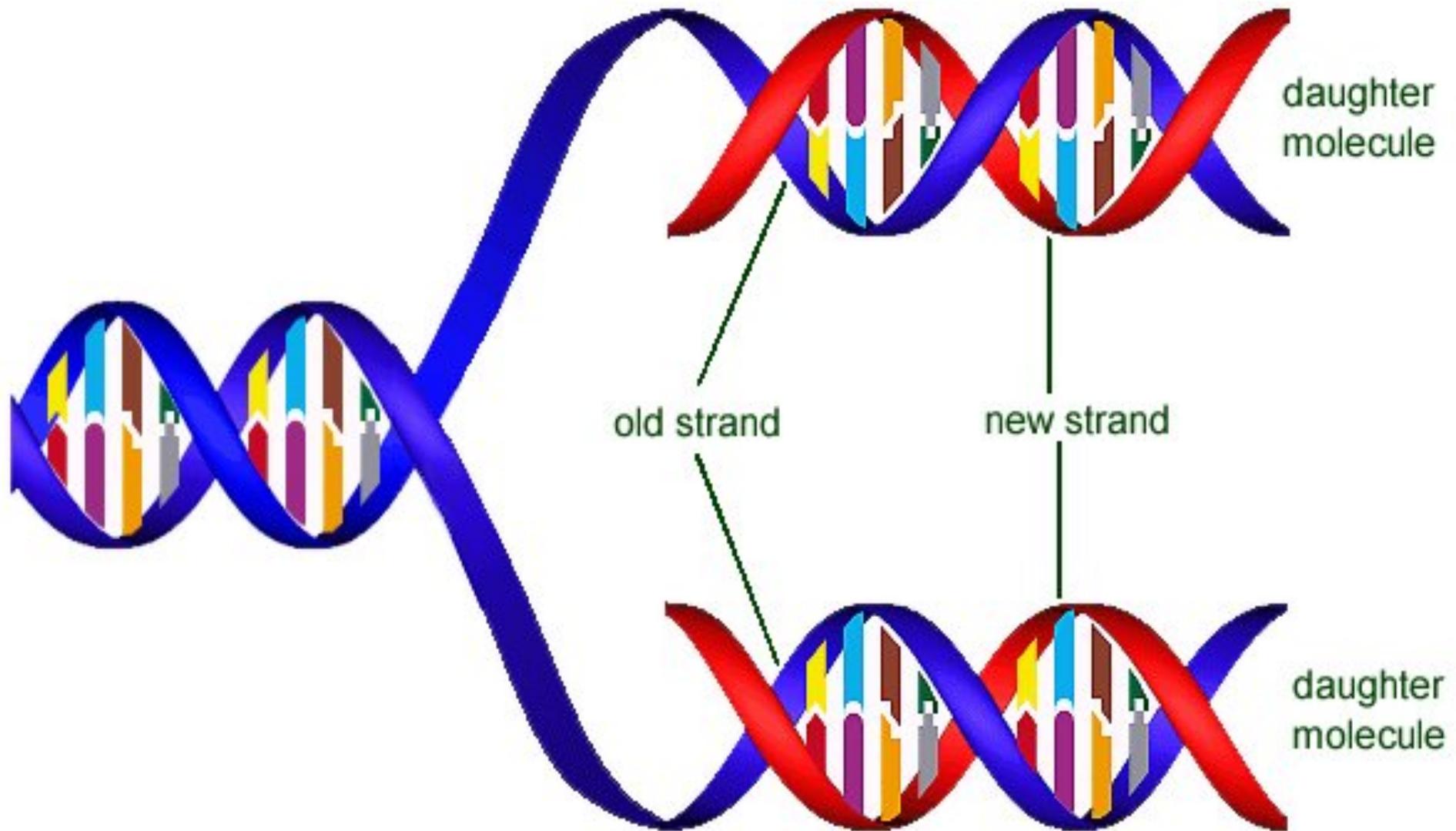
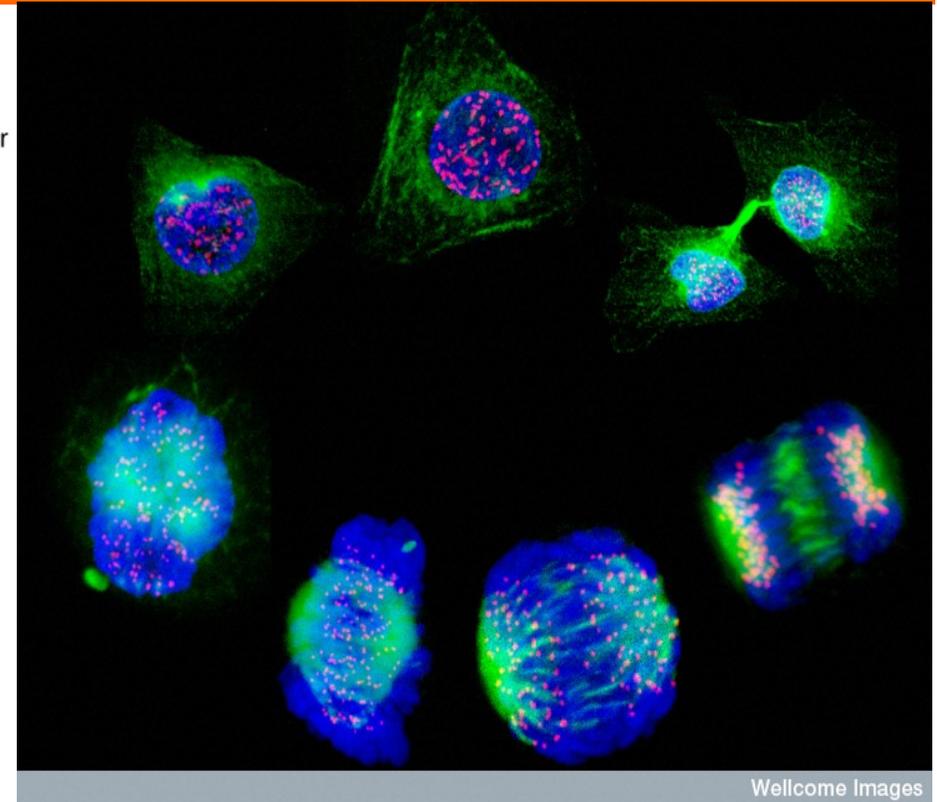
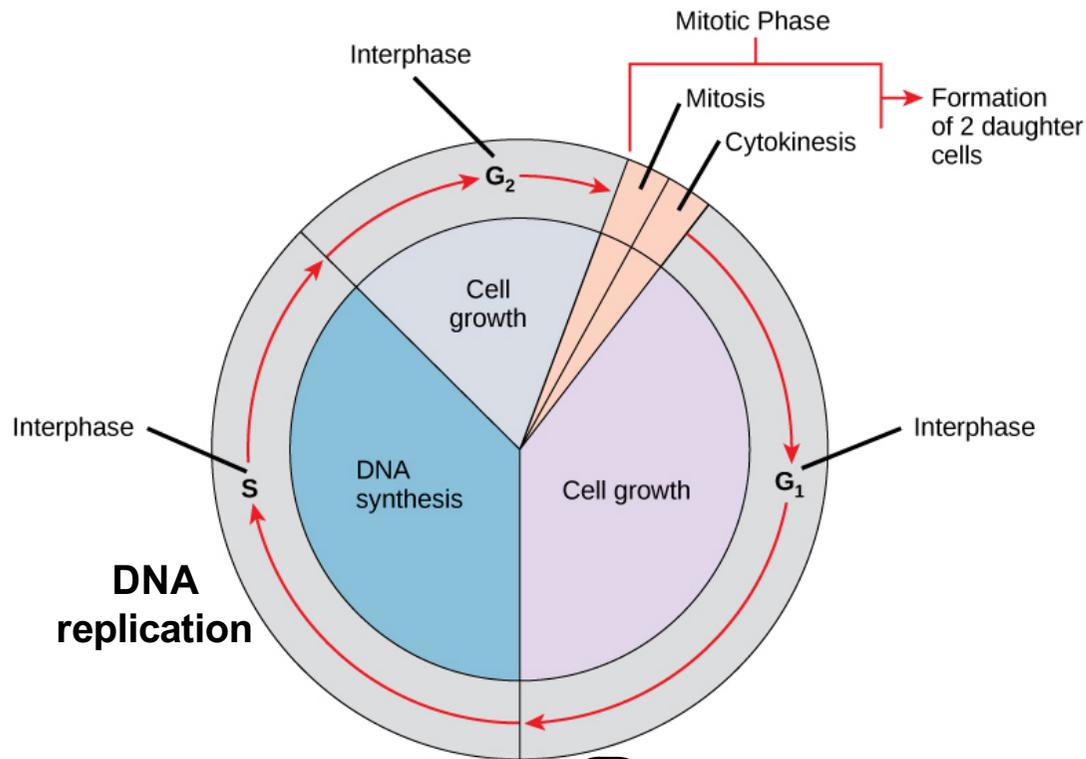


LA REPLICAZIONE DEL DNA



CICLO CELLULARE E REPLICAZIONE DEL DNA

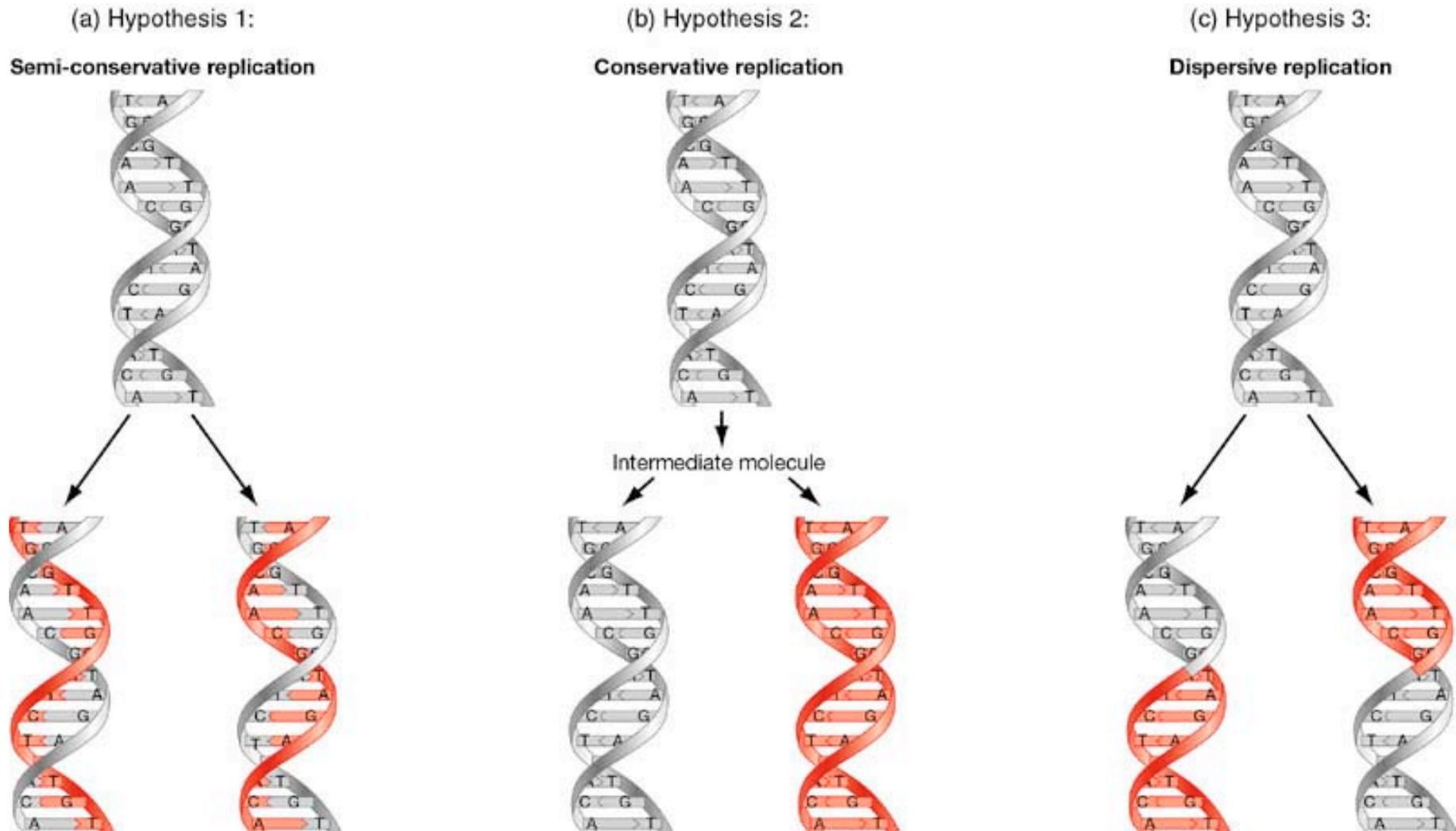


- G₁: Gap phase 1
- G₂: Gap phase 2
- G₀: Gap phase 0: quiescent cell
- S: Synthesis
- M: Mitosi



WHAT IS THE MECHANISM OF DNA REPLICATION ?

