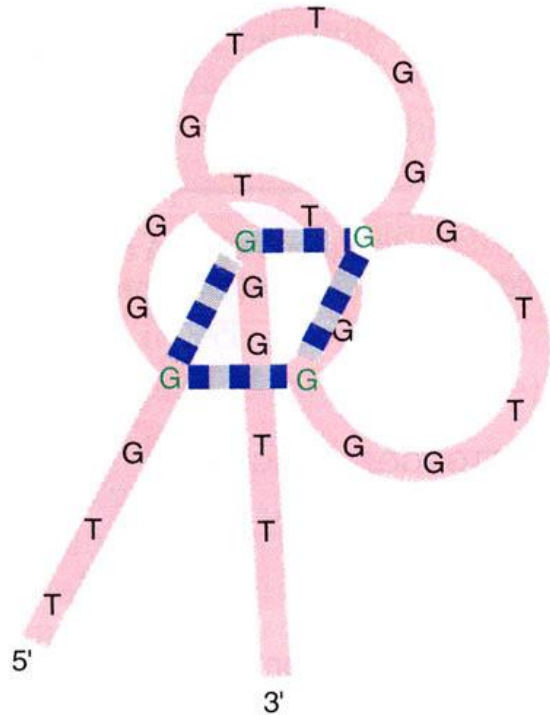
Una volta l'estremità 3'OH del telomero sia stata estesa con le normali procedure di replicazione viene sintetizzato un primer che verrà esteso dalla DNAPolimerasi ed il frammento così sintetizzato (telomerico) saldato all'estremità 5'P dell'altro filamento



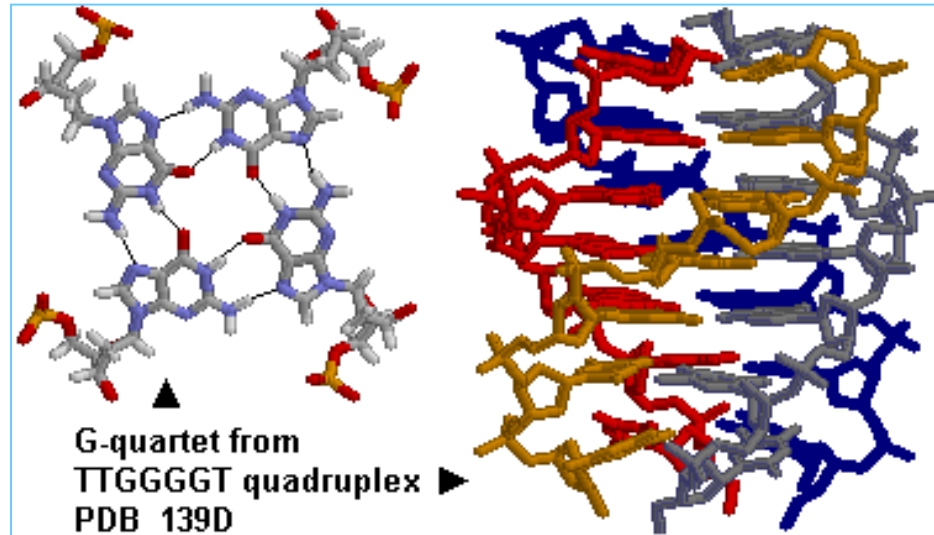
The structure of telomerase.

The telomerase is a protein RNA complex that carries an RNA template for synthesizing a repeating, G-rich telomere DNA sequence. Only the part of the telomerase protein homologous to reverse transcriptase is shown here (*green*). A reverse transcriptase is a special form of polymerase enzyme that uses an RNA template to make a DNA strand; telomerase is unique in carrying its own RNA template with it at all times. (Modified from J. Lingner and T.R. Cech, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8:226-232, 1998.)

3' AACCCC 5' 3' GGGGTT GGGG T
 5' TTGGGG TTGGGG TTGGGGTTGGGG T



Il comportamento insolito delle sequenze telomeriche può essere spiegato da interazioni G-G.



