PASSWORD MOODLE FEDERALE

biomol

Le DNA polimerasi sono specializzate in ruoli differenti

TABELLA 8.2 Attività e funzioni delle DNA polimerasi

Procarioti (*E. coli*)	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 *cis-sin* 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 contenuti.

Primasi: RNA polimerasi è associata all'elicasi

DNA Pol I: debole 5'→3' synthesis activity
Utilizza 3'→5' exonuclease activity per eliminare RNA primer (dopo RNAseH) → riempie gape

DNA Pol III holoenzyme:
Estremamente processiva

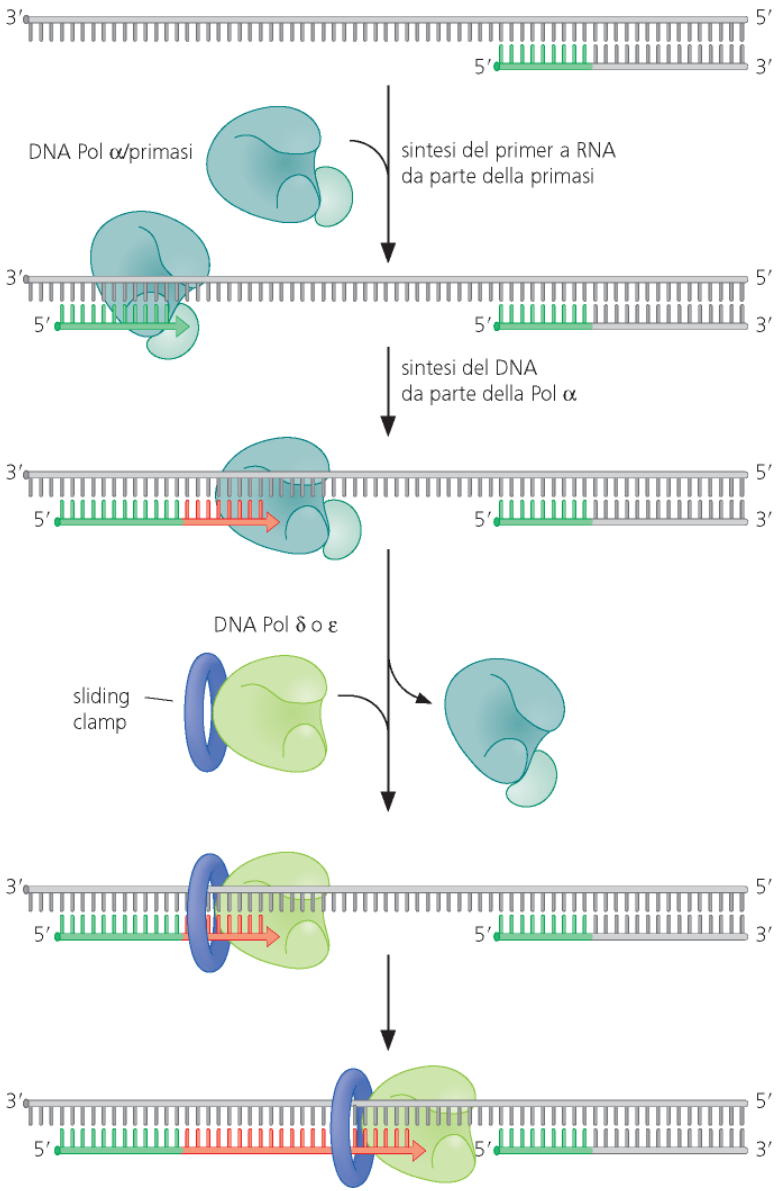
Complesso Pol alpha/Primasi (4 subunita)+ 2subunita x attività Primasi + 2 subunità x attività DNA Polimerasi

Switching della polimerasi

Duplicazione del genoma (varie subunita)

Copyright © 2009

Switching della polimerasi (eucarioti)



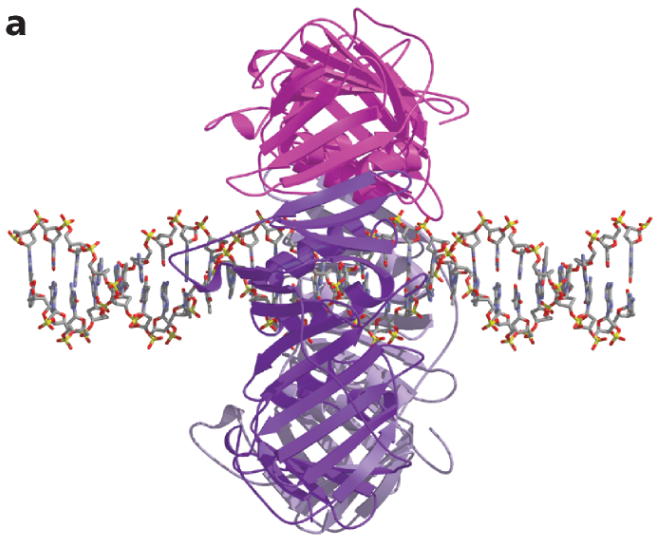
Subunità Primase: sintesi del RNA primer

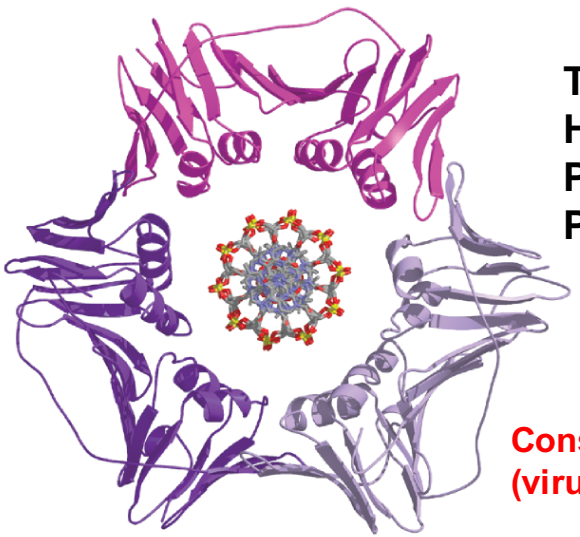
Subunità Pol alpha sintetiza lentamente DNA

Pol delta/epsilon con SLIDING CLAMP rimpiazza DNA Pol alpha/Primase
Riclutamento DNA Pol δ o ε

→ assiemealta processività)

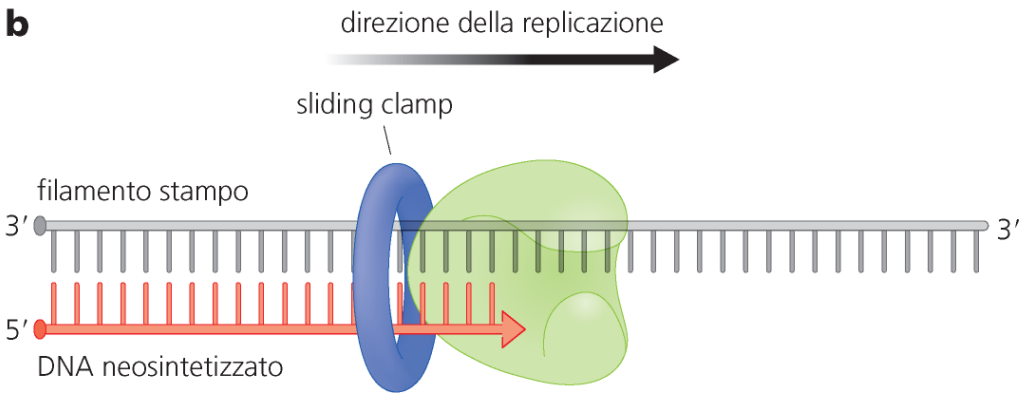
Le proteine che permettono lo scivolamento delle polimerasi (SLIDING CLAMP) aumentano la processività delle DNA pol





TRIMER OF Human PROTEIN PCNA

Conservate nell' evoluzione (virus, pro- eucarioti)



Più subunità a formare una ciambella. Interagiscono fortemente con la replication fork DNA pol (epsilon/delta).

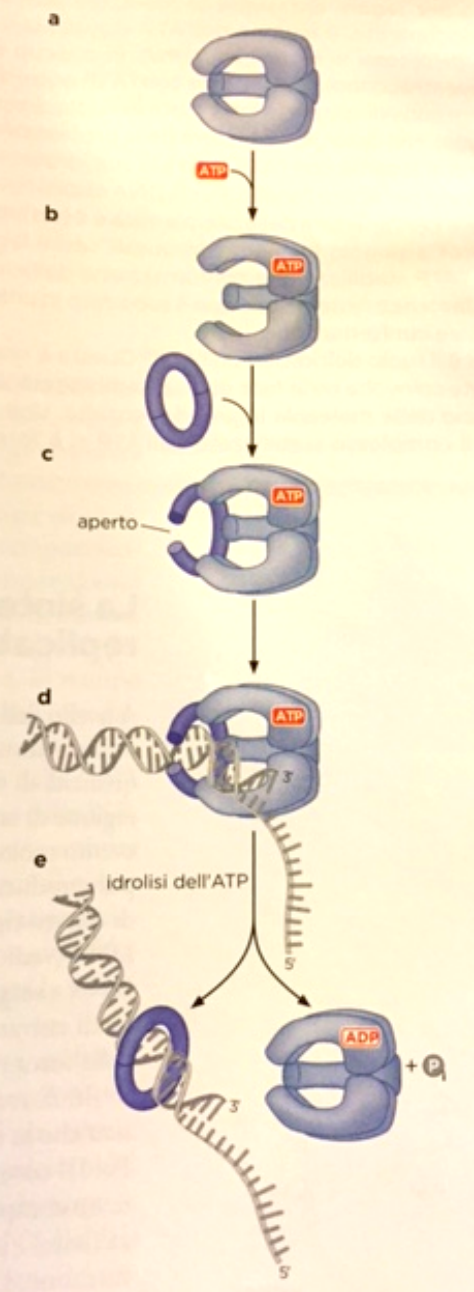
sliding clamp: aumenta la processivita

Senza clamp: DNA Pol lascia il Template dopo ca 20-100nt. Forte interazione con il sliding clamp non permette la dissociazion e polimerase rimane associate con Il DNA neo-sintetizato

Watson et al., BIOLOGIA MOLECOLARE DEL GENE, 6/E, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2009

Le proteine che permettono lo scivolamento delle polimerasi (SLIDING CLAMP) aumentano la processività delle DNA pol

IN VITRO



Caricamento slide clamp:
Preseneza di giunzione stampo:innesco

→Sliding clamp viene charicato da un complesso di proteine (sliding clamp loader
= "factor gamma").
ATPase: caricamento con ATP – clamp loader interagisce con sliding clamp – apre clamp