Tre ipotesi sull'esito del processo replicativo del DNA

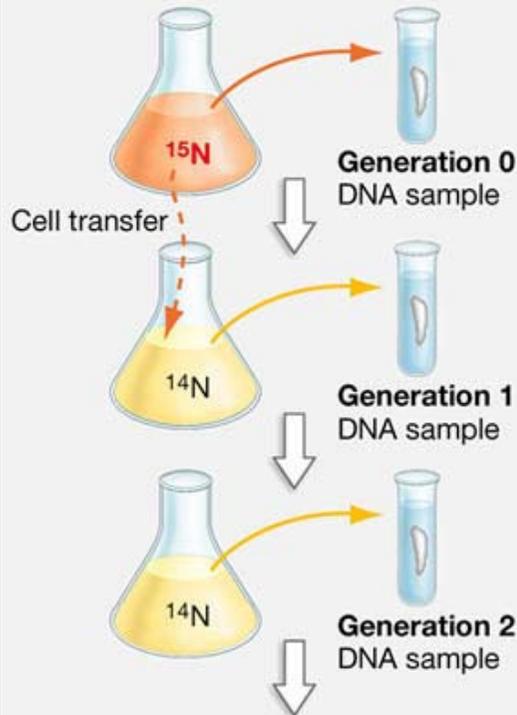


https://www.youtube.com/watch?v=JcUQ_TZCG0w

THE MESELSON-STAHN EXPERIMENT 1958

(a) MESELSON-STAHN EXPERIMENT

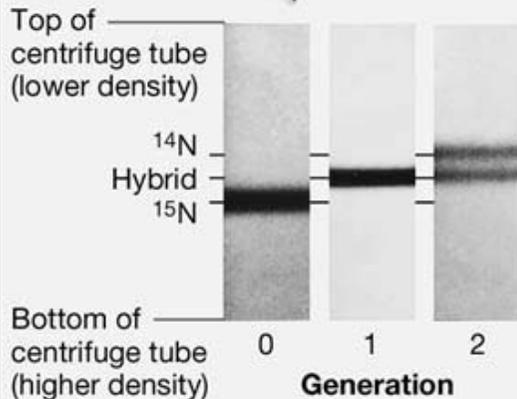
Question: Is replication conservative or semi-conservative?



1. Grow *E. coli* cells in medium with ^{15}N as sole source of nitrogen. Collect sample and purify DNA.

2. Transfer cells to medium containing ^{14}N . After cells divide once, collect sample and purify DNA.

3. After cells have divided a second time in ^{14}N medium, collect sample and purify DNA.



4. Centrifuge the three samples and compare the location of the bands. DNA containing ^{15}N is heavier than DNA containing ^{14}N and forms a band lower in the tube.

Conclusion?

N^{14} : 7 protons/7 neutrons "light"
 N^{15} : 7 protons/8 neutrons "heavy"

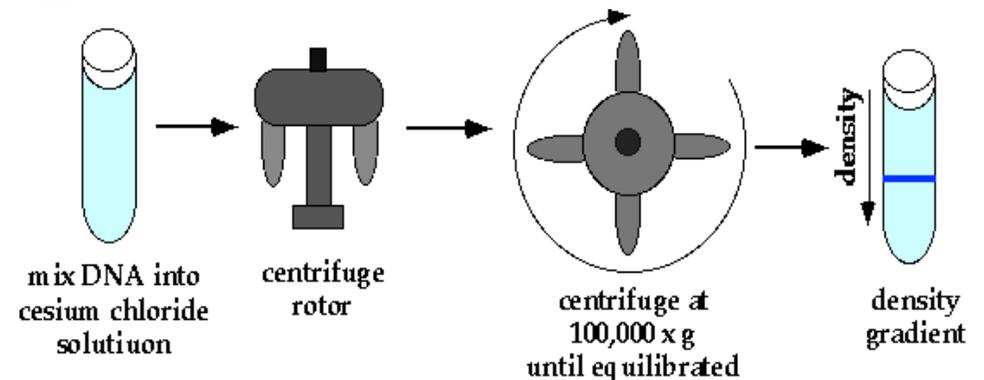
100% of DNA is N^{15}



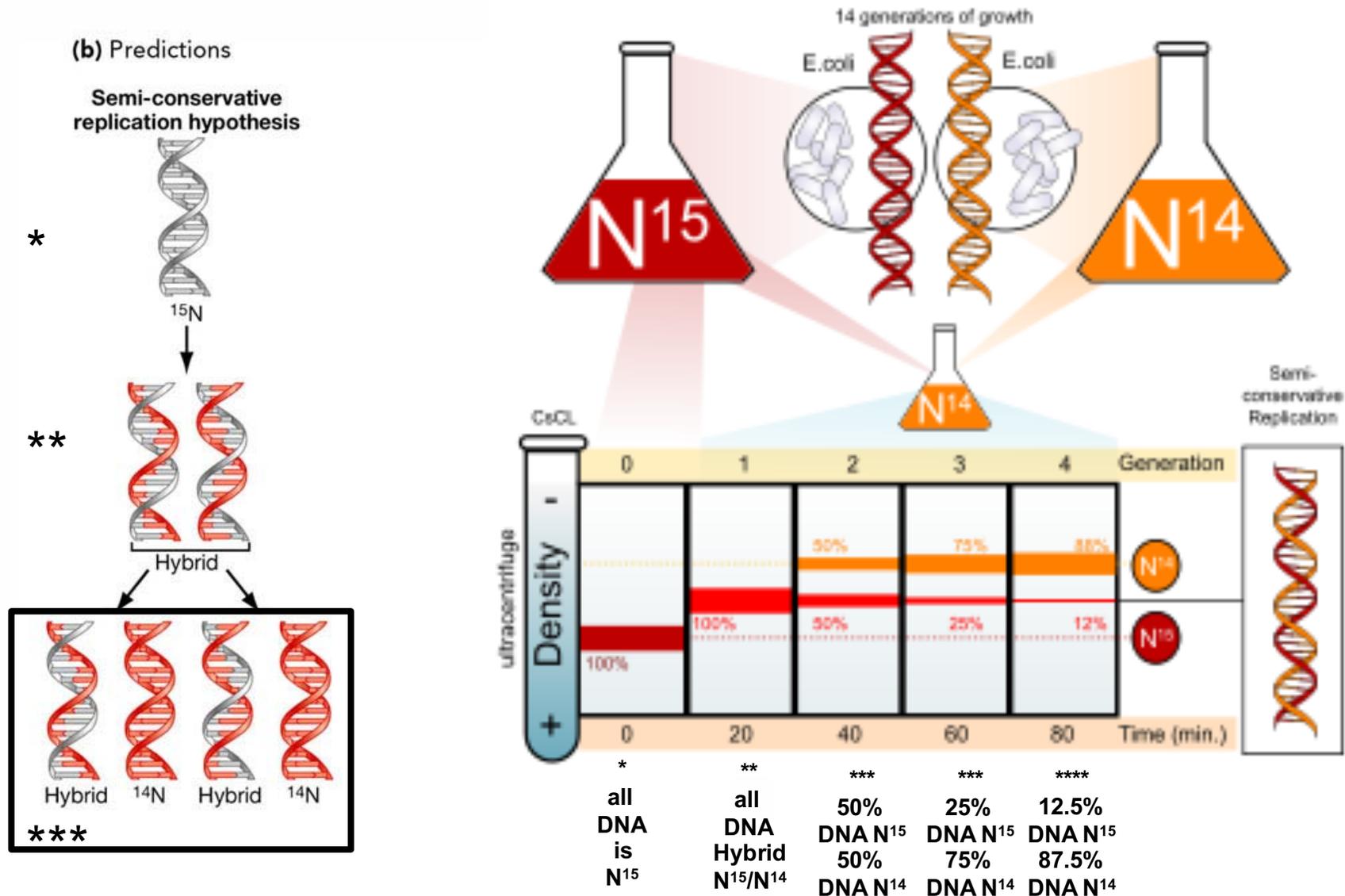
ca. 20 min
 = 1 Generation
 1x DNA replication
 (100% of DNA is hybrid $\text{N}^{14}/\text{N}^{15}$)



ca. 20 min
 = 1 Generation
 1x DNA replication
 (50% DNA N^{14} , 25% of DNA N^{15})



THE MESELSON-STAHL EXPERIMENT



THE MESELSON-STAHL EXPERIMENT

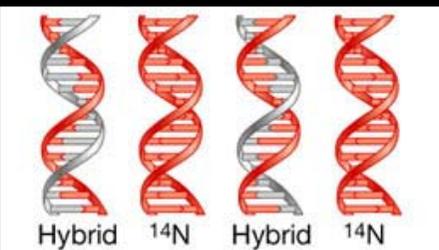
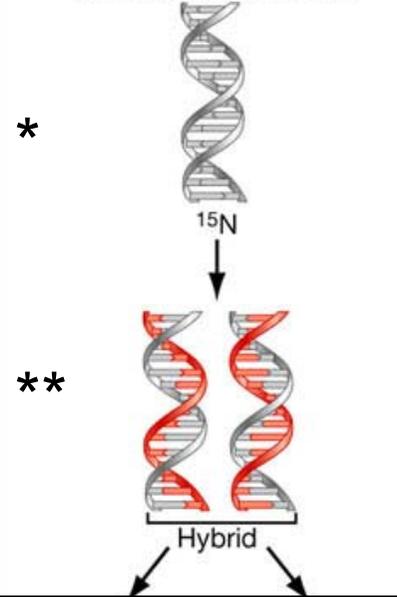
ALL BACTERIA

**20 minutes in
N14 (1 replication)**

**20 minutes in
N14 (1 replication)**

(b) Predictions

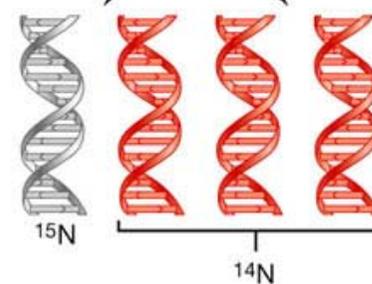
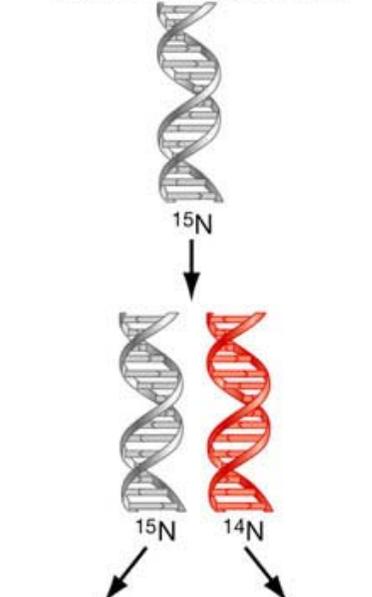
Semi-conservative replication hypothesis