Nel modello rappresentato nella parte superiore della figura, l'appaiamento tra i residui G dà origine ad una forcina duplex.

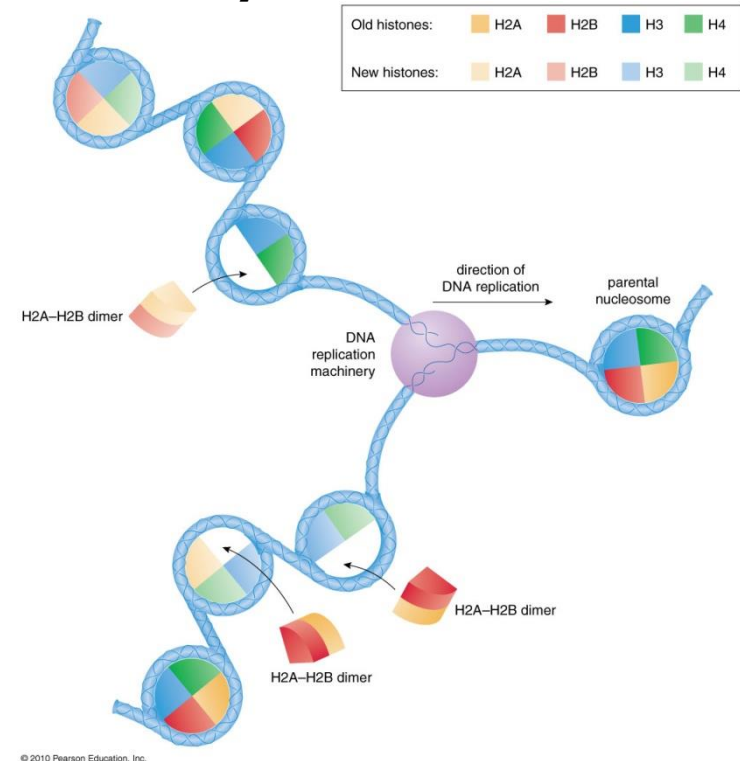
Nel modello inferiore si forma un quartetto G quando, in una serie di quattro ripetizioni, ogni unità condivide con le altre un residuo G.

Nucleosomes and DNA Replication

- Replication doubles the amount of DNA
 - Therefore the cell must synthesize more histones to accommodate this increase
- Synthesis of histones occurs during the S phase
 - Histones assemble into octamer structures
 - They associate with the newly made DNA very near the replication fork
- Thus following DNA replication, each daughter strand has a mixture of “old” and “new” histones
 - Refer to Figure 11.22

Final Step - Assembly into Nucleosomes:

- **As DNA unwinds, nucleosomes must disassemble.**
- **Histones and the associated chromatin proteins must be duplicated by new protein synthesis.**
- **Newly replicated DNA is assembled into nucleosomes almost immediately.**
- **Histone chaperone proteins control the assembly.**



Principali differenze tra Procarioti ed Eucarioti

FASE	PROCARIOTI	EUCARIOTI
Inziatore	DnaA	ORC
Apertura del duplex	DNA elicasi (DnaB e Dna C)	DNA elicasi
Stabilizzazione del ssDNA	SSB	RPA
RNA primer	DNA primasi	DNA pol α /primasi
Sintesi	DNA pol III	DNA pol δ (coadiuvata da ϵ nel lagging)
Aumento della processività	Sliding clamp, clamp loader	Sliding clamp, clamp loader, fattori PCNA e RF-C
Rimozione dei primer	DNA pol I	RNasi H1 e Fen2 (mammiferi); RNasi H e MF1 (negli altri eucarioti); DNA pol δ/ϵ
Saldatura dei nick	Ligasi1	Ligasi 1
Topoisomerasi	I, III di tipo IV; IV e girasi tipo II	Una di tipo I, più di tipo II