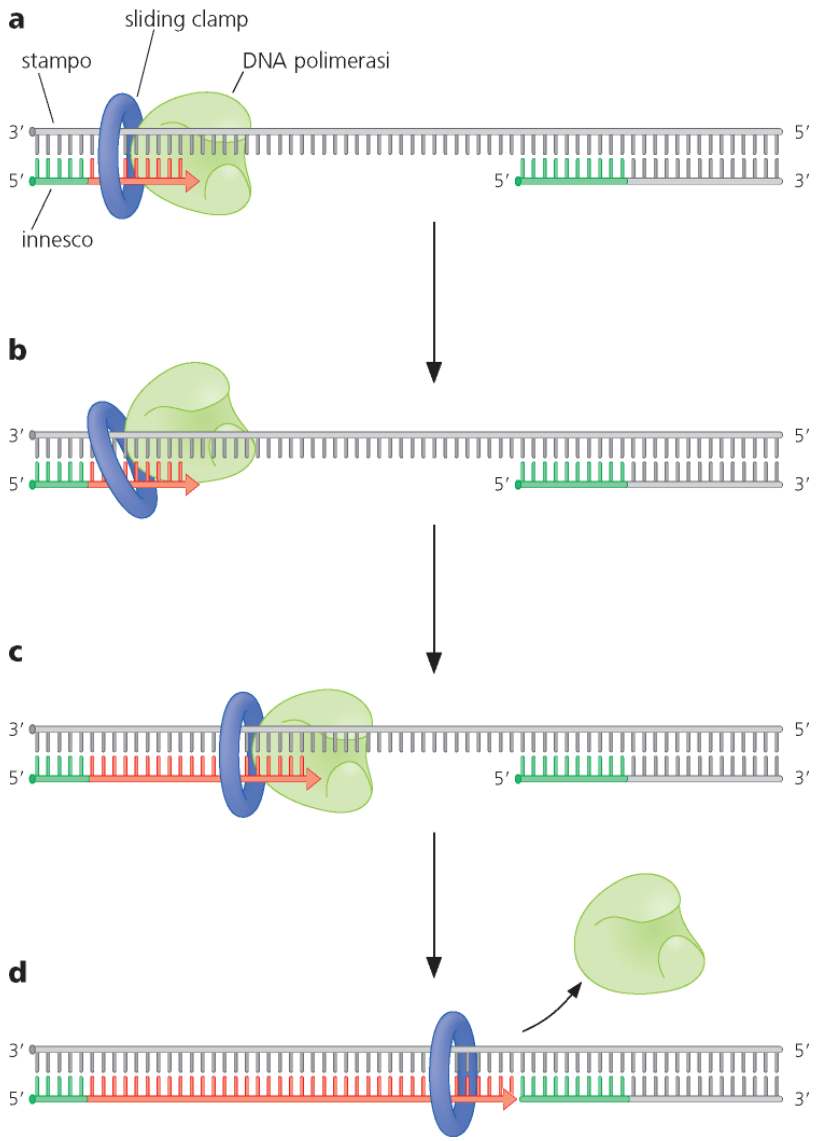
→DNA viene inserito – ATP hydrolysis

→Sliding clamp si chiuede

→SLIDE CLAMP LOADER IS DISATTACHED FROM SLIDING CLAMP

editore S.p.A. Copyright © 2009

Le proteine che permettono lo scivolamento delle polimerasi (SLIDING CLAMP) aumentano la processività delle DNA pol



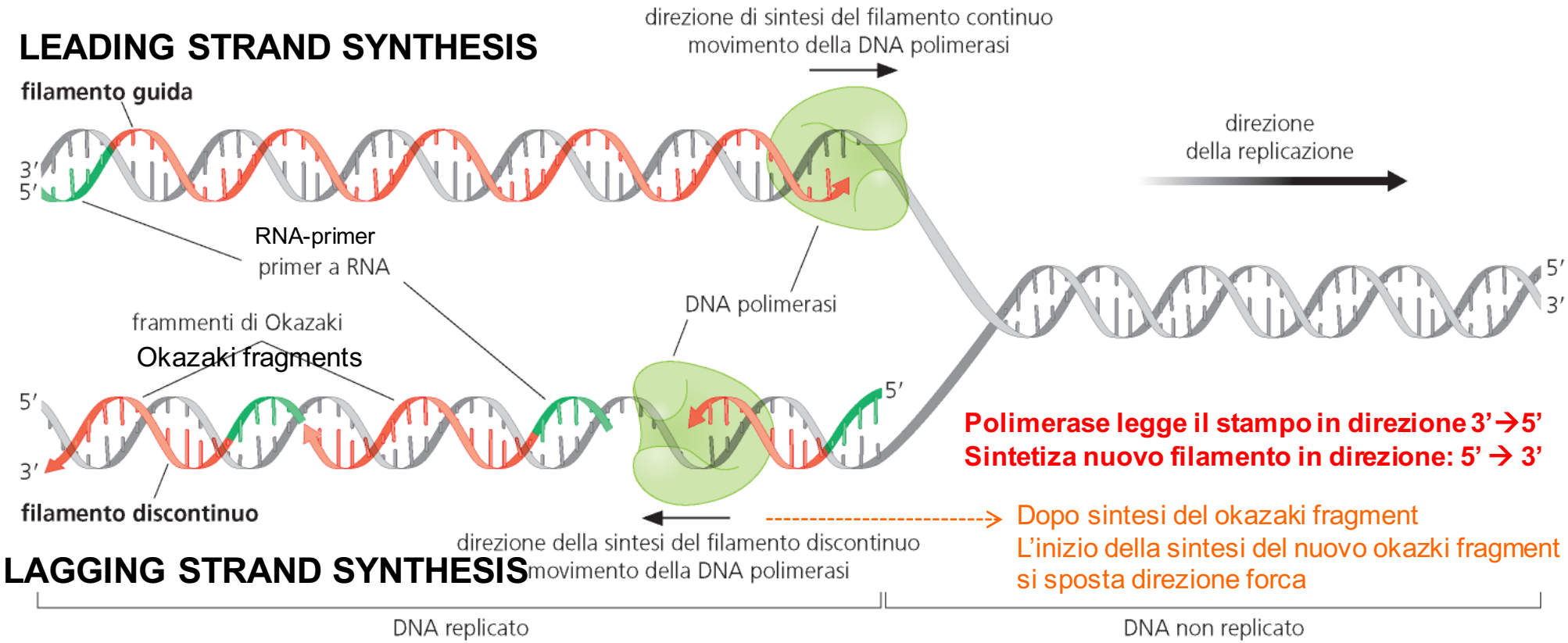
→ La DNA pol ha una grande affinità per la sliding clamp

→ Quando raggiunge l'estremità la presenza di dsDNA nel suo sito attivo induce un cambiamento conformazionale che ne riduce l'affinità.

→ Quindi, DNA polimerase viene rilasciata.

→Sliding clamp rimane associato e recluta proteine per la riparazione dei fragementi di Okazaki o chromatin assembly proteins

THE REPLICATION FORK
LA FORCA REPLICATIVA



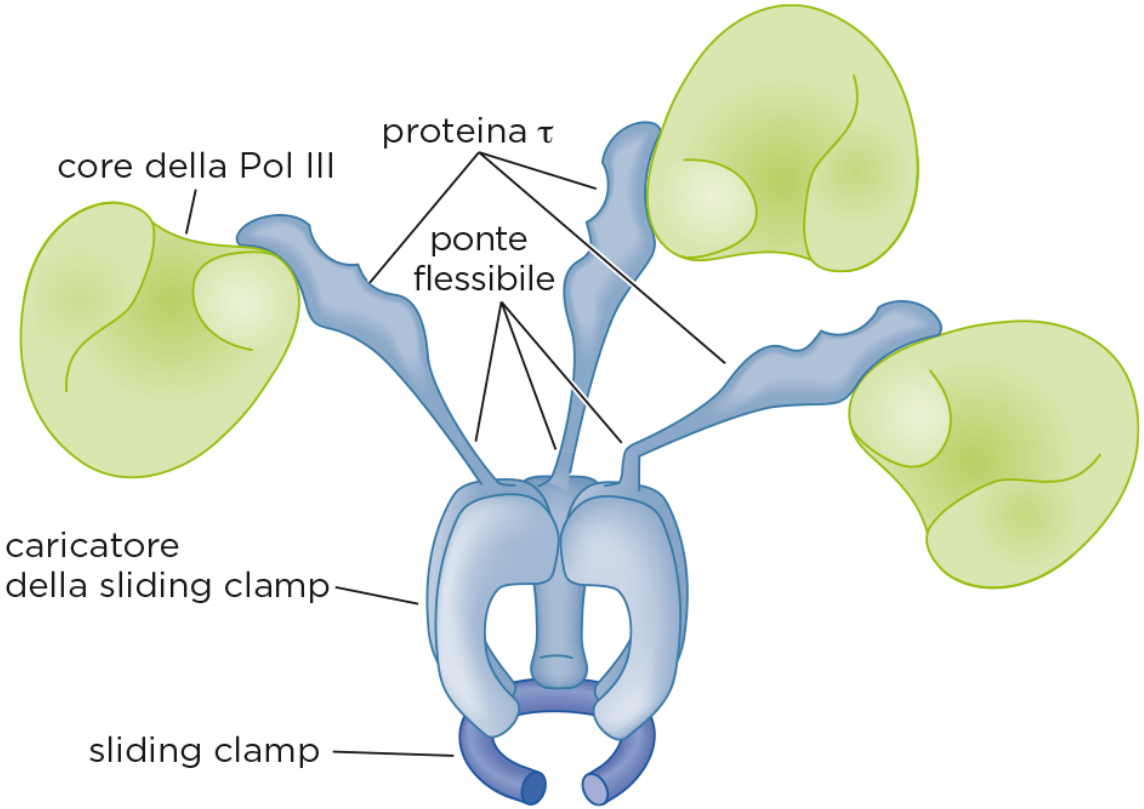
Leading strand (filamento continuo) e lagging strand (filamento discontinuo).
La sintesi del filamento discontinuo viene ritardata in modo che si formi un tratto sufficientemente lungo per essere duplicato.
Frammenti di Okazaki (lunghi 1000-2000 nei batteri, 100-400 eucarioti)

La sintesi del DNA a livello della forca replicativa Model Organism: E.Coli

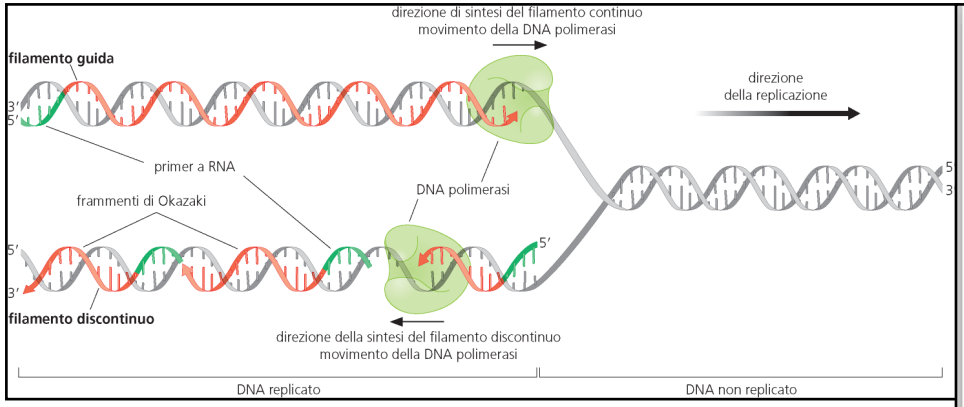
→A livello della forca replicativa il filamento guida e quello discontinuo sono sintetizzati simultaneamente
→ Importante per limitare la presenza di ssDNA
→ ssDNA e fragile; DNA break causa un danno al DNA molto grave

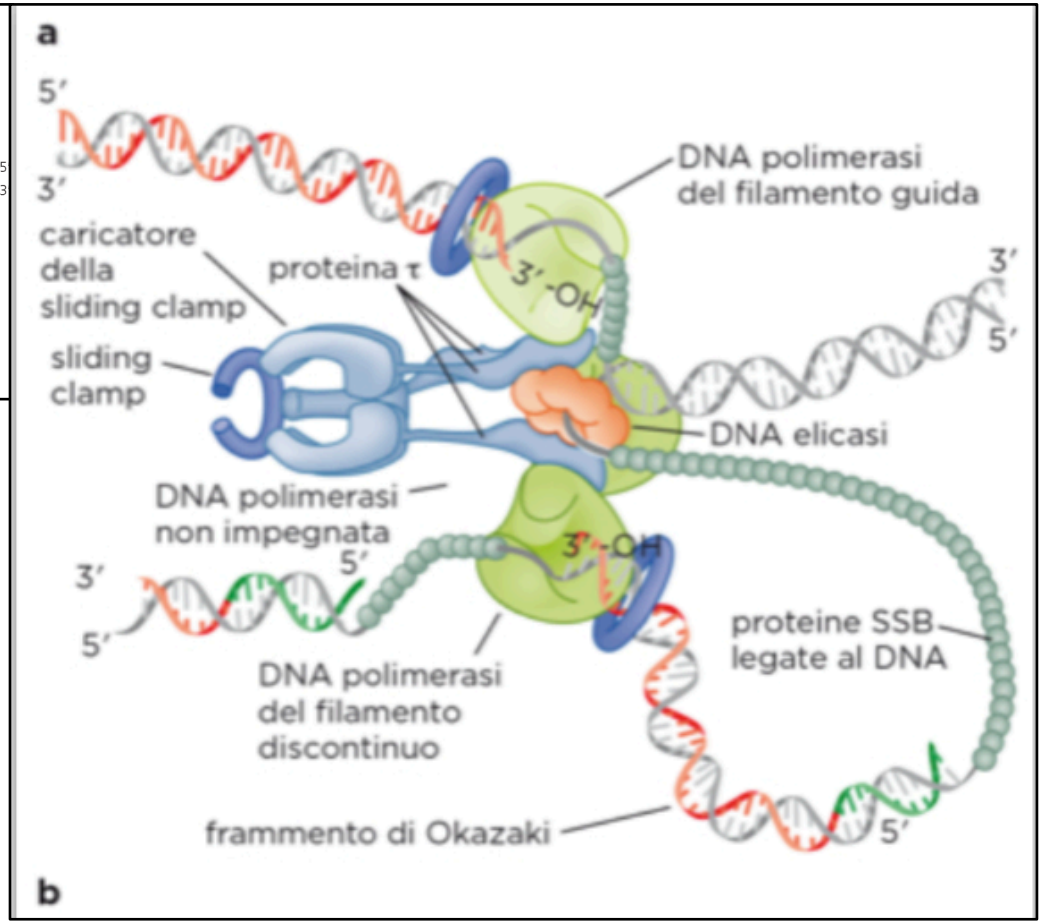
In *E. coli*, *oloenzima* (holoenzyme) DNA pol III è costituito da