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

✓ Hypothesis supported

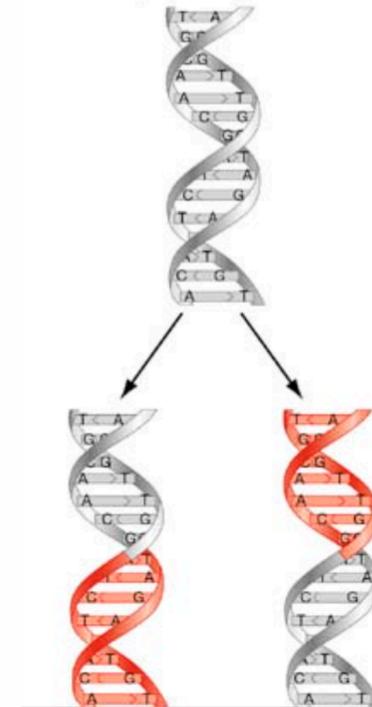
Conservative replication hypothesis



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

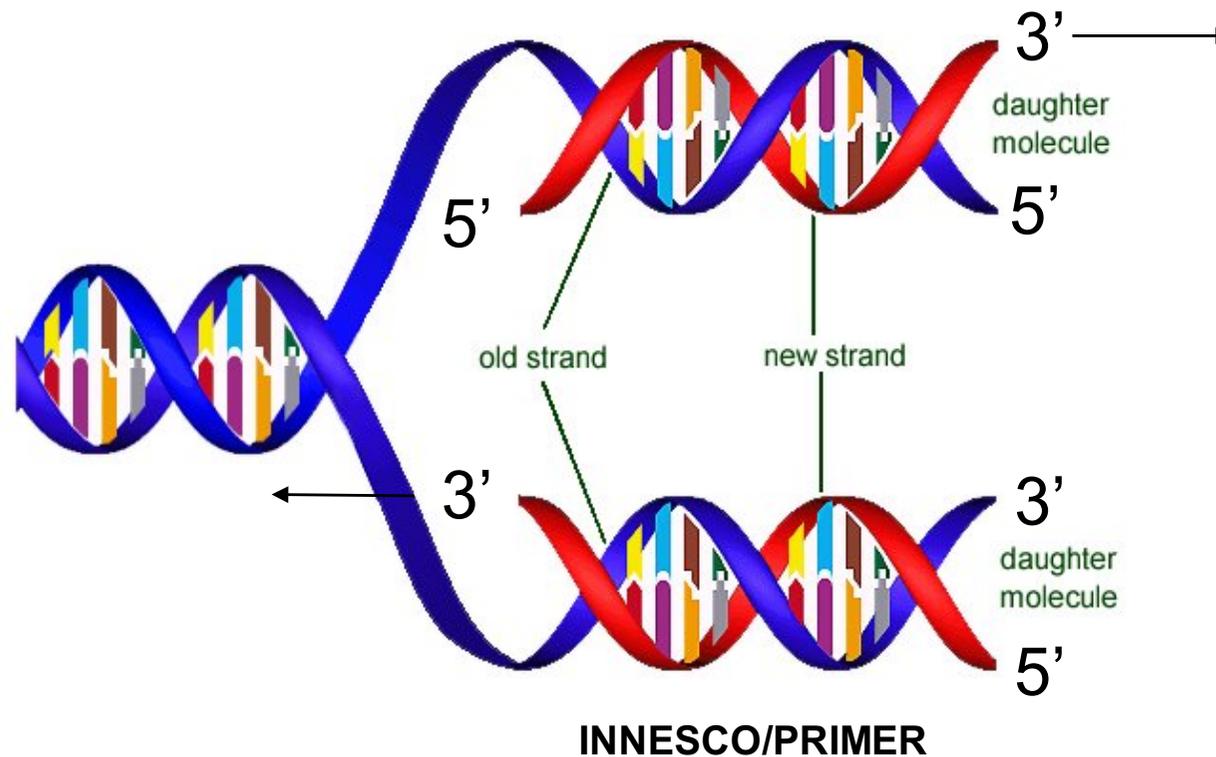
✗ Hypothesis rejected

Dispersive replication

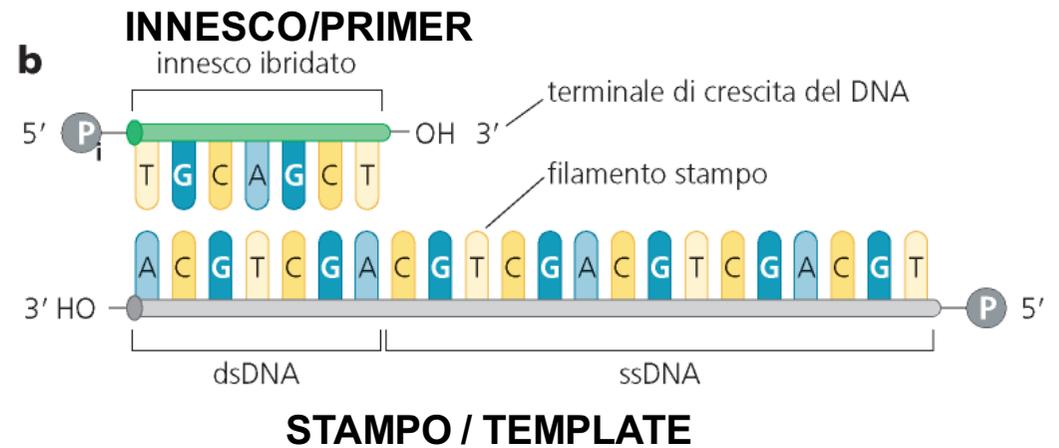
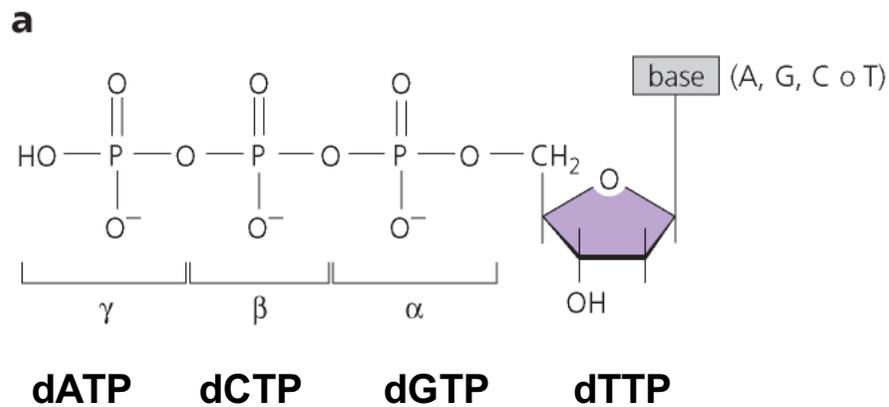
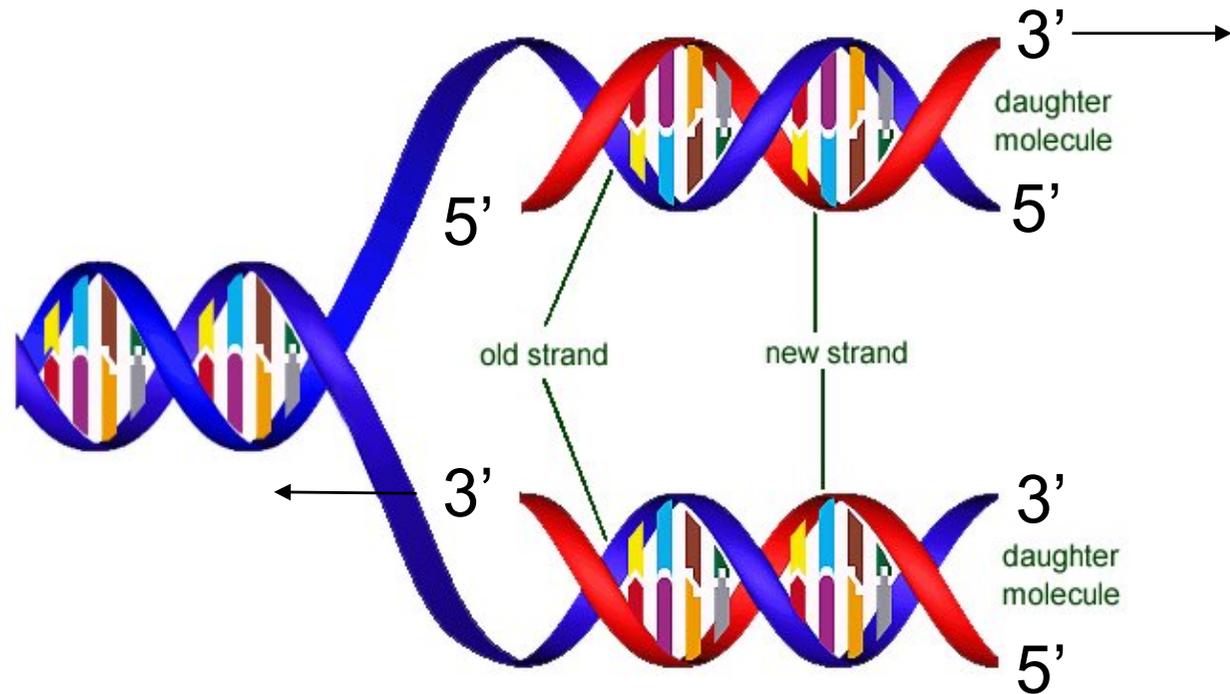


What do
you
think???

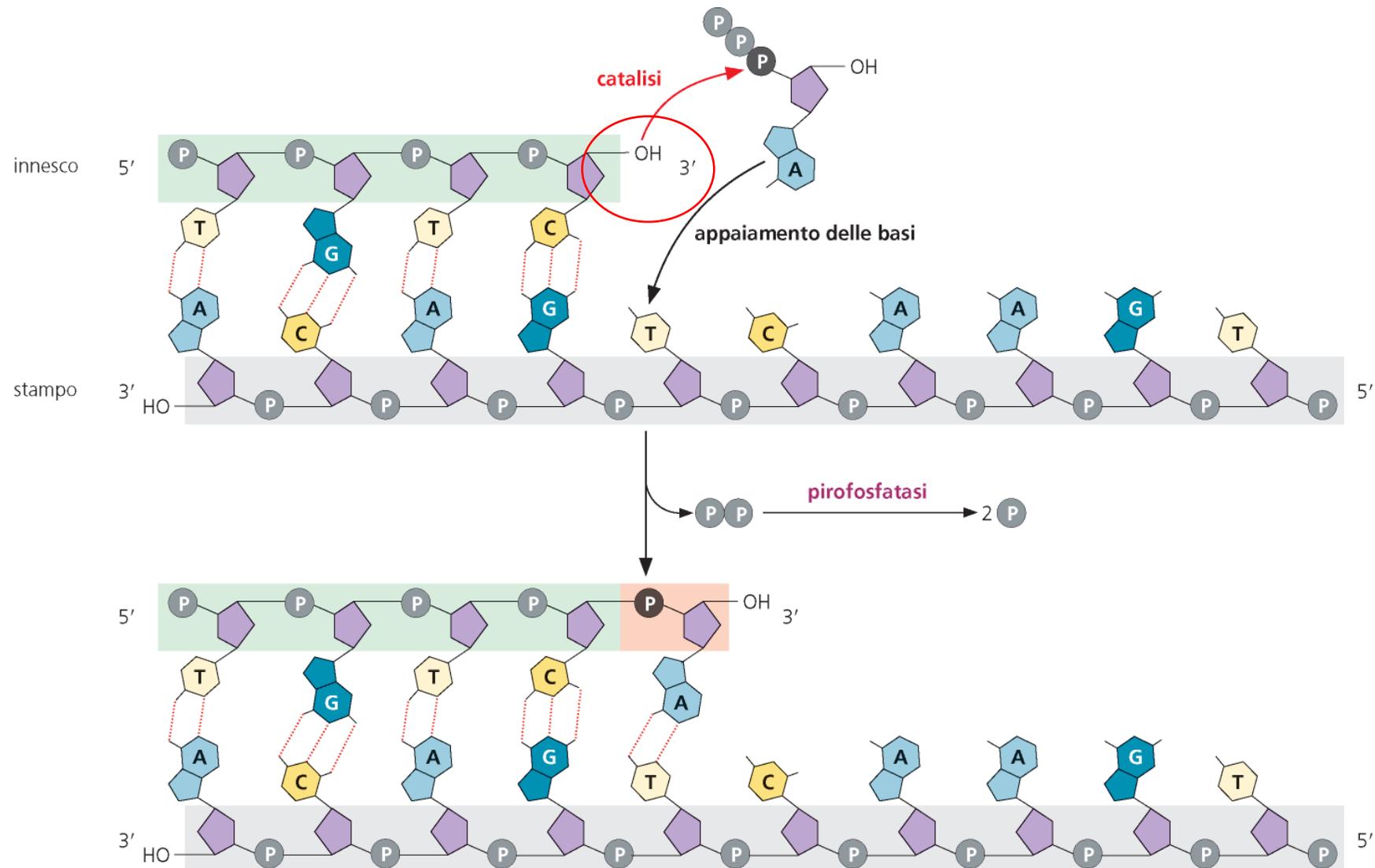
La sintesi del DNA richiede desossiribonucleotidi trifosfato, uno stampo ed un innesco (struttura innesco:stampo)