- 3 copie del **core enzimatico**
- **sliding clamp loader** (E.coli: complesso gamma)
- **sliding clamp**
- **3 proteine "tau"**



La sintesi del DNA a livello della forca replicativa
Model Organism: E.Coli



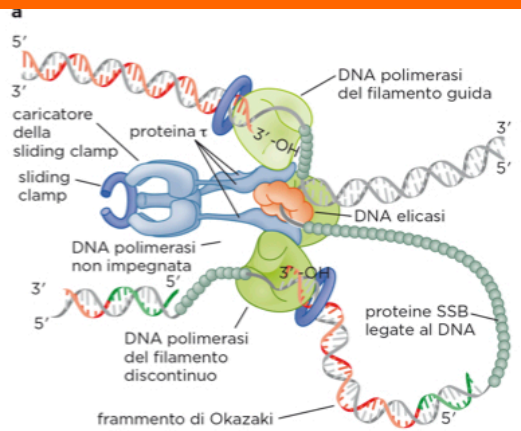


→A livello della forca replicativa il filamento guida e quello discontinuo sono sintetizzati simultaneamente

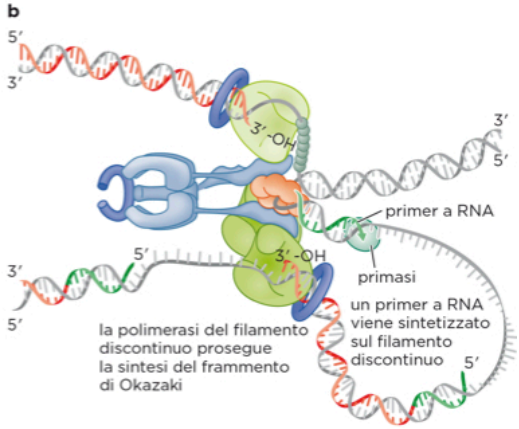
→ Importante per limitare la presenza di ssDNA

→ ssDNA e fragile; DNA break causa un danno al DNA molto grave

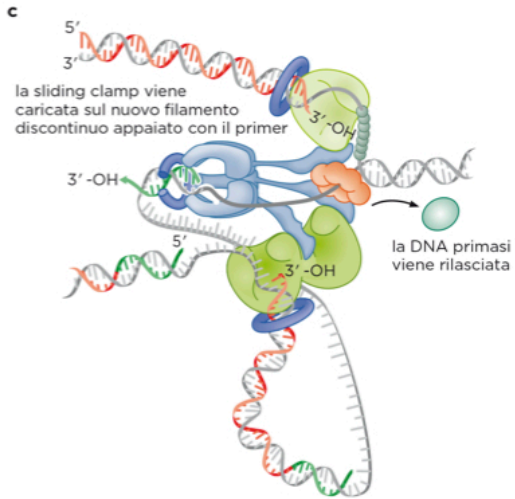
Modello sintesi DNA sulla forca replicativa



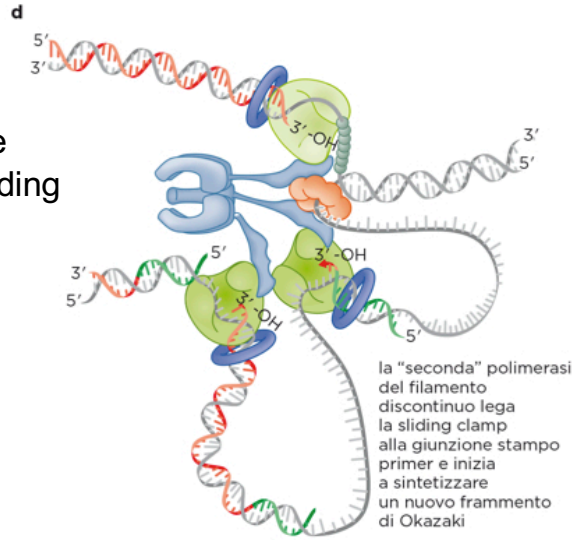
1. Helicase opens dsDNA
2. core polymeraseIII+ sliding clamp loaded for leading strand synthesis (long run until core Pol III is getting inefficient or disattachment by replication error
3. Helicase produces longer ssDNA region for lagging strand Synthesis



4. Primase produces RNA primer for lagging strand synthesis
5. Single stranded template for lagging strand synthesis is twisted backwards



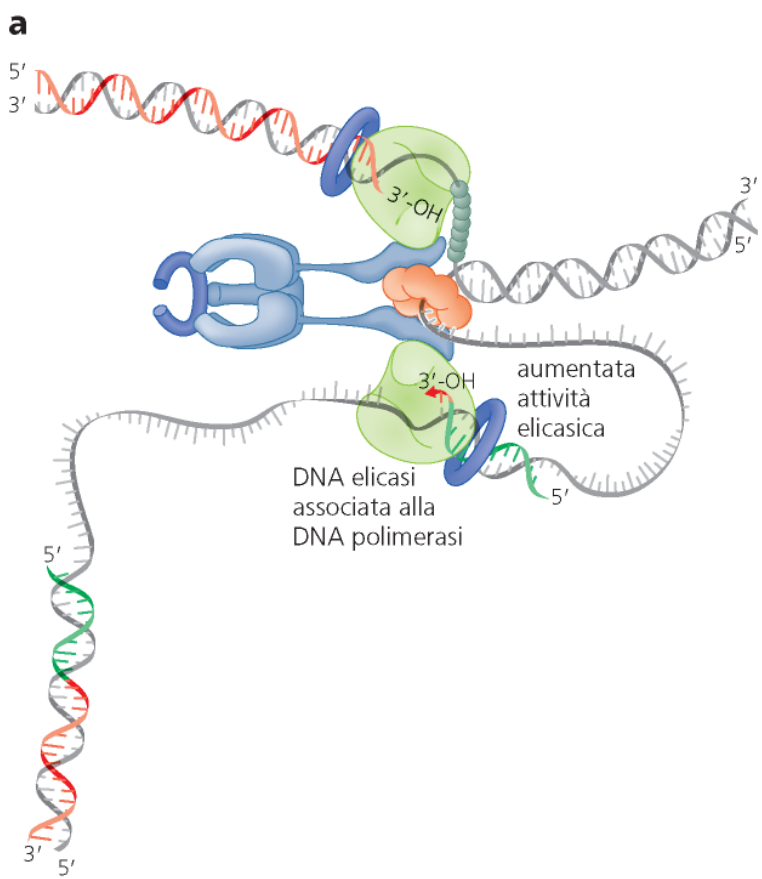
6. Complex gamma loads slidingclamp on RNA:DNA hybrid

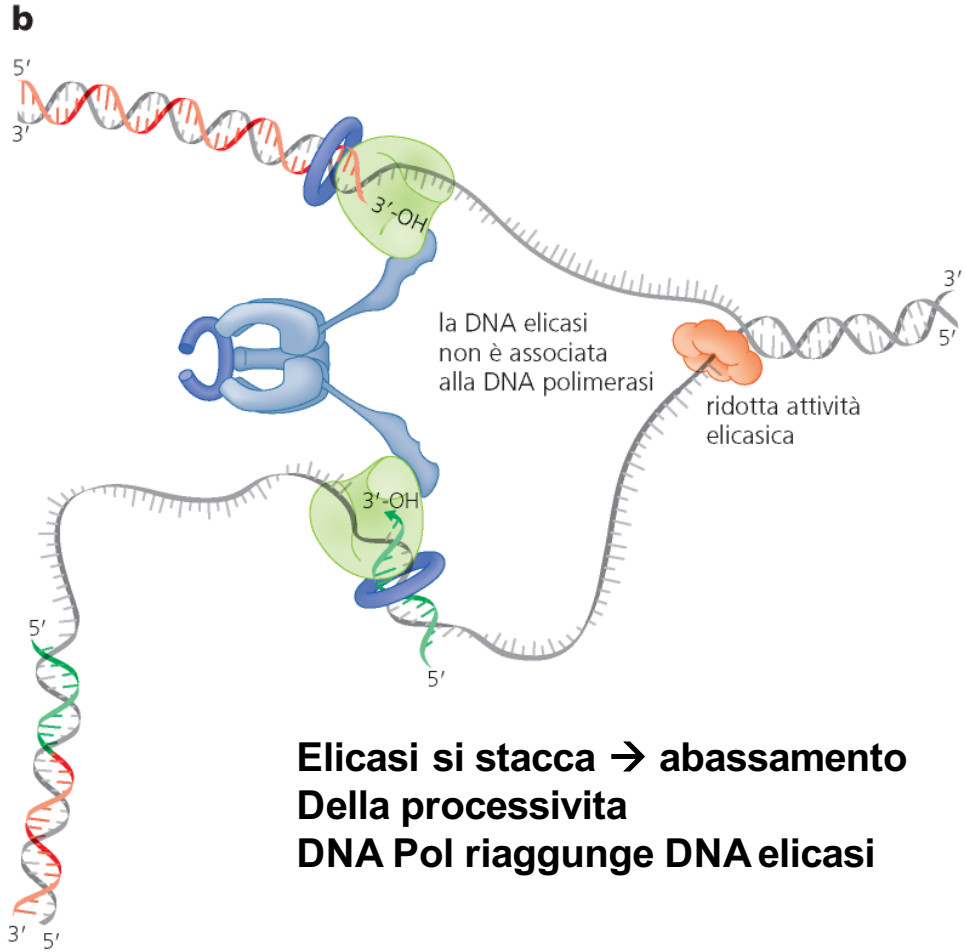


7. Pol III core loaded on sliding clamp

8. When preceding Okazaki fragment Is finished Pol III core Disattaches And moves towards helicase
8.Synthesis of Other Okazaki fragment starts

Il legame della DNA elicasi con la DNA pol III stimola la velocità di separazione dei due filamenti



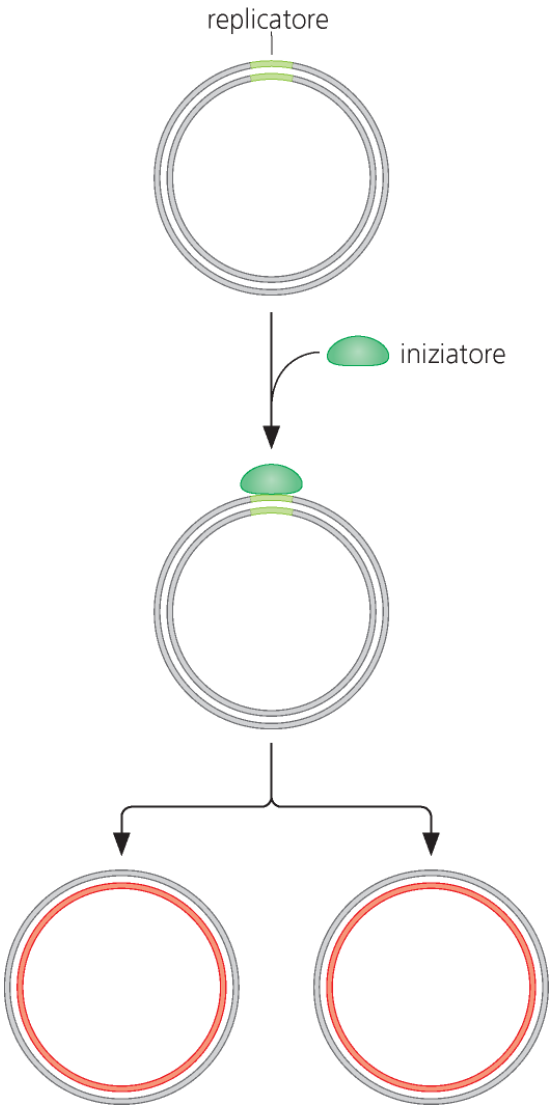


Tau interagisce con elicasi e la DNA polimerase.
Elicasi lavora a velocita della DNA Pol.

Elicasi si stacca → abassamento Della processivita
DNA Pol riaggunge DNA elicasi

Il complesso di tutte le proteine che lavorano alla forca replicativa prende il nome di replisoma (replisome).

La fase di inizio della replicazione
le origini di replicazione (origin of replication)



REPLICON:

Le sequenze nucleotidici sintetizzate a partire da un'unica origine
E.coli: 1 origine di replicazione ("ori") → 1 replicon
H. sapiens: migliaia di "oris" → migliaia replicons

Il modello del **replicone**:

Il ***replicatore***: sequenze in cis sufficienti per dirigere la replicazione.

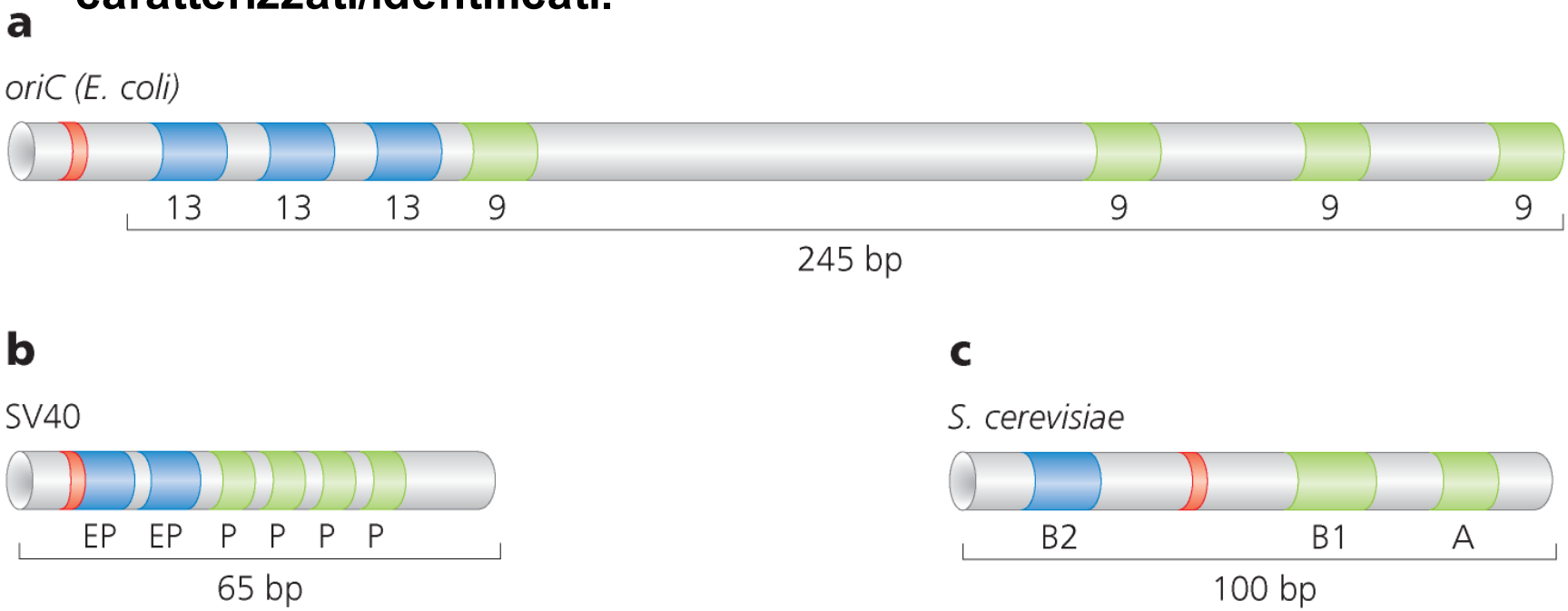
L' **iniziatore**: fattore in trans (proteina) che si lega specificamente al replicatore → avviva la replicazione (sempre ATP binding proteins)

I replicatori includono siti di legame per l'iniziatore

I replicatori includono:

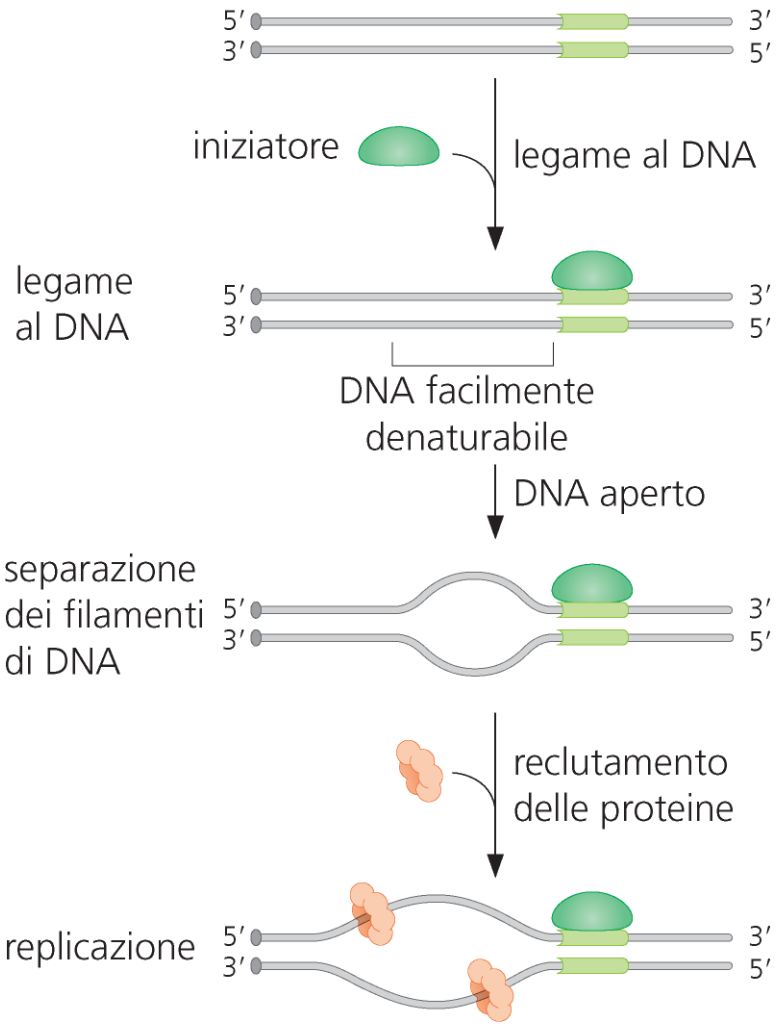
1) Sito di legame per la proteina iniziatrice (verde) → recluta DNA Pol.
2) Tratti ricchi in AT che si aprono facilmente (azzurro)
3) Rosso: inizio della replicazione

In *E. coli* è chiamato *oriC* strutture che svolgono la stessa funzione sono presenti nei virus e nel lievito. Negli **eucarioti multicellulari non sono stati ben caratterizzati/identificati.**



in arancione il sito di inizio della replicazione

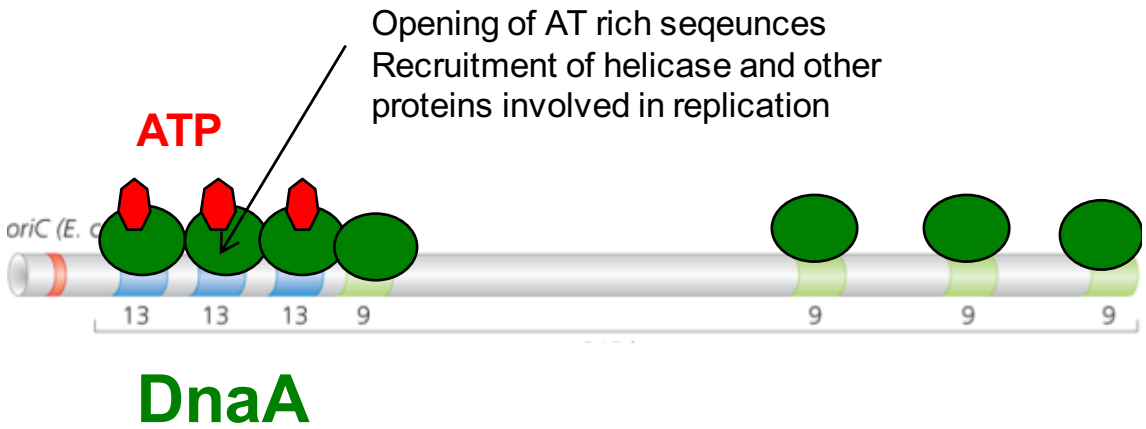
Il legame e l'apertura della doppia elica: l'iniziatore seleziona e attiva l'origine



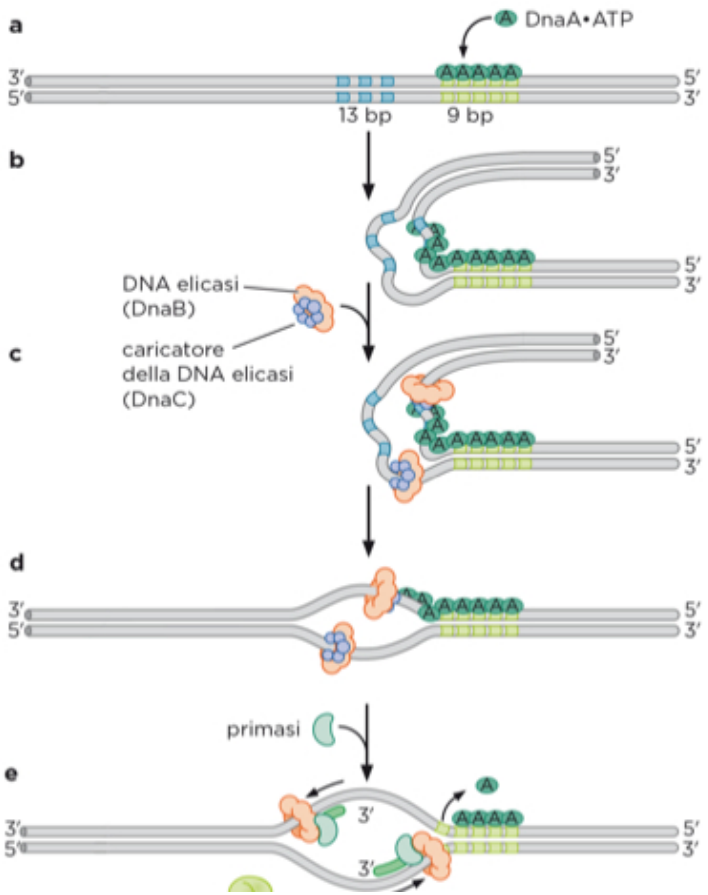
Le proteine iniziatore svolgono almeno 2 funzioni:

1) Legano specifiche sequenze di DNA all'interno del replicatore
2) Interagiscono con altri fattori richiesti per l'inizio della replicazione reclutandoli
3) Piegano o svolgono una regione di DNA adiacente al sito di legame favorendo l'apertura della doppia elica.