La sintesi del DNA richiede desossiribonucleotidi trifosfato, uno stampo ed un innesco (struttura innesco:stampo)

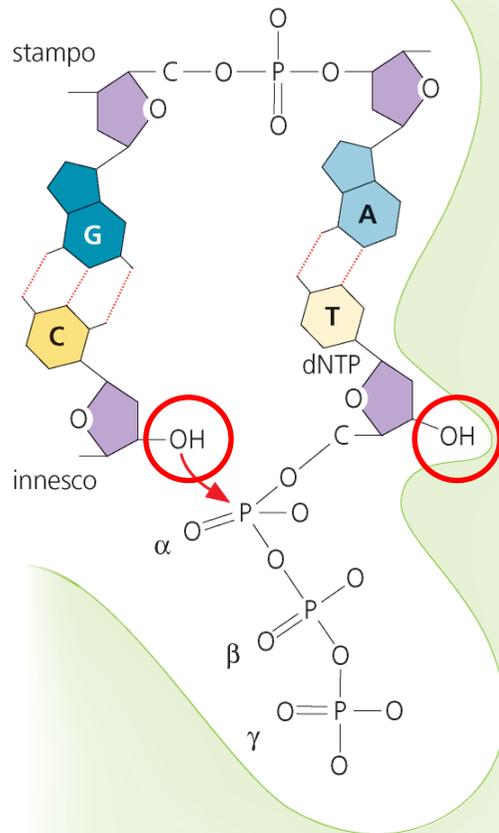


Il DNA è sintetizzato allungando il terminale 3' dell' innesco

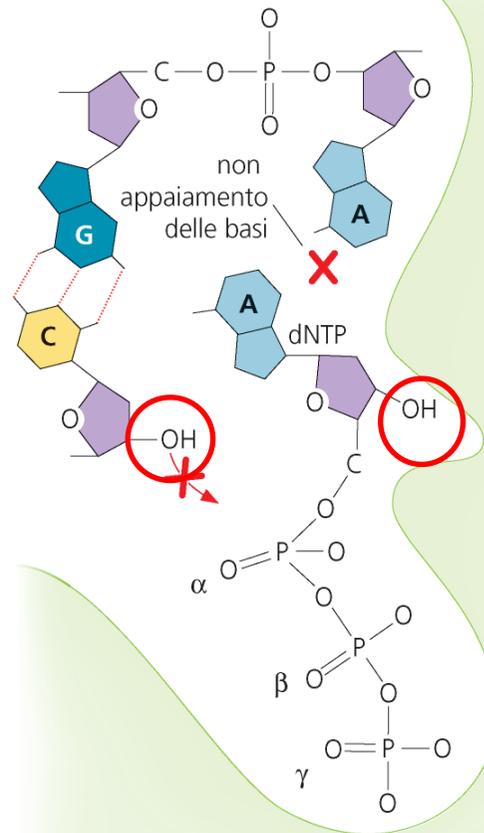


La DNA pol utilizza un singolo sito attivo per catalizzare la sintesi di DNA

a appaiamento corretto



b appaiamento scorretto



Usa un unico sito attivo per catalizzare l'aggiunta di 4 diversi nucleotidi.

La geometria delle coppie è praticamente identica.

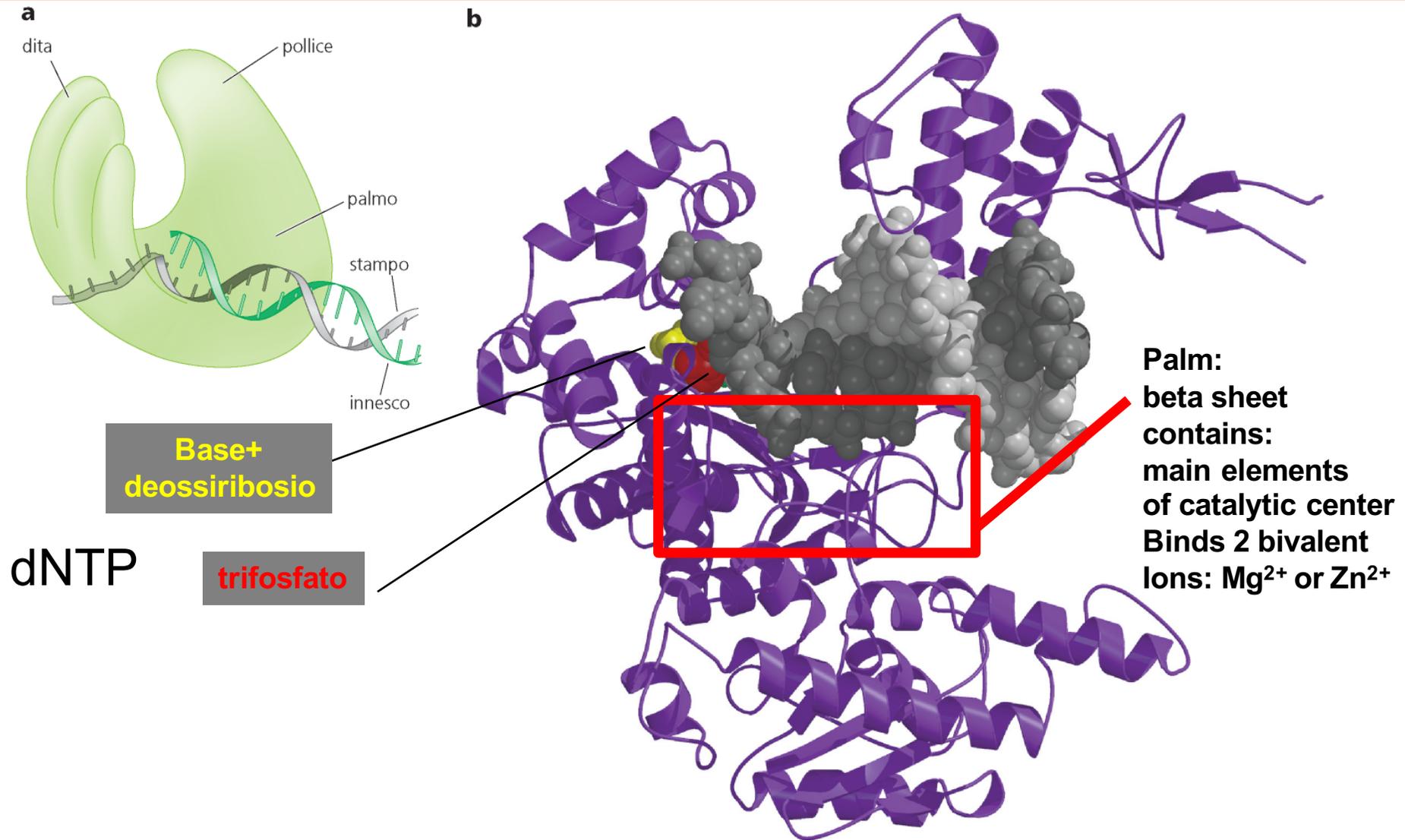
Controlla la formazione del giusto appaiamento A-T; G-C

Coppie di base non corrette:

Abassamento della velocità (-10.000x) = "selezione cinetica"

La velocità di formazione aumenta di molto (10000x) quando il nucleotide è corretto.

Il DNA substrato si pone in una grande fenditura simile ad una mano

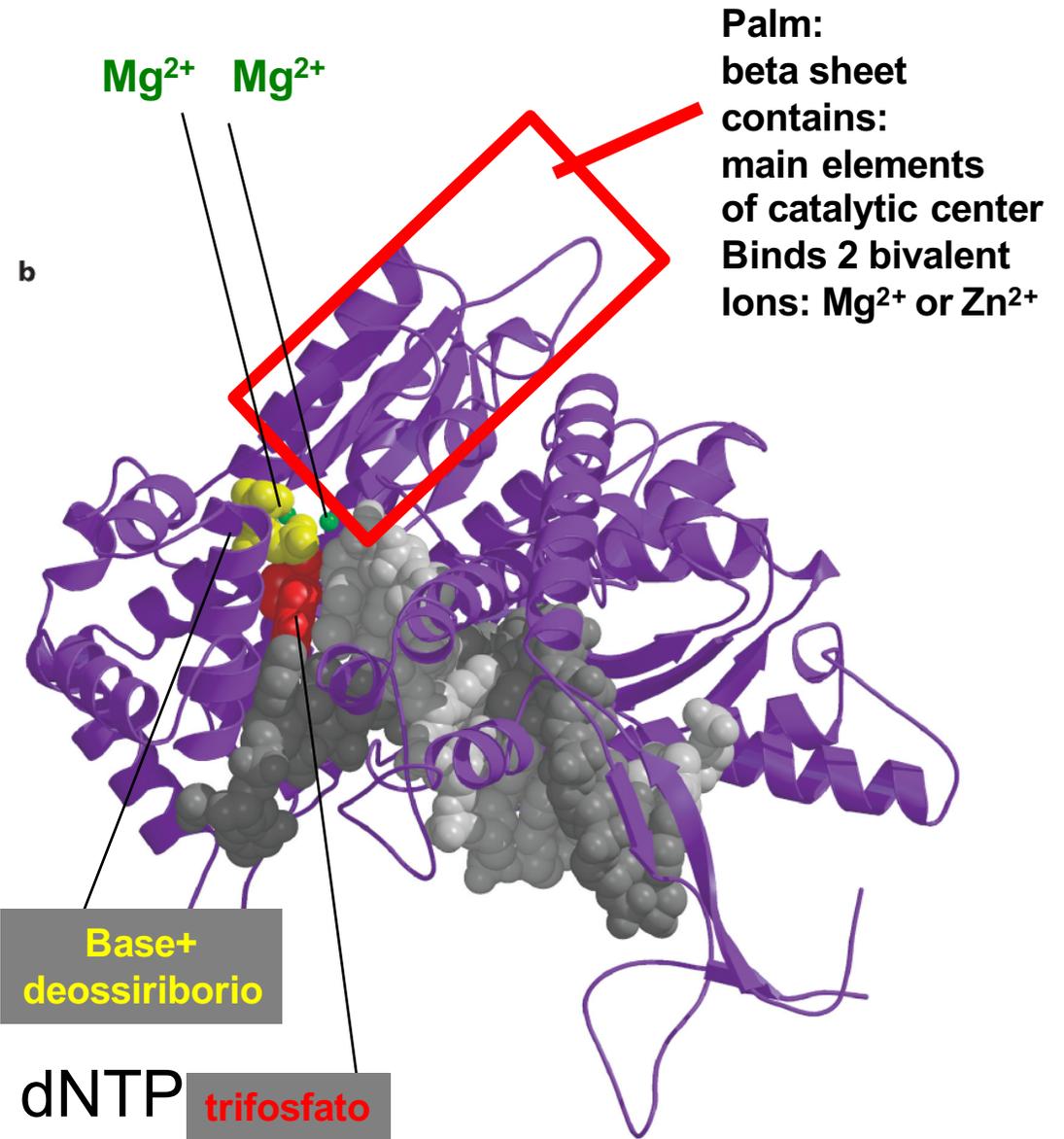
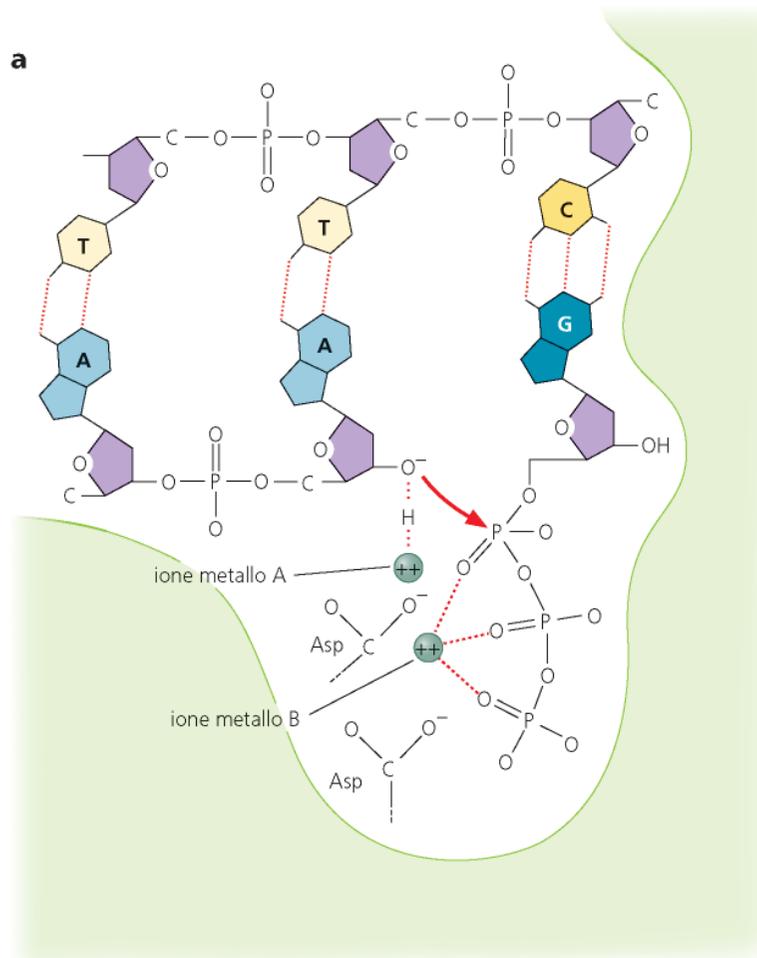


Durante la polimerizzazione 2 ioni metallici bivalenti si legano alla DNA polimerasi

Il ruolo del palmo (palm)

Mg²⁺: A: reduce affinita del O per il suo H

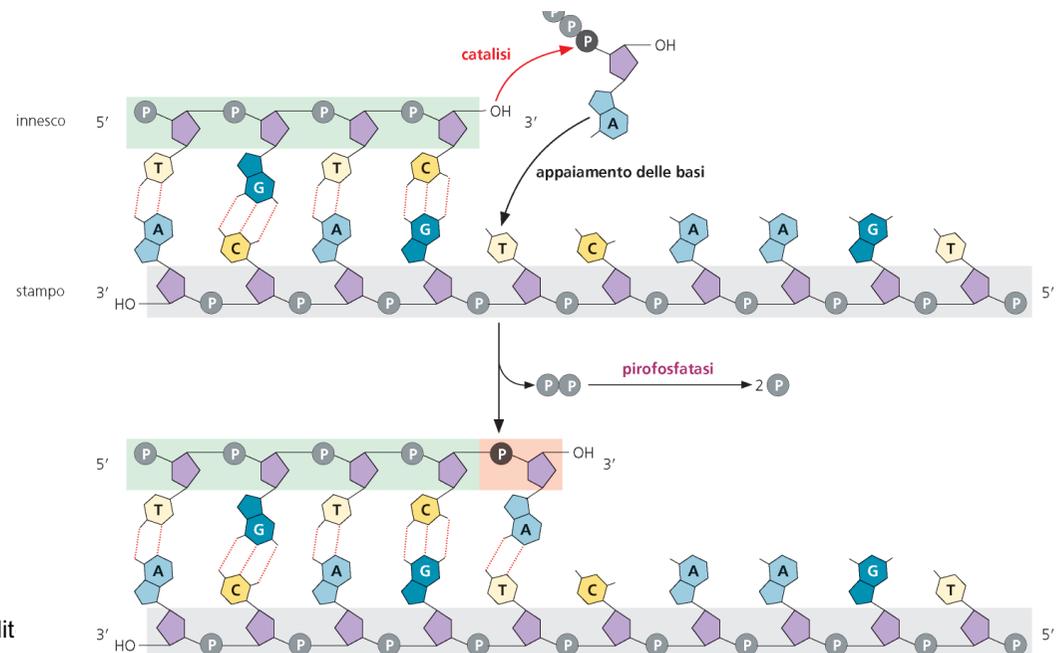
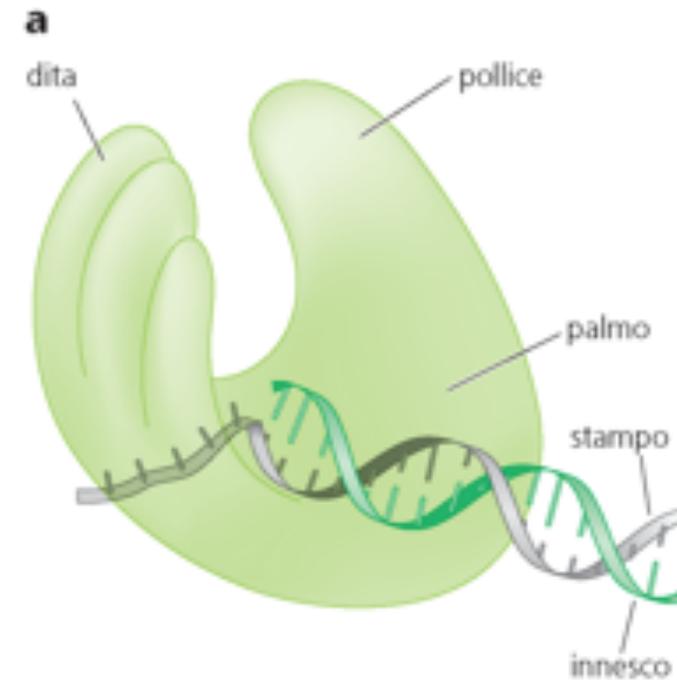
Mg²⁺: B: neutraliza 3 cariche negative del trifosfato



IL PALM AFFERA LA GIUNZIONE INNESCO:STAMPO

Il ruolo del palmo (palm)

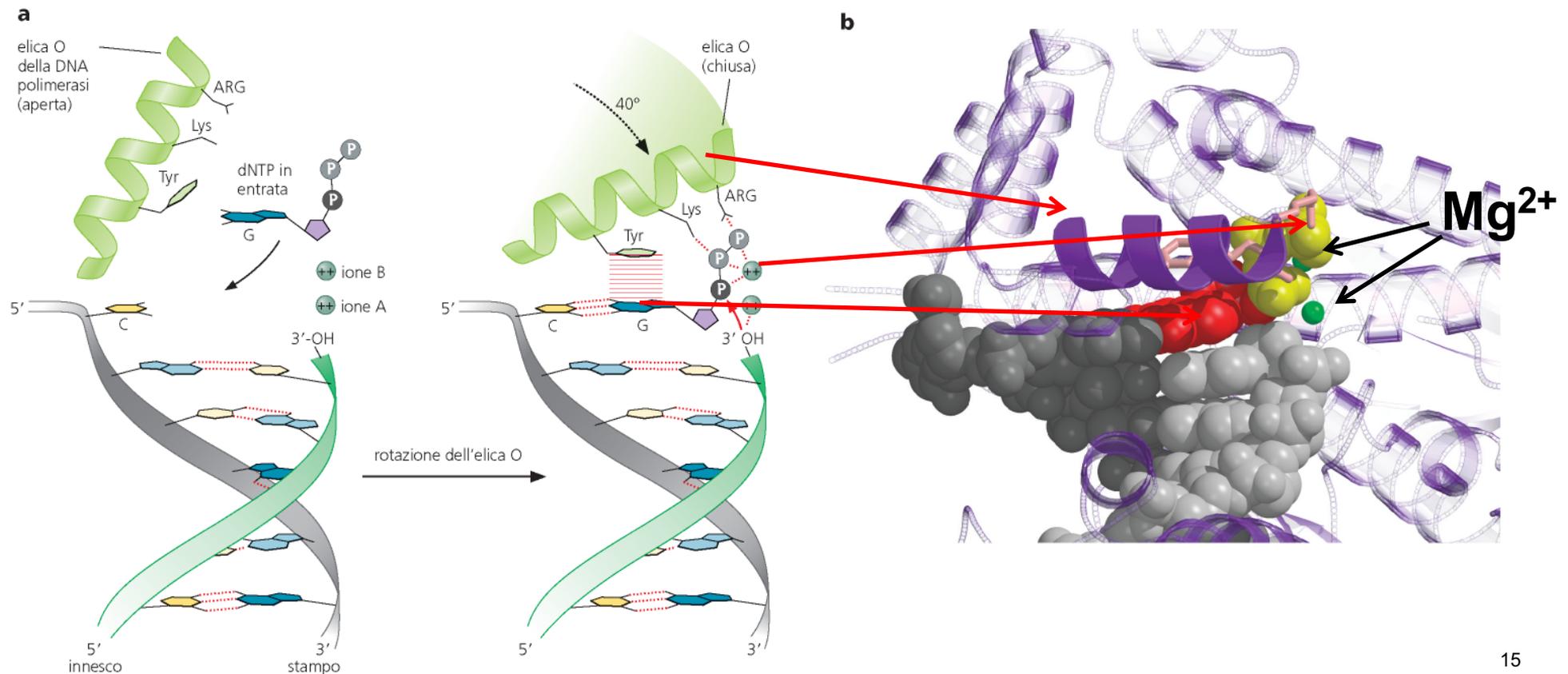
- controlla l'appaiamento delle basi appena state polimerizzate attraverso **numerosi legami idrogeno** attraverso il **minor groove**
- struttura del palm permette una interazione indipendente della sequenza
- Appaiamenti scorrette ostacolano i contatti nel solco minore →
Abbassamento della velocità di catalisi
- Nucleotidi mal appaiati vengono eliminati → proofreading (controllo dell'accuratezza della sintesi)



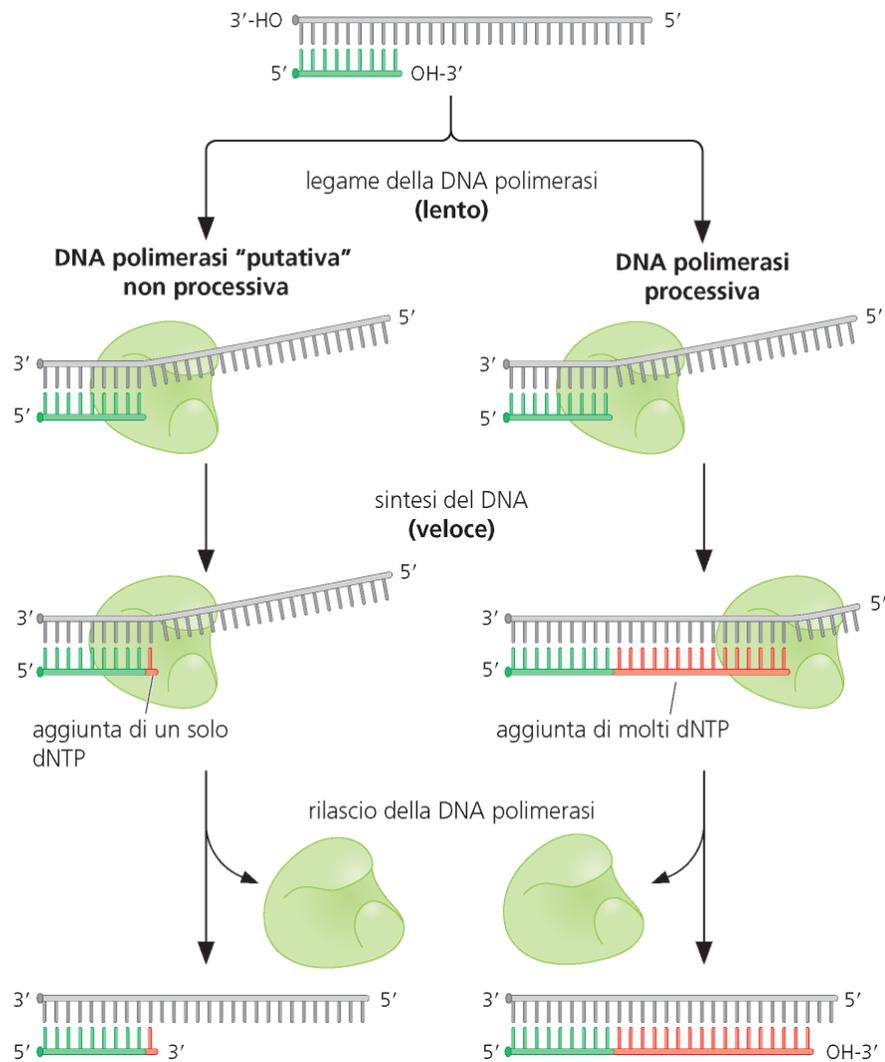
La DNA pol “afferra” lo stampo e il nucleotide da incorporare una volta formata la coppia di basi complementari

Il ruolo delle dita:

- entra dNTP in centro catalitico
- appaiamento del dNTP con stampo
- rotazione 40 gradi delle elica O
- Tyr della elica O forma interazione con la base (hydrophobic interaction)
- Lys and Arg della elica O stabiliscono il trifosfato
- Mg^{2+} (Zn^{2+}) in centro catalitico: 1. reduce affinita del 3' O del ribosio per il suo H; 2. neutralizza 3 cariche negative del trifosfato