Iniziatore E.coli: DnaA, Eucarioti: ORC



Modello per l'inizio di replicazione del DNA in *E. coli*



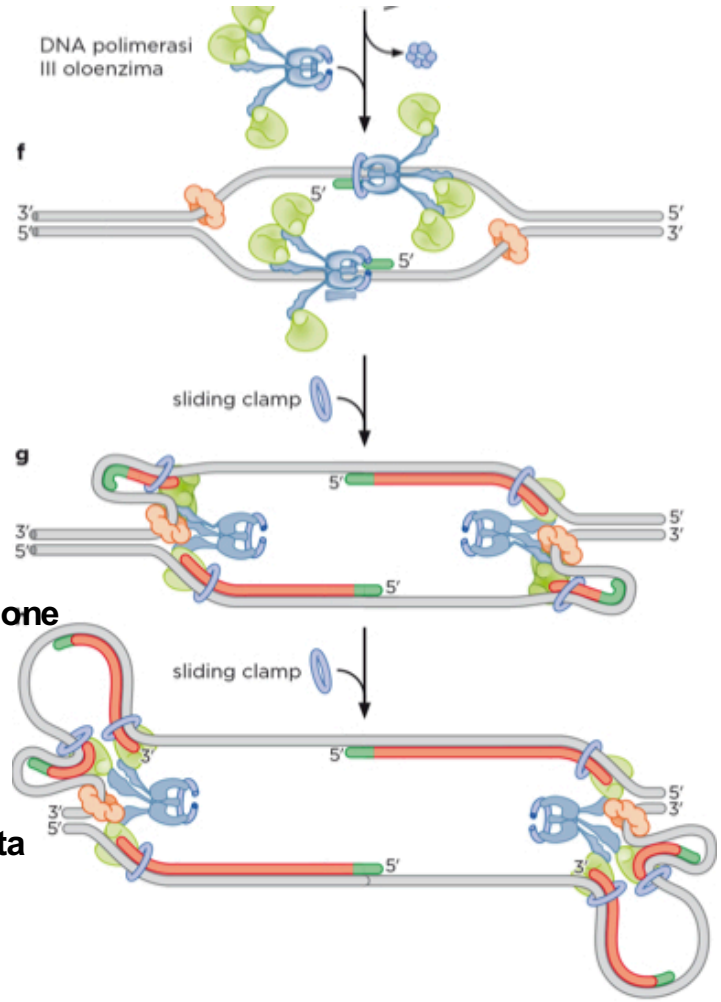
DnaA-ATP
si lega a 9bp e
13bp box

DNA viene piegato
AT repeats si aprono

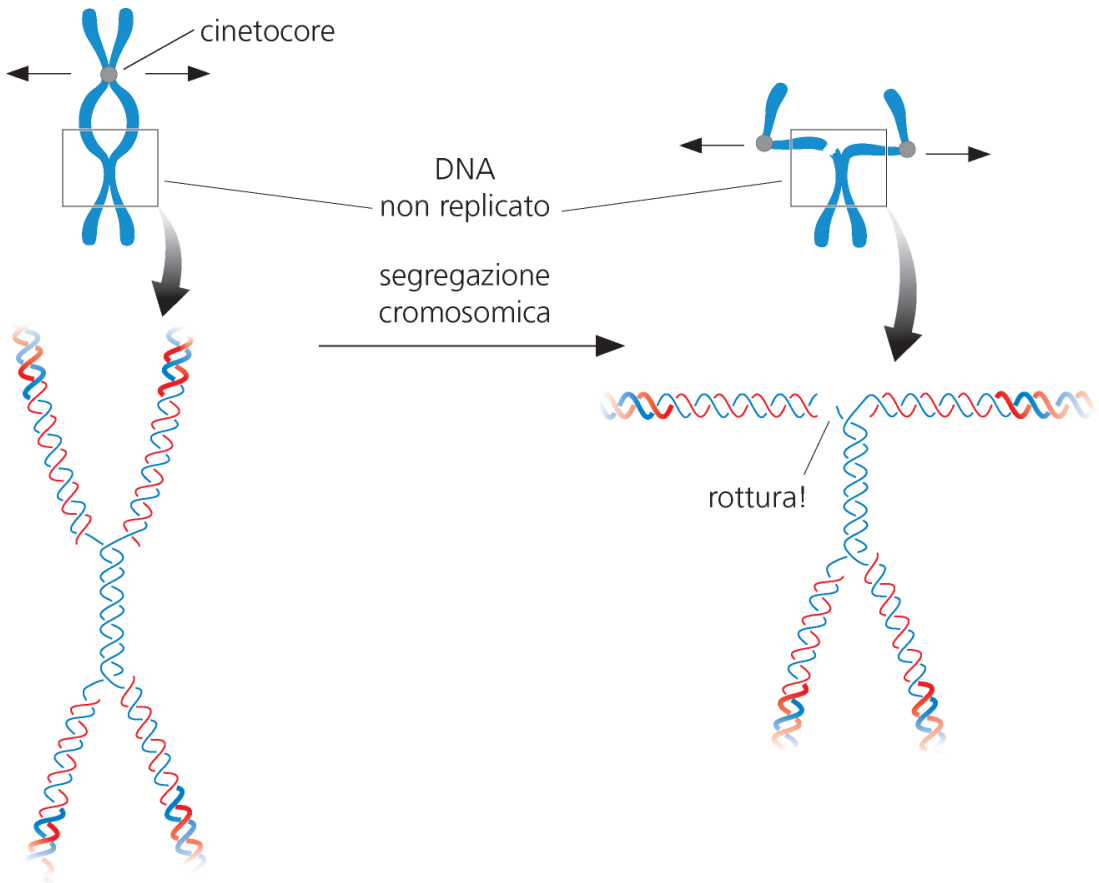
DNA elicasi (6 subunita) inattiva
legato al caricatore della
DNA elicasi (DnaC)
Charicamento elicasi, dissoziazzione
carcatore

Elicasi attiva, apre dsDNA, recluta
Primasi ed elimina DnaA

Primasi produce innesco
→ Reclutamento slide
clamp loader +
polymerasi + tau



I cromosomi eucariotici vengono replicati una sola volta ogni ciclo cellulare

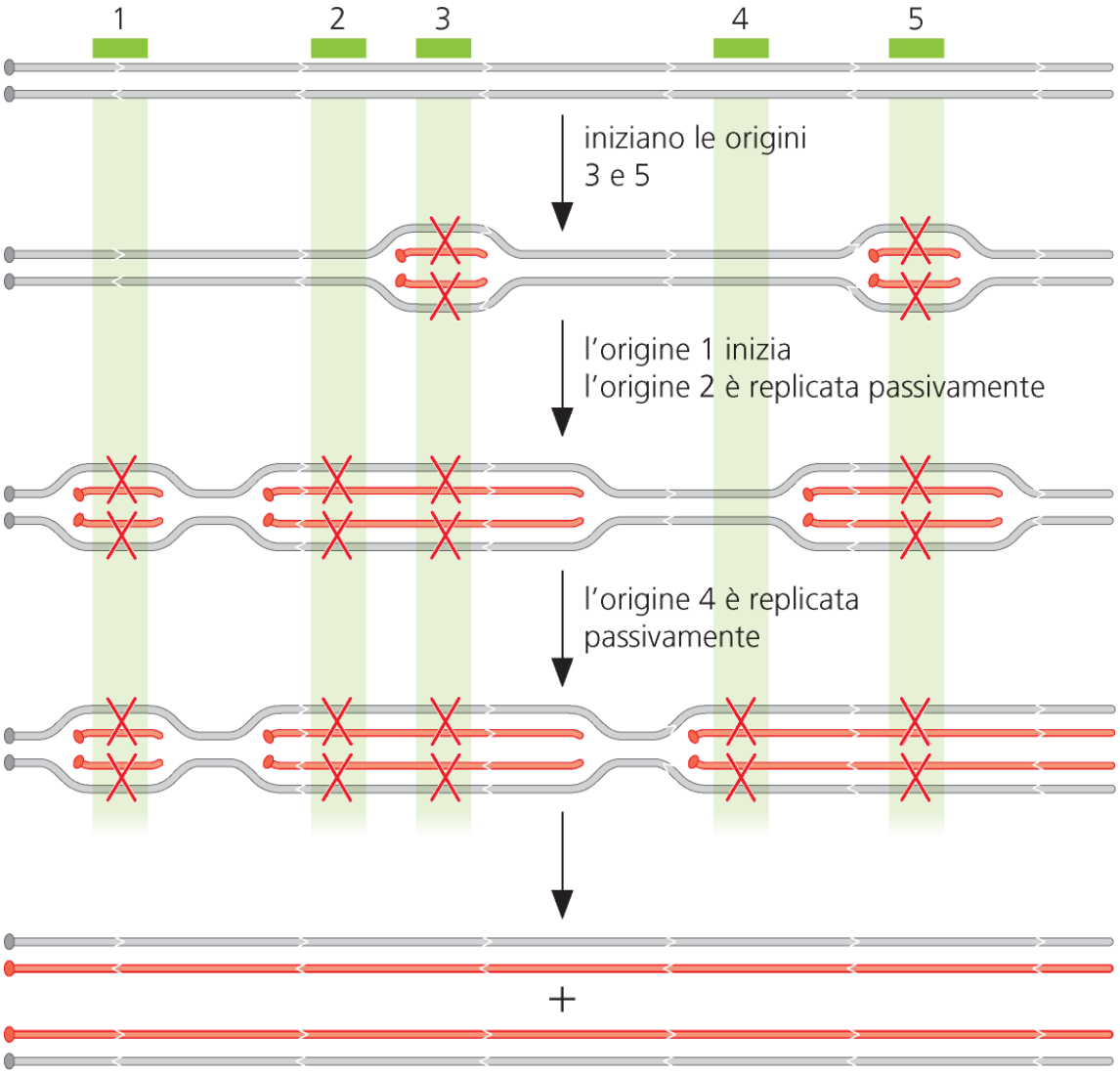


EUCARIOTI

Rottura indotta da una replicazione incompleta.

→ All genomic DNA has to be replicated only 1x
→ Is it possible to induce replication more than one from the same ORI??

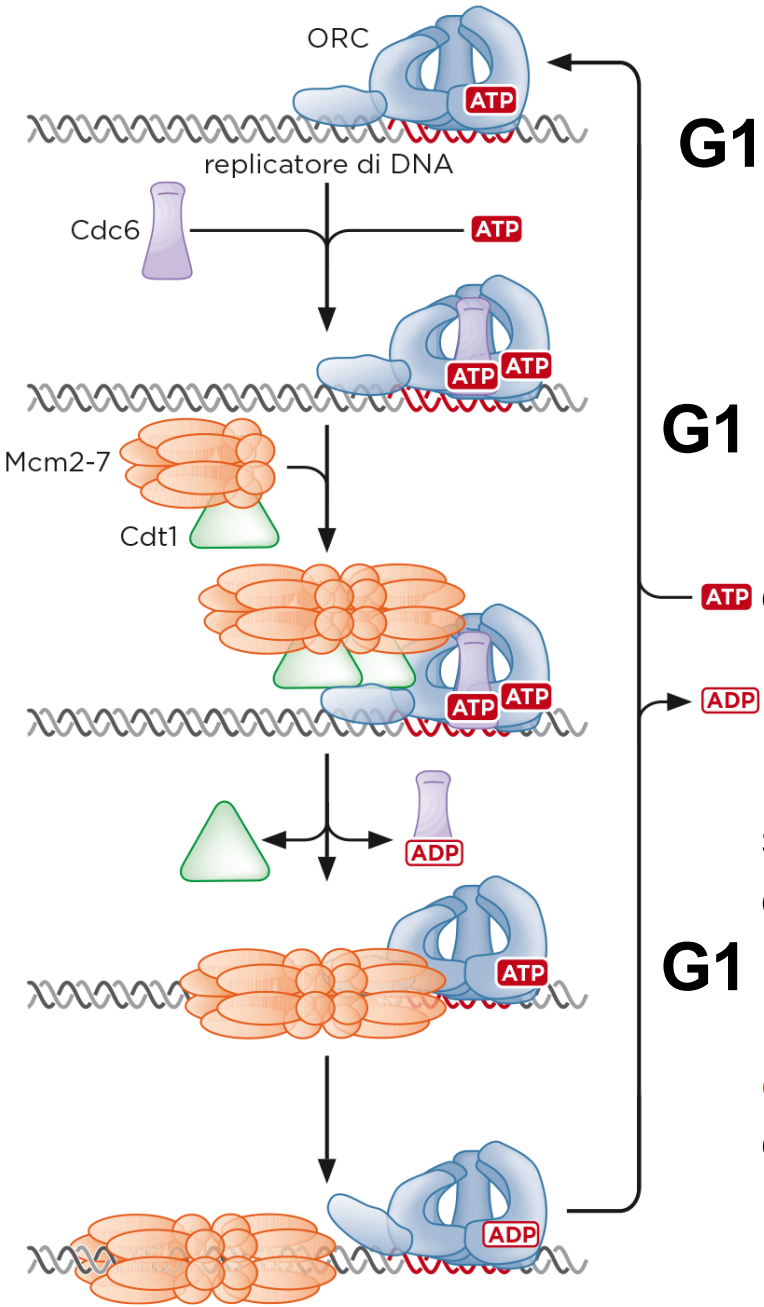
I replicatori vengono inattivati dalla replicazione del DNA



EUCARIOTI

Le origini sono separate da circa 30 kbp.
Un cromosoma quindi ne può avere diverse migliaia oris.
Non tutte vengono necessariamente utilizzate ad ogni ciclo
→ disattivazione delle origini adiacenti o ***replicazione passiva***.