Le DNA polimerasi sono enzimi processivi



Step più importante della sintesi
= **rate limiting step/reazione limitante**
→ **LEGAME POL ALLA GIUNZIONE**
STAMPO-INNESCO (1 secondo)

Pol non processiva:

condizioni non favorevole; polimerasi lascia il substrato dopo aver aggiunto 1 dNTP

Pol processiva:

Partenza OK; sintesi/polimerizzazione accelera **1000nt per seconda**. Max sites: **50.000** nucleotidi

Forze di interazione:

1. Pollice + Fosfati impalcatura interazioni elettrostatiche
2. Palmo: Solco minore: H-bonds

Dopo sintesi di 1 nucleotide

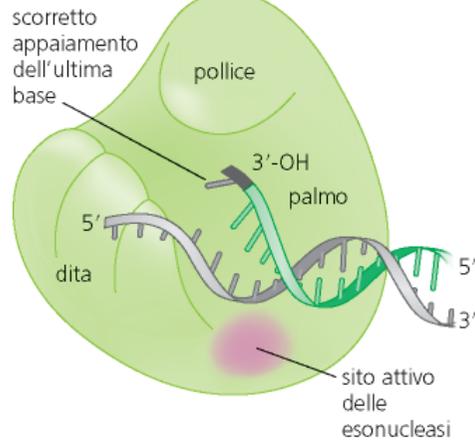
H-bonds vengono rotti

Interazione pollice-DNA mantenute

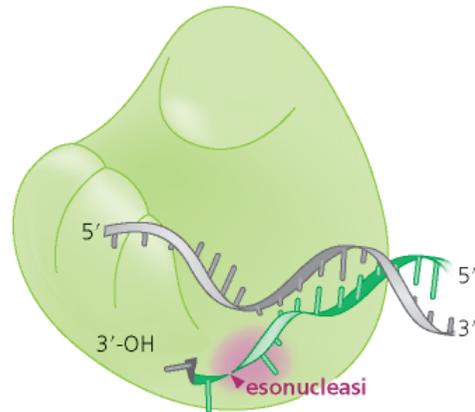
Pol se muove 1 nt avanti e H-bonds vengono stabiliti → → → alta velocità della polimerizzazione

Attività esonucleasiche correggono gli errori sul DNA neosintetizzato

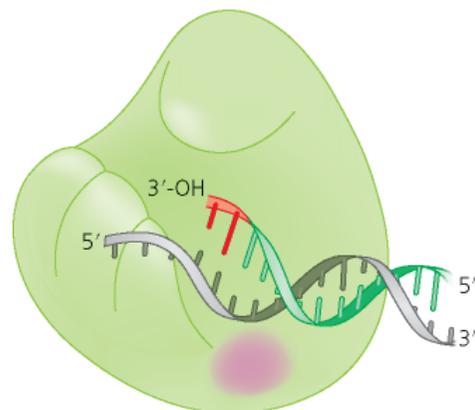
a sintesi del DNA lenta o assente



b rimozione dei nucleotidi male appaiati



c ripristino della normale attività di sintesi



Osservazione:

Correttezza della sintesi: 1 errore per 10^5 nucleotidi, causato solo della tautomeria delle basi (esistono ancora altri motivi per errori)

Osservato: 1 errore per 10^{10} nucleotidi

→ Pol ha **funzione di proofreading!!!**

DNA polimerase:

Attività: $5' \rightarrow 3'$ polimerase

Attività: $3' \rightarrow 5'$ esonuclease (exonuclease)

Viene aggiunto un nucleotide non corretto

→ $3' \text{OH}$ si trova in una posizione non corretto

→ non ha funzione di innesco

→ processività della Pol diminuisce

→ Il sito attivo della DNA Pol lega con scarsa affinità lo stampo mal appaiato

→ varie nucleotidi del filamento neosintetizzato perdono appaiamento

→ il sito attivo della esonucleasi ha un' **affinità** 10 x più alta per l' estremità $3'$ a singolo filamento

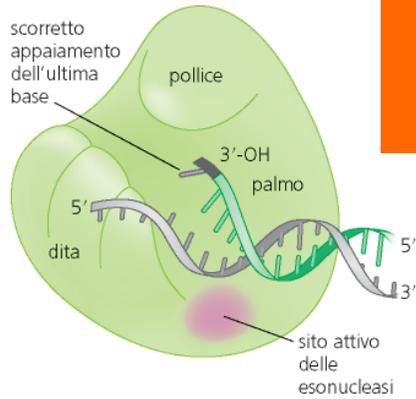
→ **idrolisi di 1 nucleotide** (o anche di più)

→ **innesco OK** → Polimerasi ri-parte

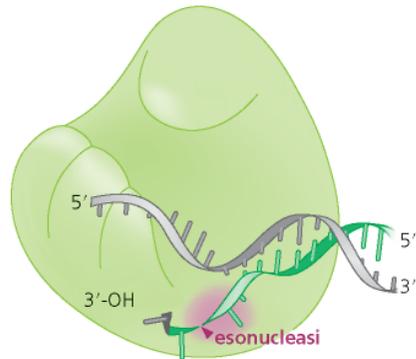
La DNA polimerasi ha una attività esonucleolitica

PROOF-READING EXONUCLEASE ESONUCLEASE CORRETTORE DI BOZZA

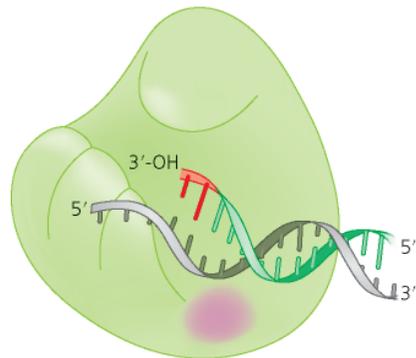
a sintesi del DNA lenta o assente



b rimozione dei nucleotidi male appaiati



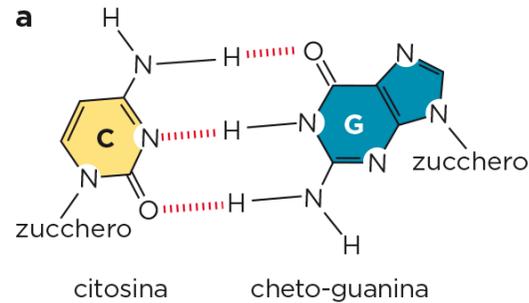
c ripristino della normale attività di sintesi



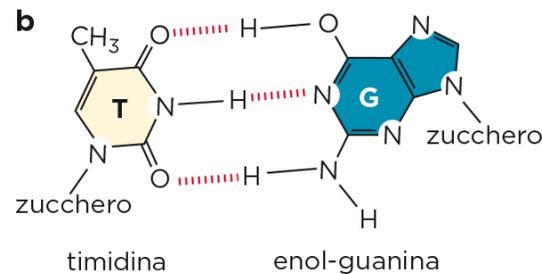
ESEMPIO: TAUTOMERIA DELLA GUANINA

~1/10⁵ viene inserita una forma tautomerica

Esonucleasi correttore di bozze corregge questi errori dalla estremità 3' della catena.



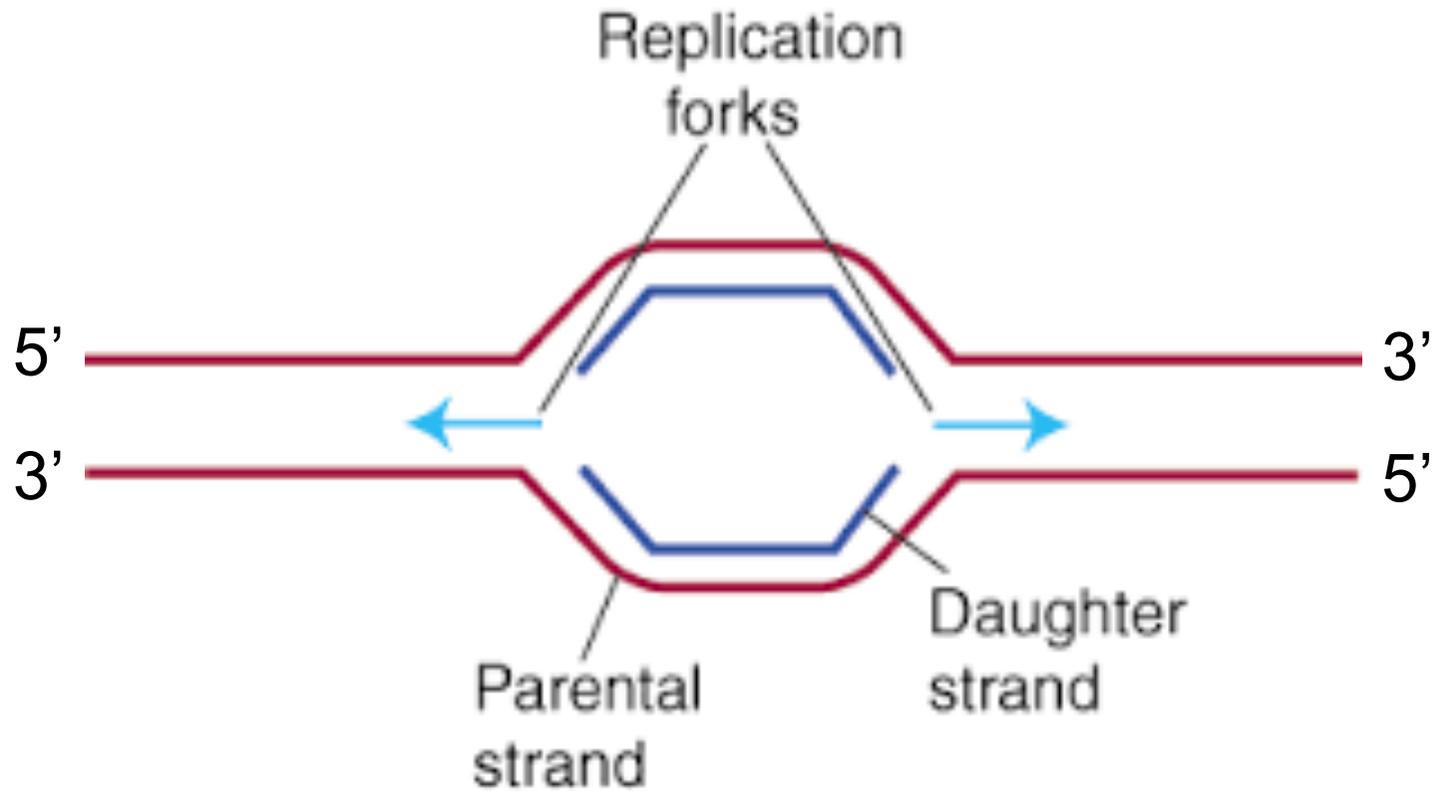
OK



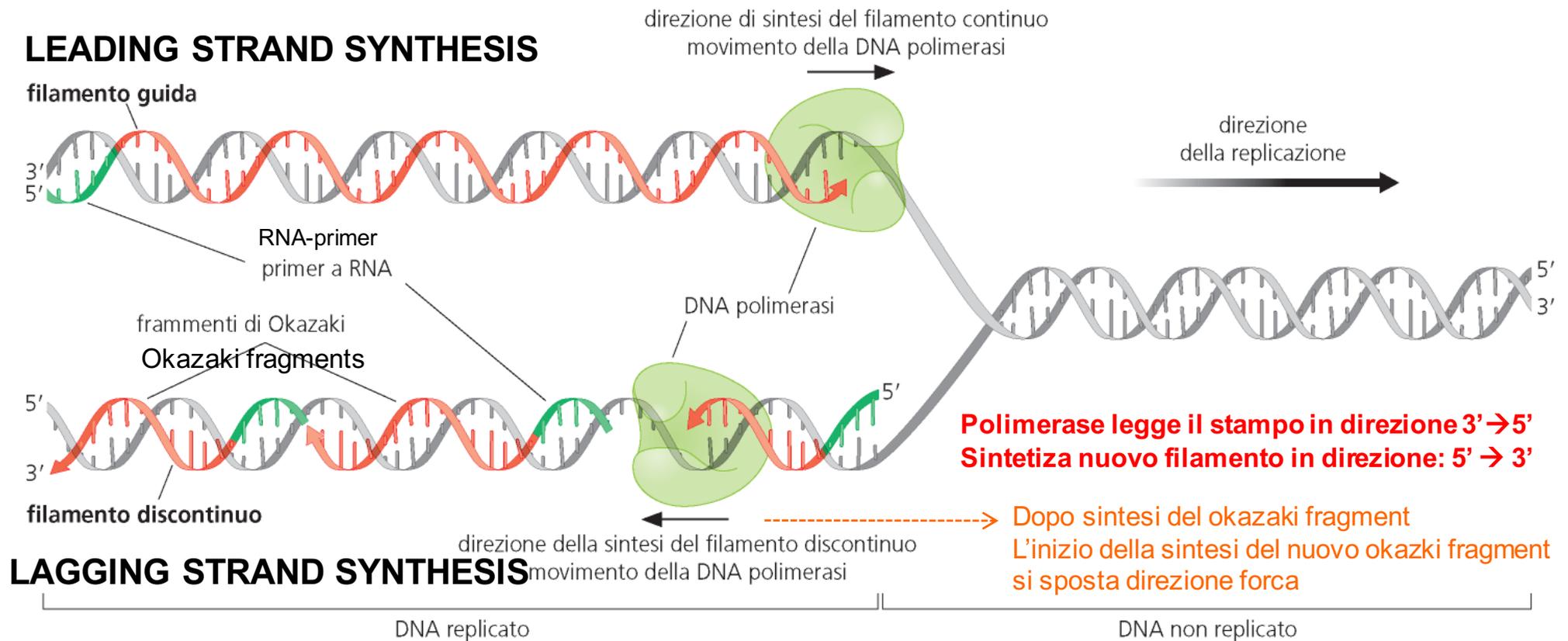
- DNA pol utilizza anche enol-guanina
- Enol-guanina permette un appaiamento T-G
- Forma Cheto-Guanina più frequente →
- Enol-guanina (T-G) cambia forma tautomerica: cheto-guanina
- Appaiamento T-G rappresenta mismatch
- Attivazione della proof-reading exonucleasi