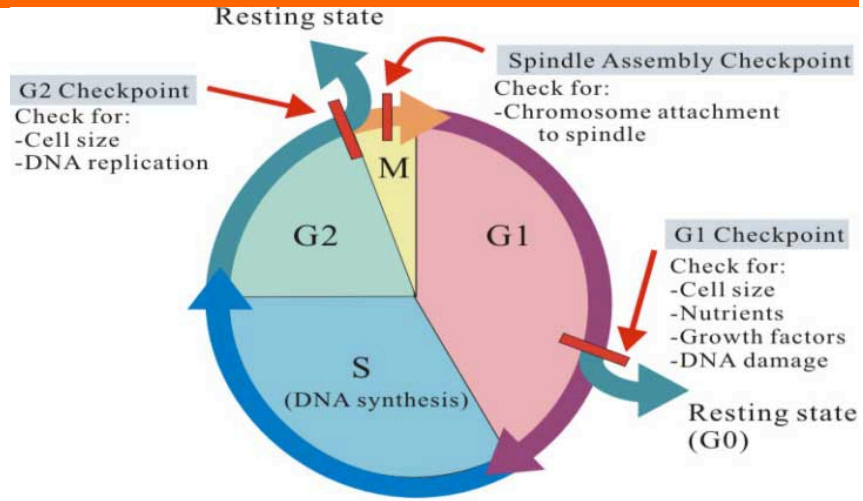
Il CARICAMENTO dell'elicasi è il primo passaggio nell'inizio della replicazione EUCARIOTICA



G1

G1

G1



L' inizio della replicazione richiede due momenti diversi: la selezione del replicatore (G1) e l' attivazione dell' origine (S).

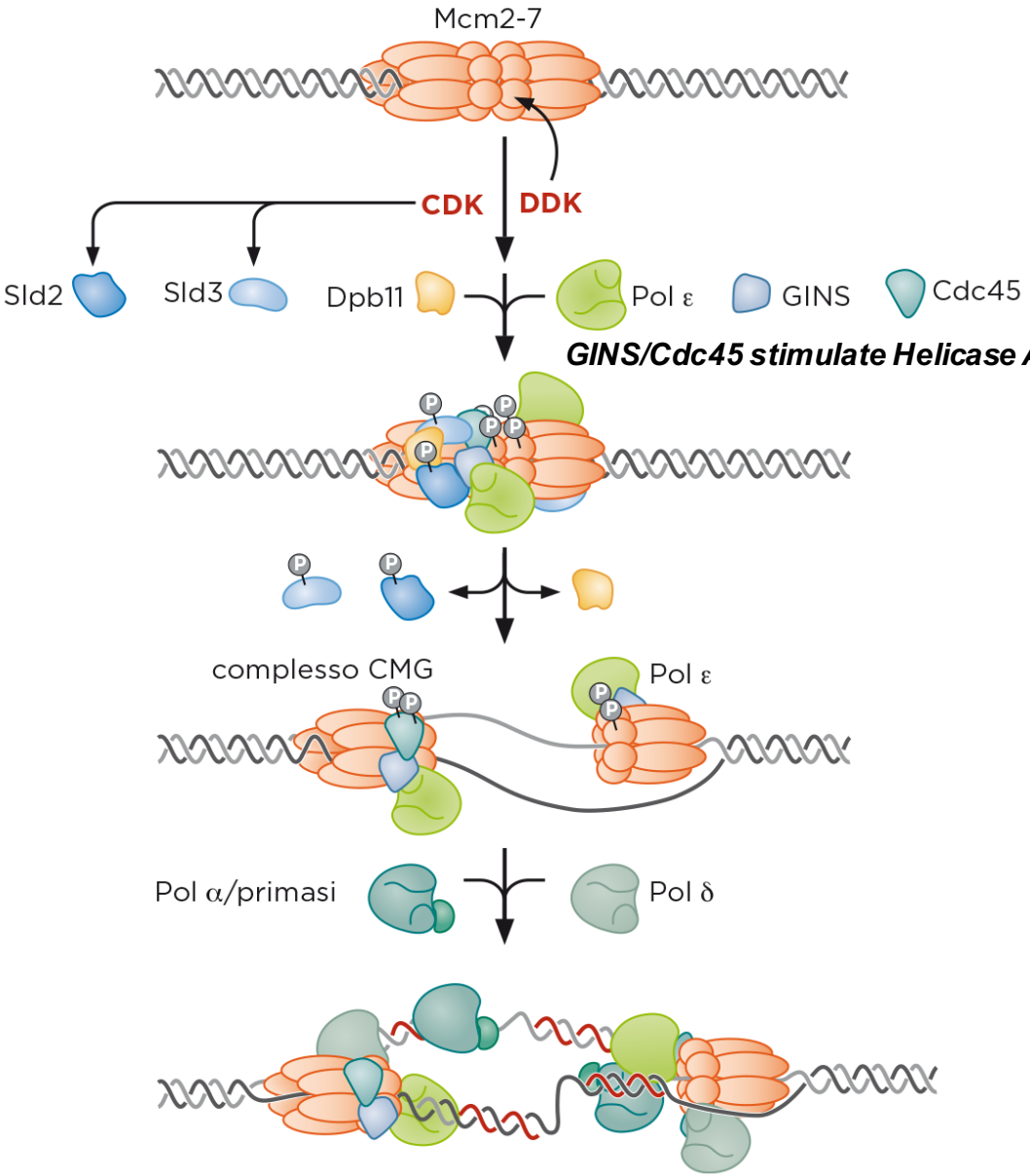
La selezione del replicatore individua le sequenze che dirigeranno la sintesi è mediata dalla formazione dei complessi pre-replicativi.

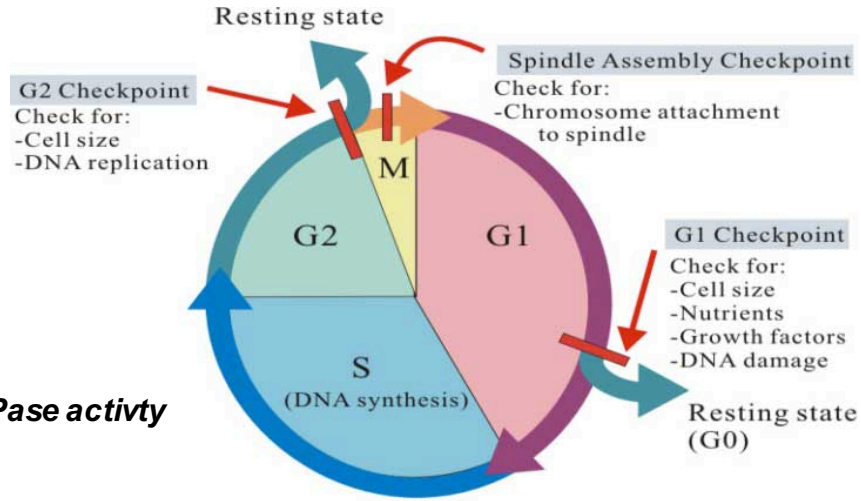
Una volta che ORC (**origin recognition complex**) è legato recluta due caricatori delle elicasi (Cdc6 e Cdt1).

Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2009

G1-S transition: Activation of DNA helicases (EUCARIOTI)

INIZIO S-PHASE





Cyclin dependent kinase (CDK) and Dbf4-dependent kinase (DDK) activate helicase upon entry in S-Phase

DDK phosphorylates Mcm2-7 (helicase)
→ Recruitment of GINS/Cdc45/Pol epsilon

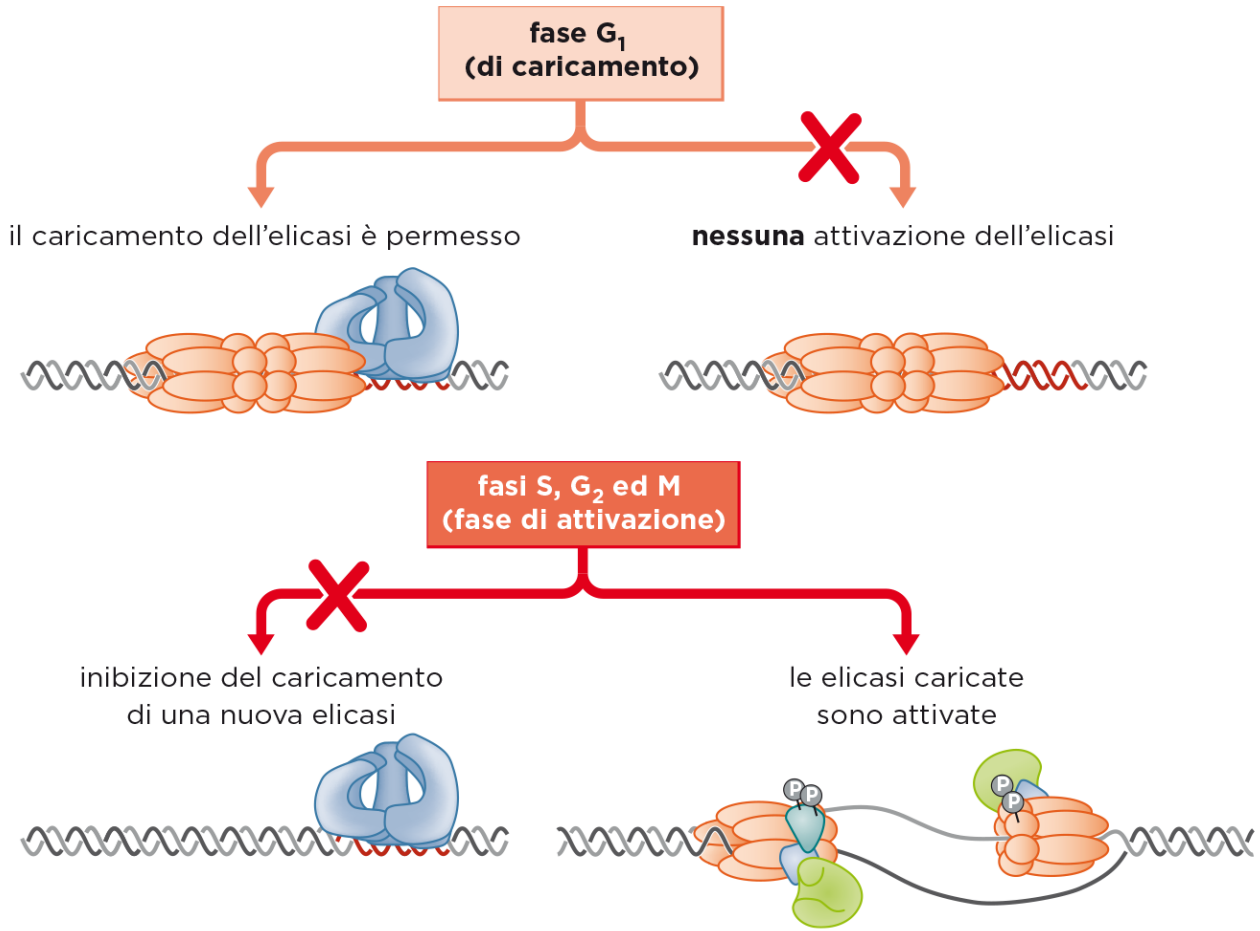
CDK phosphorylates Sld2/Sld3
→Help in the recruitment of GINS/Cdc45
→ELICASI CON ALTA PROCESSIVTA

Helicase unwinds DNA (2 helicase complexes oriented head to head are seperated)

Recruitment of primase + DNA Pol delta

Watson et al., BIOLOGIA MOLECOLARE DEL GENE, 6/E, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2009

La formazione e attivazione delle elicasi sono regolate in modo da permettere un solo ciclo di replicazione durante ciascun ciclo cellulare



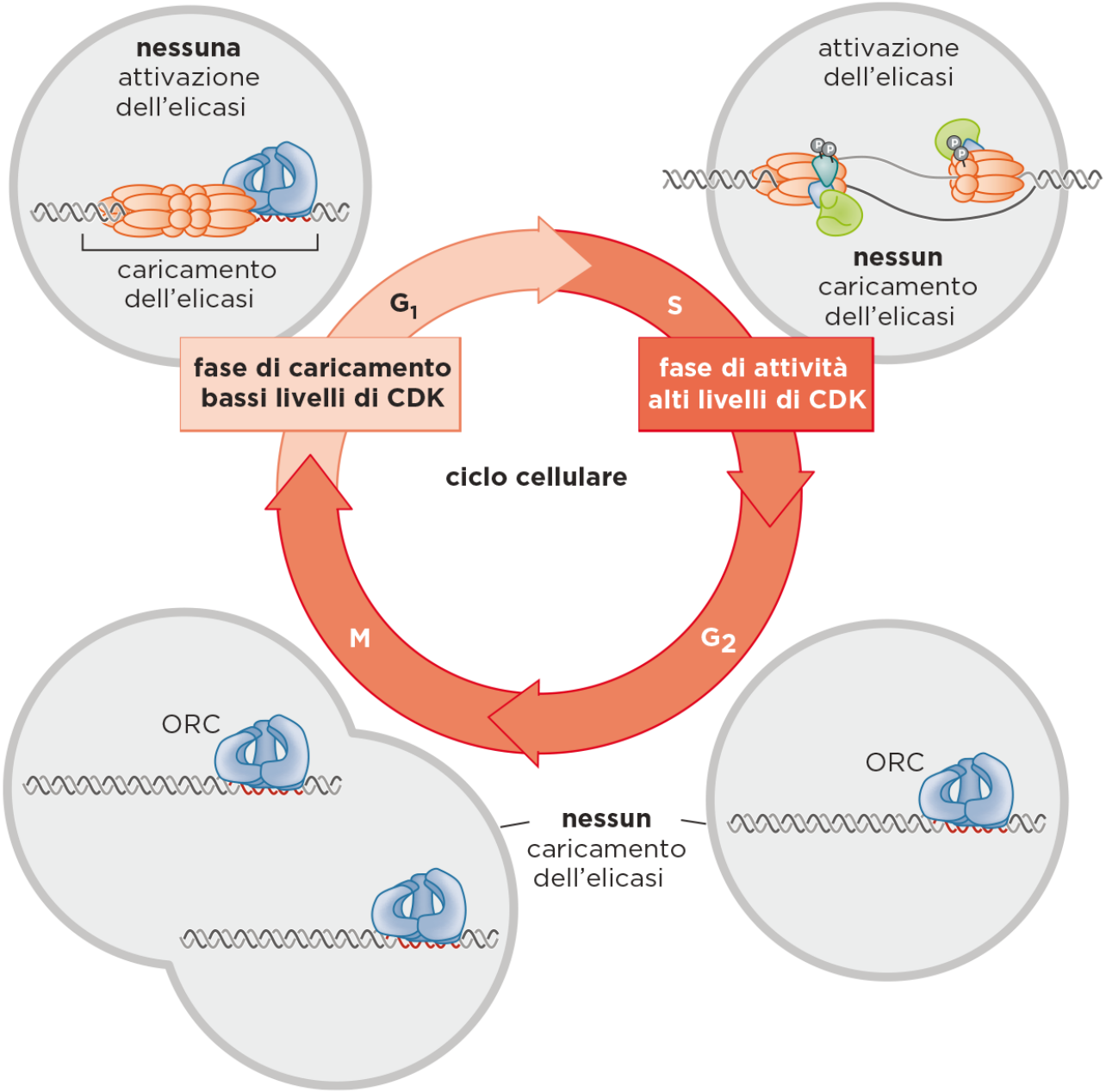
Rigida regolazione della formazione e attivazione del replisome da parte delle kinasi ciclina dipendenti (CDK/DDK)).

In G1 Phase: Loading of helicase is possible. Activation Impossible

In S, G2, M: Loading of helicase is impossible Activation possible
NOTE: **helicase (Mcm2-7) is only present in S-Phase**!!!

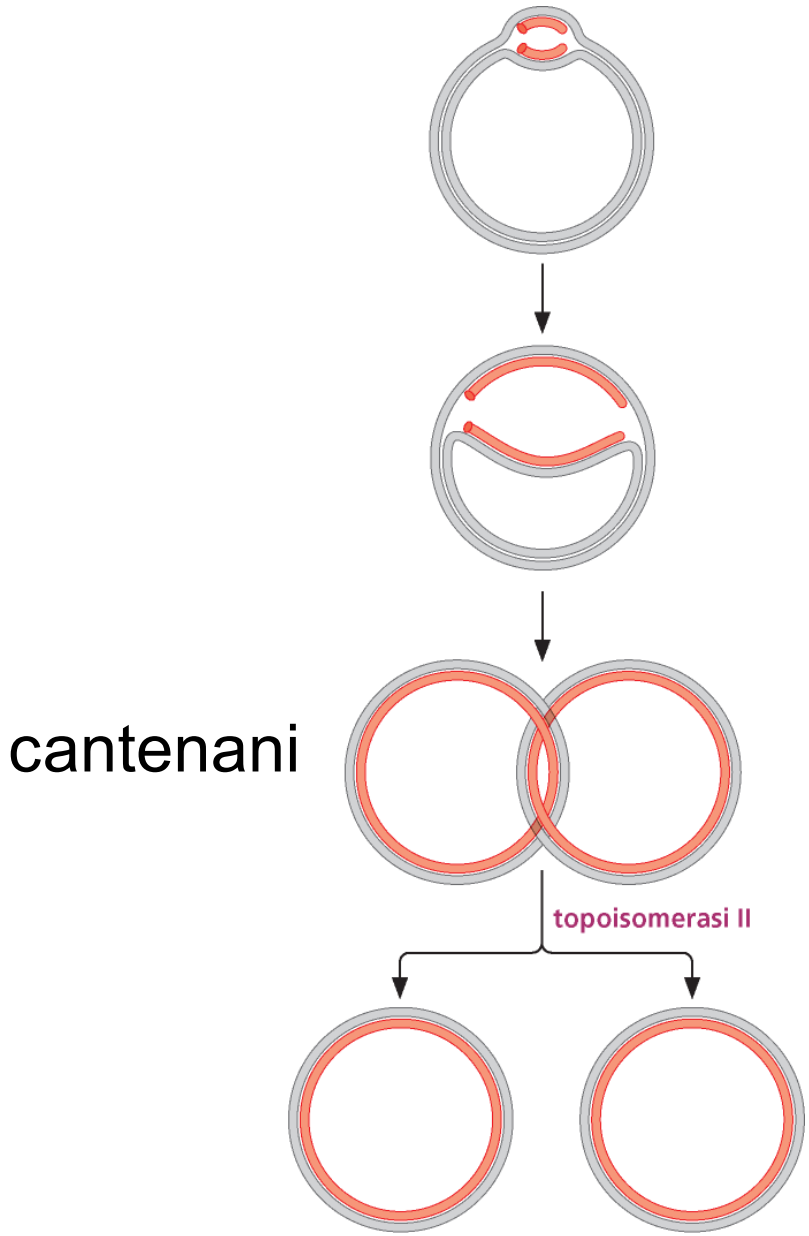
Watson et al., BIOLOGIA MOLECOLARE DEL GENE, 6/E, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2009

CDK activity regulates the activation of helicases during DNA replication



Watson et al., BIOLC

La terminazione della replicazione: circular genomes → Bacteria



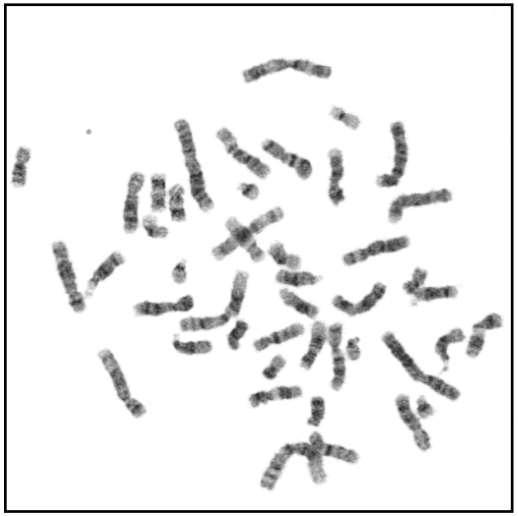
Le topoisomerasi sono necessarie per separare le molecole di DNA figlie.

Sia per molecole di DNA circolarmente chiuse che quelle dei cromosomi lineari (molto lunghi).

THE END REPLICATION PROBLEM AT LINEAR CHROMOSOMES

Bacteria

Human



0.5×10^6 to 5.8×10^6 bp

1 molecule

circular

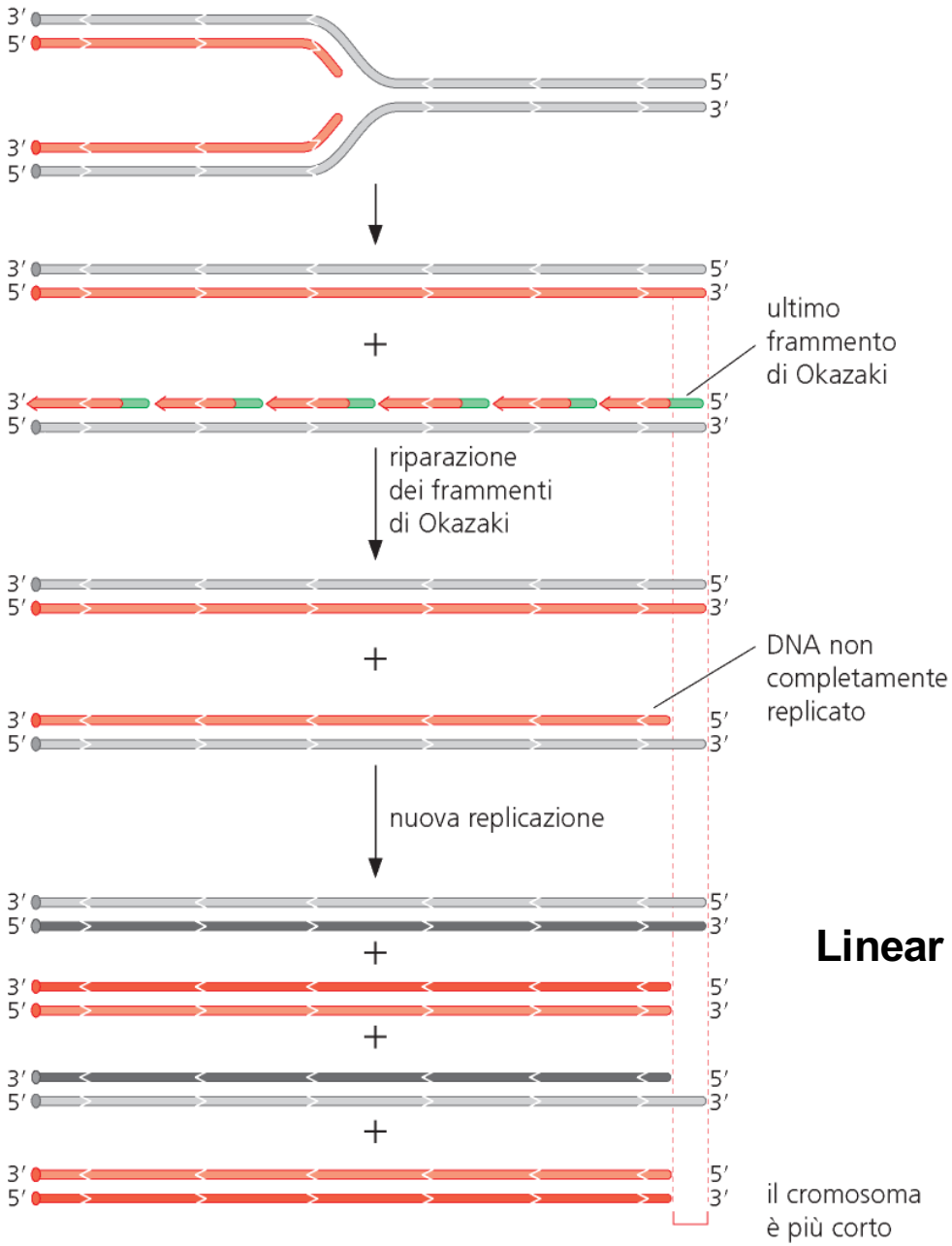
3×10^9 bp

fragmented

linear

How are ends of eukaryotic chomosomes protected to avoid end to end fusions?