PROOFREADING

THE REPLICATION FORK LA FORCA REPLICATIVA

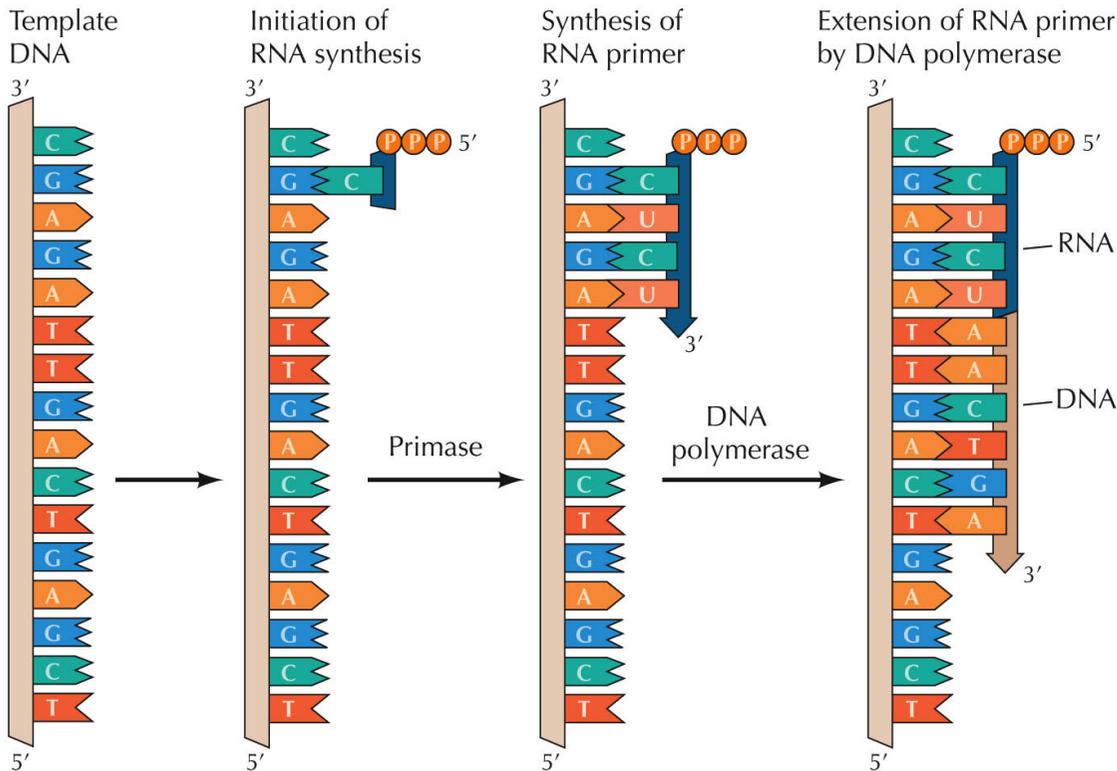


THE REPLICATION FORK LA FORCA REPLICATIVA



Leading strand (filamento continuo) e lagging strand (filamento discontinuo).
La sintesi del filamento discontinuo viene ritardata in modo che si formi un tratto sufficientemente lungo per essere duplicato.
Frammenti di Okazaki (lungi 1000-2000 nei batteri, 100-400 eucarioti)

THE REPLICATION FORK: L' inizio di un nuovo filamento richiede un innesco a RNA = "RNA primer"



THE CELL, Fourth Edition, Figure 6.4 © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.

Primase:

**RNA Pol che sintetizza
5-10 nucleotidi di RNA
= innesco per la DNA Pol**

Primase è una RNA polimerase che non richiede sequenze molto specifiche per iniziare

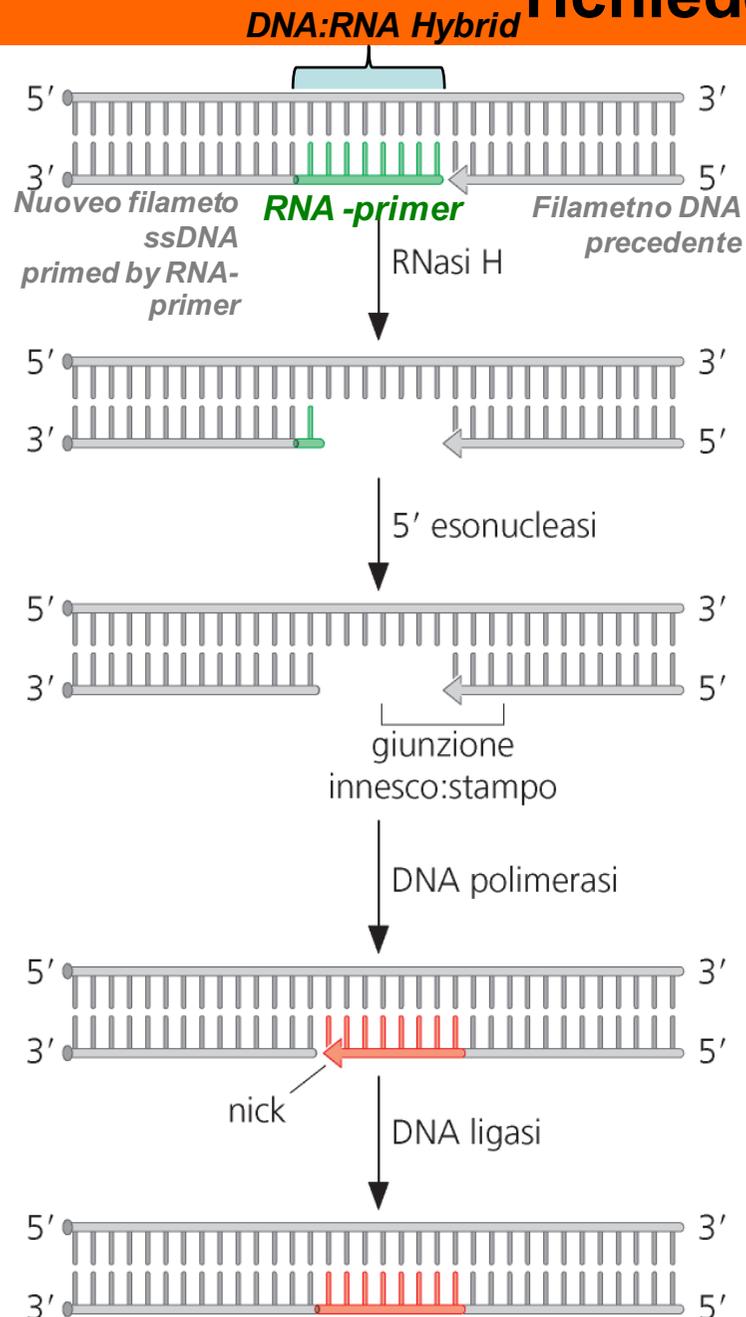
Forma complesso con DNA elicasi

RNA-primers vengono allungati dalla DNA polimerasi

Lagging strand sintesi richiede molti RNA primers

E. coli: Lagging strand DNA contiene più sequenze GTA a rispetto del leading strand

THE REPLICATION FORK L' inizio di un nuovo filamento richiede un innesco a RNA



La primasi è una RNA pol che forma corti inneschi che poi vengono allungati dalla DNA pol.

Leading strand: richiede 1 innesco per <50000 nucleotidi
Lagging strand: richiede un primer ogni frammento di Okazaki (100-400 nt eucarioti; 1000-2000 nt batterie).

RNasi H riconosce idrolizza ribonucleotidi (impalcatura), eccetto il ribonucleotide covalentemente attaccato al nucleotide di inizio del DNA. Il ribonucleotide viene rimossa da una esonucleasi.

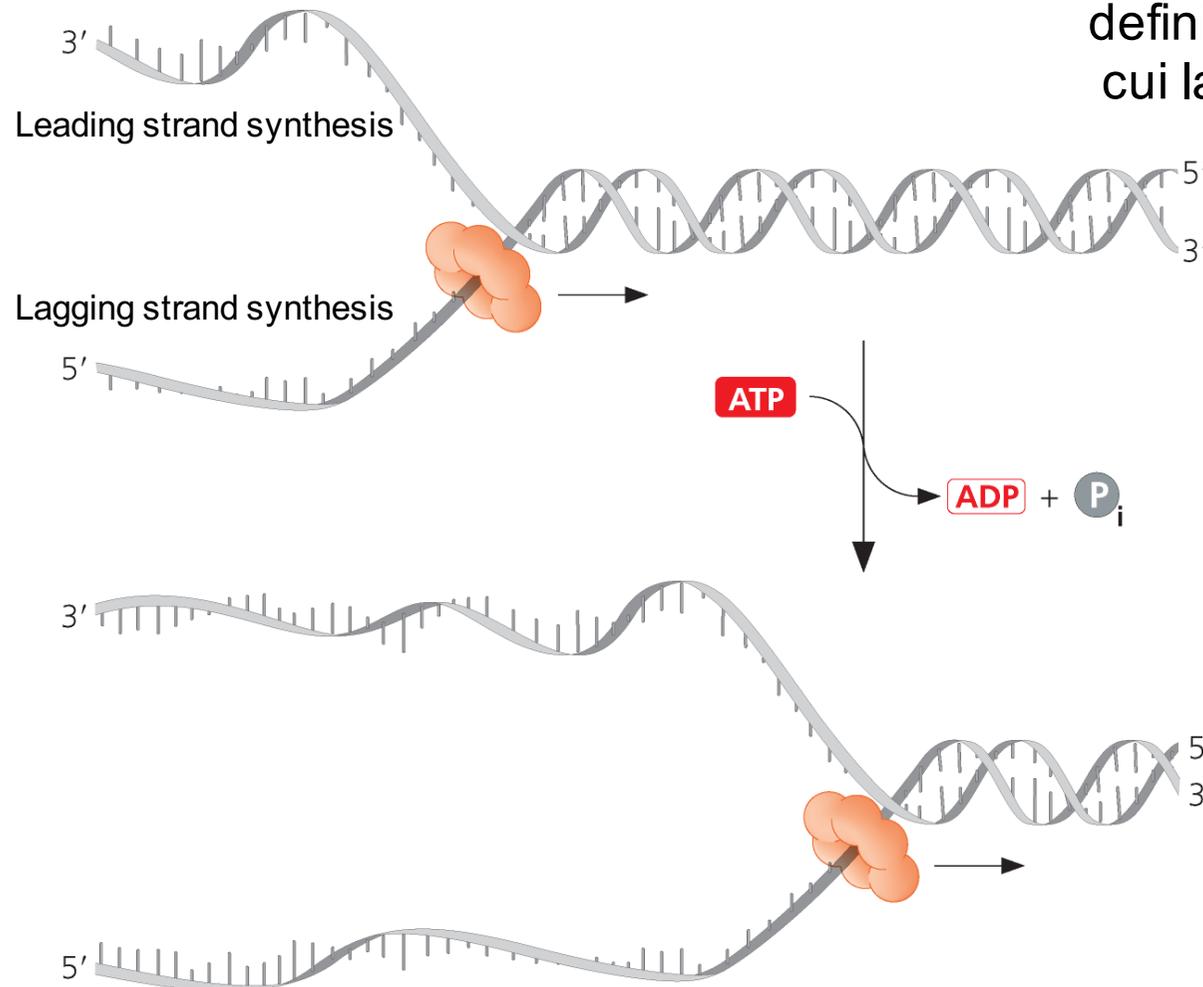
viene poi riempito dalla **DNA polimerasi**

il nick sigillato dalla **DNA ligasi**.

THE REPLICATION FORK: La DNA elicasi separa i due filamenti di DNA

ELICASI: Enzimi che legano e si spostano lungo il ssDNA utilizzando ATP. Proteine esameriche che assumono la forma ad anello. Altamente processive.

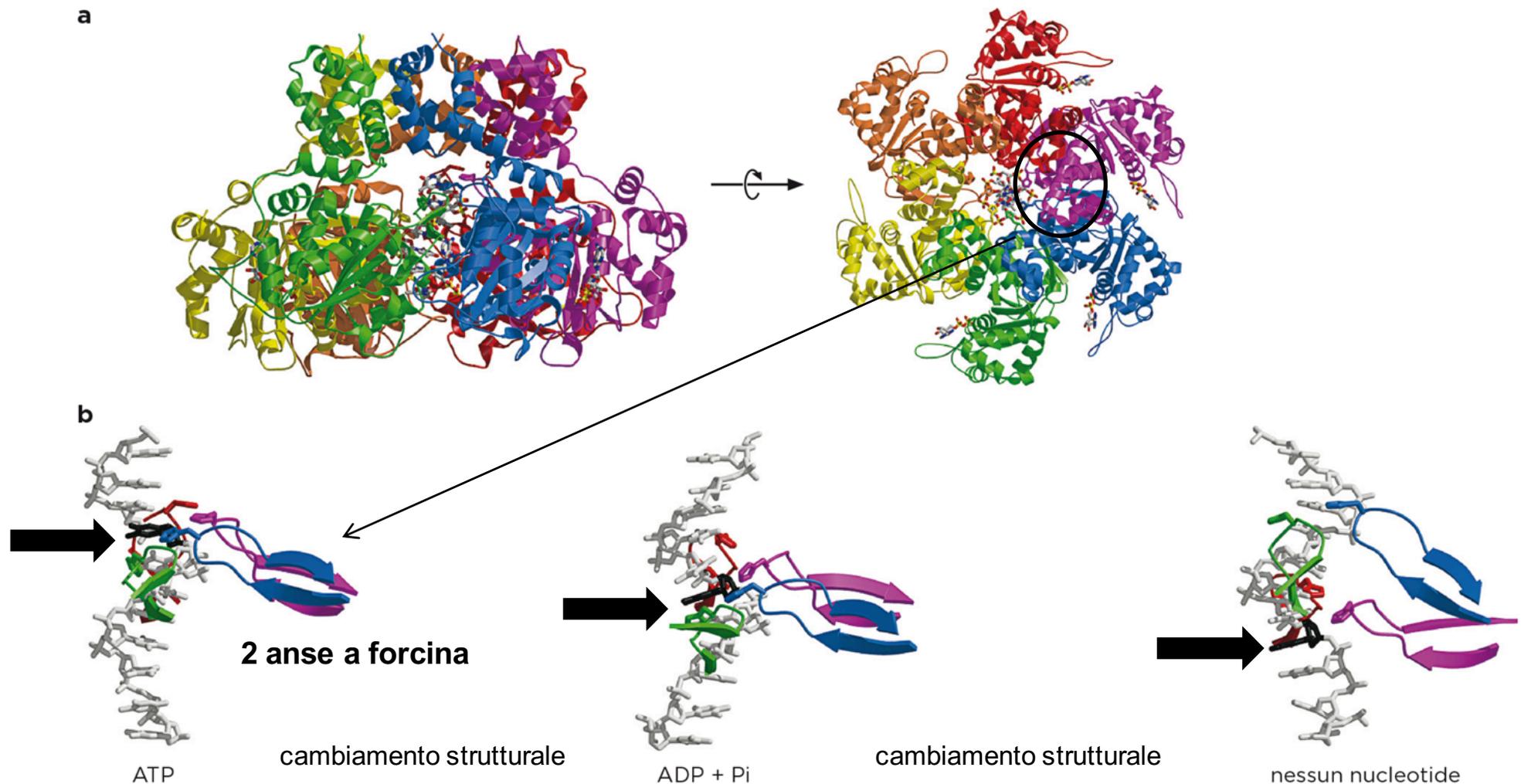
POLARITÀ: Orientamento della processività: $5' \rightarrow 3'$ anche $3' \rightarrow 5'$ definito tenendo conto del filamento cui la elicasi si lega



DNA replication:
DNA elicase con polarità
 $5' \rightarrow 3'$

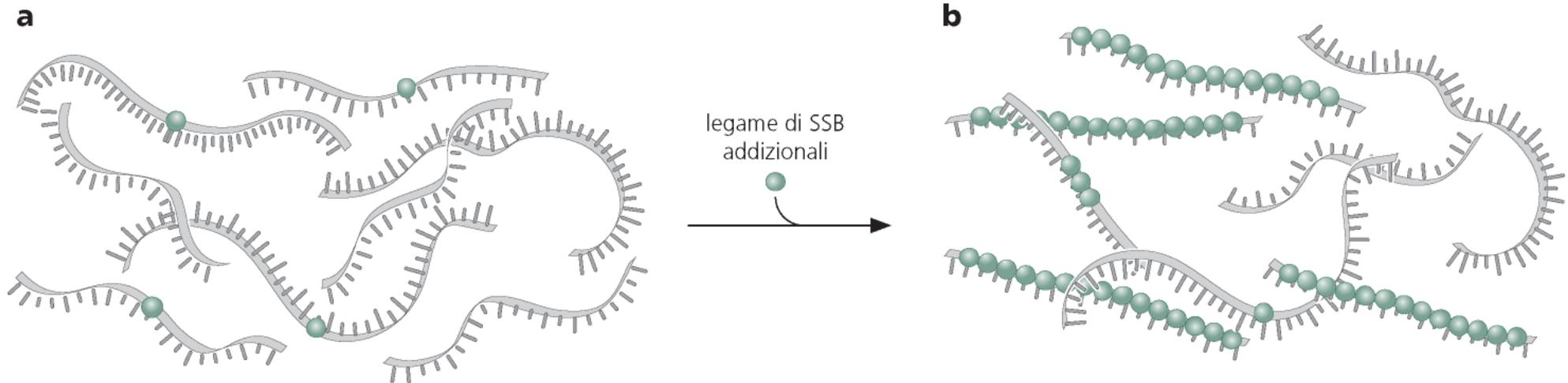
La DNA elicasi tira il DNA a singolo filamento attraverso un poro centrale

DNA elicase: 6 subunità. Ciascuna subunità ha un'ansa a "forcina" che lega un fosfato e i due ribosi del DNA. ATP hydrolysis → movimento coordinato lungo il filamento ssDNA. → Separa anche i due filamenti (poro centrale stretto per il doppio filamento - passa solo il singolo). "6 mani che tirano una fune".

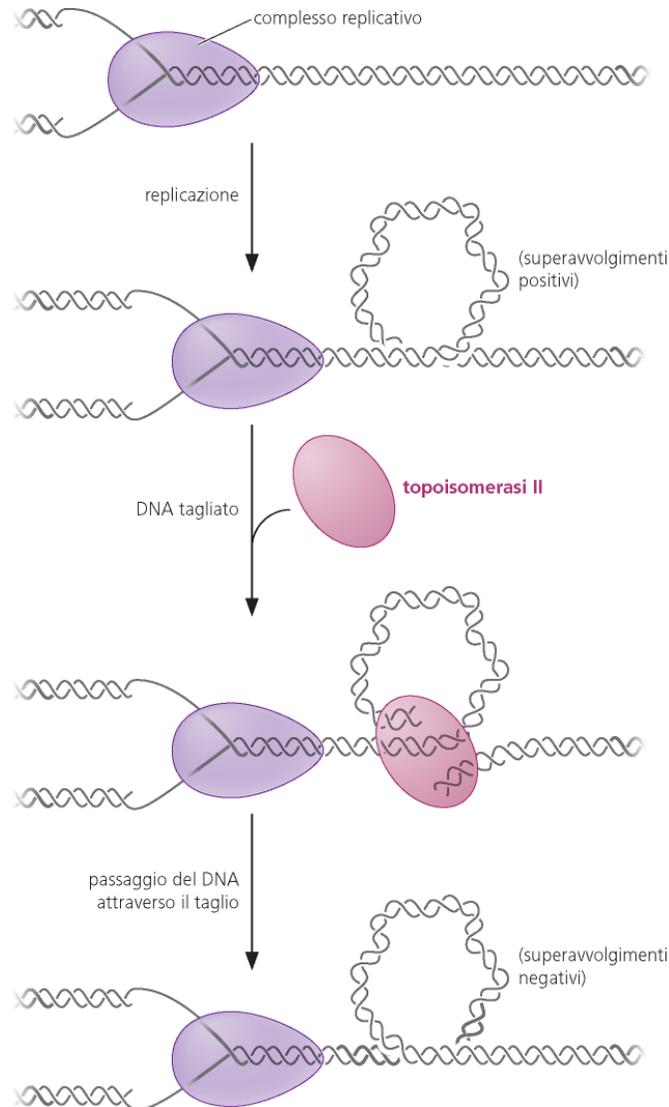


Proteine che legano il ssDNA stabilizzano la sua struttura prima della replicazione

Dopo il passaggio dell'elicasi il DNA potrebbe riappaiarsi.
Per stabilizzare → ssDNA-binding proteins.
Legame cooperativo, "non sequence specific": interazioni elettrostatiche, impilamento con le basi
(proteine: RPA)



Le topoisomerasi rimuovono i superavvolgimenti prodotti dall'apertura del DNA



A valle dei filamenti separati si formano superavvolgimenti positivi.

Se non si eliminassero superavvolgimenti la replicazione si fermerebbe a causa della tensione.

→ Stress strutturale = REPLICATIVE STRESS

Rottura ssDNA → DNA damage signal (P-RPA) → DNA repair

→ Genomic instability → Cell death or elevated risk of cancer formation

Topoisomerasi II + I

Le polimerasi sono specializzate in ruoli differenti

TABELLA 8.1 Enzimi che agiscono a livello della forca 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

TABELLA 8.2 Attività e funzioni delle DNA polimerasi

Procarioti (<i>E. coli</i>)	Numero delle subunità	Funzioni
Pol I	1	Rimozione dell'innesco, riparazione del DNA
Pol II (Din A)	1	Riparazione del DNA
Pol III core	3	Replicazione del cromosoma
Pol III oloenzima	9	Replicazione del cromosoma
Pol IV (Din B)	1	Riparazione del DNA, sintesi delle translesioni (TLS)
Pol V (UmuC, UmuD' ₂ C)	3	TLS
Eucarioti	Numero delle subunità	Funzioni
Pol α	4	Sintesi dell'innesco durante la replicazione del DNA
Pol β	1	Riparazione delle basi eliminate
Pol γ	3	Replicazione del DNA mitocondriale e riparazione
Pol δ	2-3	Sintesi di DNA sul filamento discontinuo; riparazione delle basi e dei nucleotidi eliminati
Pol ϵ	4	Sintesi di DNA sul filamento guida; riparazione delle basi e dei nucleotidi eliminati
Pol θ	1	Riparazione dei cross-link
Pol ζ	1	Sintesi delle translesioni (TLS)
Pol λ	1	Riparazione del DNA associato alla meiosi
Pol μ	1	Ipermutazioni somatiche
Pol κ	1	TLS
Pol η	1	TLS relativamente accurate dei dimeri di <i>cis-sin</i> ciclobutano
Pol ι	1	TLS, ipermutazioni somatiche
Rev1	1	TLS

Dati da Sutton M.D. e Walker G.C. 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 8342-8349 e i riferimenti in questo contenuto.