The end replication problem: il problema della replicazione della estremità



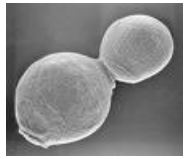
La necessità di avere un innesco crea il problema della replicazione delle estremità terminali.

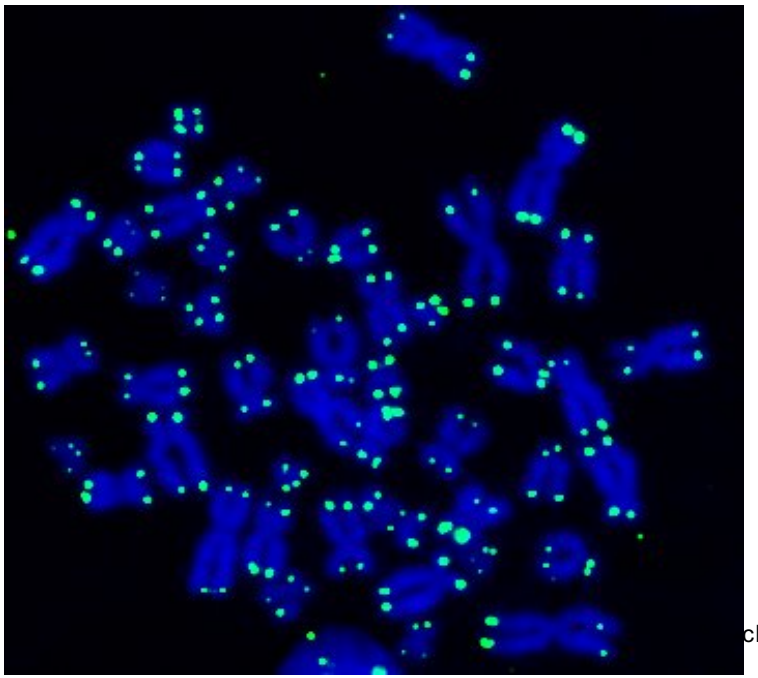
Lentamente dopo alcune generazioni verrebbe perso del DNA.

Linear DNA molecules shorten with every cell division

S.p.A. Copyright © 2009

Chromsosome ends consist of TG-rich tandem repeats

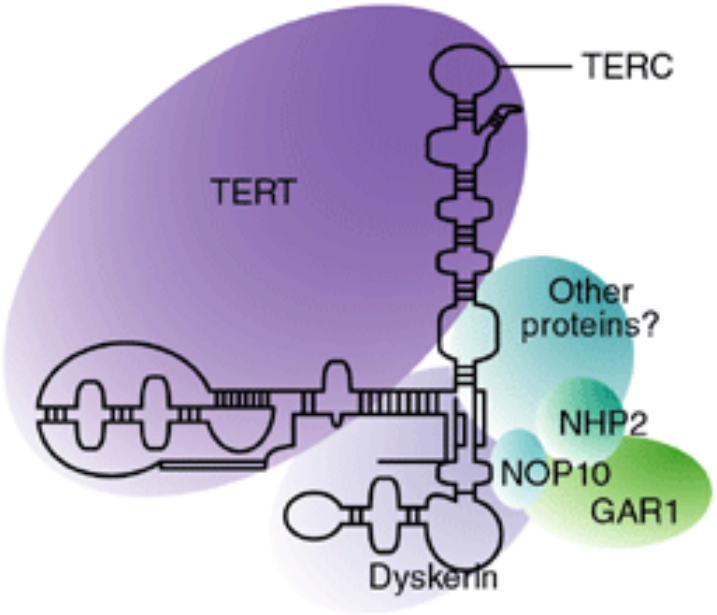
			sequence	***length***
Vertebrates			***TTAGGG***	human 10 kb mouse 40 kb
Plants			*TTTAGGG*	2 – 9 kb
S. cerevisiae			$G_{(2-3)}(TG)_{(1-6)}T$	325-400 bp



TELOMERE DNA FISH
Shows telomeres at human chromosome ends

chelli editore S.p.A. Copyright © 2009

Telomeres are maintained by the reverse transcriptase complex "telomerase"



TERT: protein component

TERC: non-coding RNA component

core components

<u>Dyskerin</u>, NOP10, NHP2, GAR1

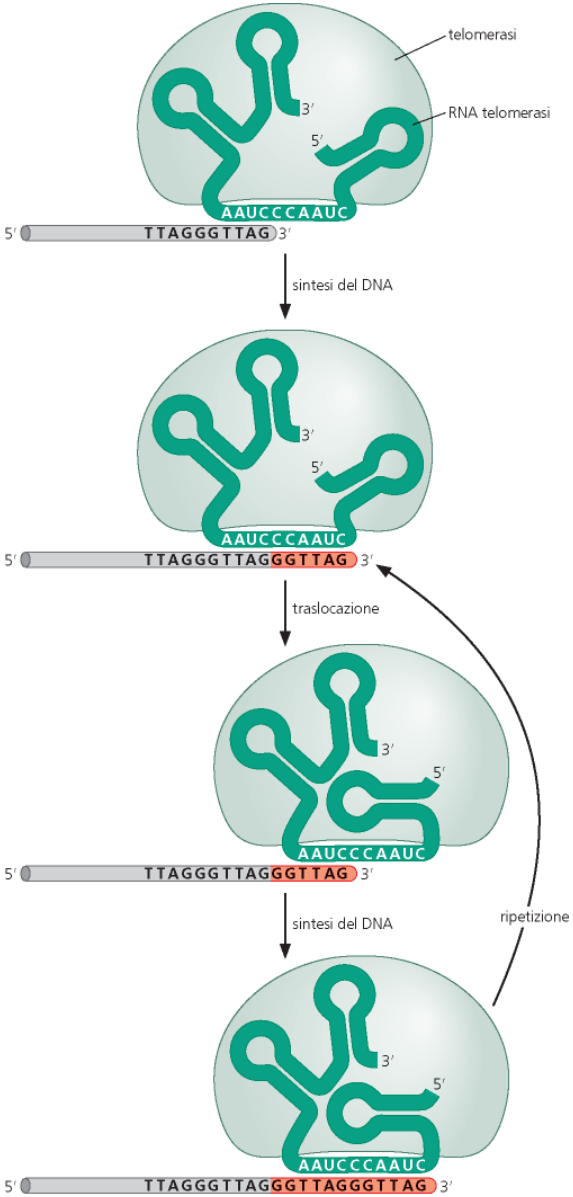
improve activity

Telomerase resolves the end-replication Problem

Elisabeth Blackburn
Carol Greider
Jack Szostak
Nobel Price 2009

IN EMBRYONIC CELLS
IN ADULT STEM CELLS
IN CANCER CELLS

La *telomerasi* è una DNA pol che non richiede stampo esogeno



La TELOMERASI è una DNA polimerasi (RNA-dipendente) (o trascrittasi inversa, o retrotrascrittasi)

Si tratta dunque di un enzima in grado di sintetizzare DNA come le consuete DNA polimerasi. Tuttavia, a differenza di queste ultime, è in grado di utilizzare l'RNA come stampo di partenza.

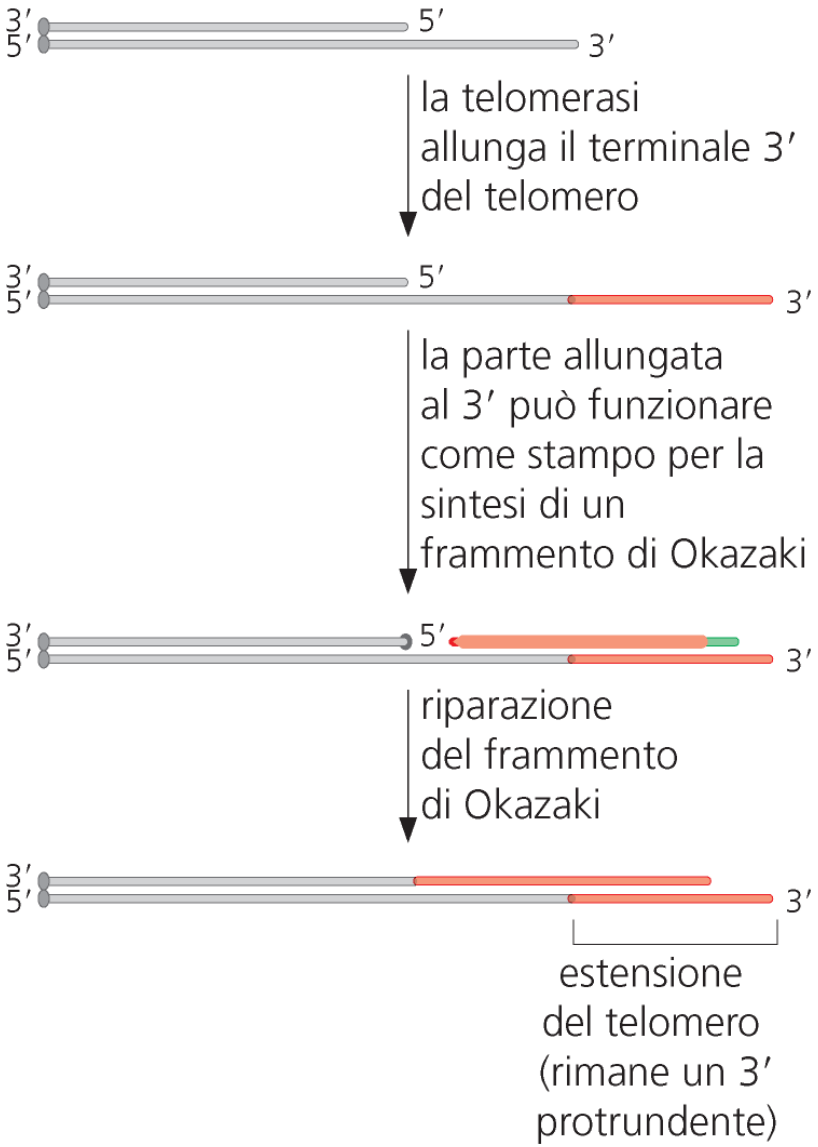
Le estremità terminali dgli eucarioti (telomeri) sono ricche di TG.

Questa sequenza recluta una DNA pol specifica (telomerasi).

La telomerasi è costituita da diverse subunità proteiche ed RNA che funziona come stampo per la sintesi di DNA.

Una subunità della telomerasi (TERT) utilizza come stampo l'RNA, è una trascrittasi inversa.

La telomerasi risolve il problema delle replicazioni allungando il 3' del cromosoma

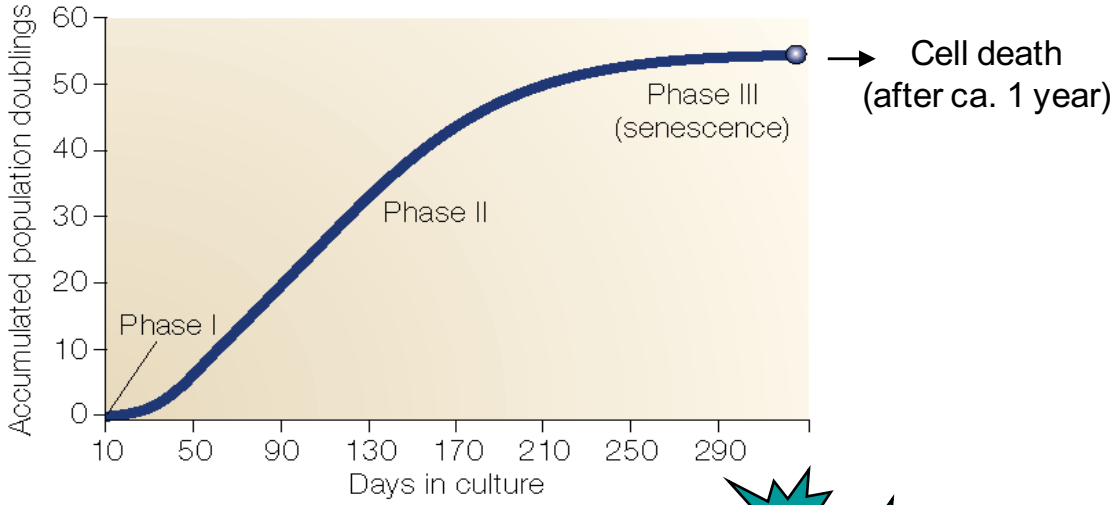


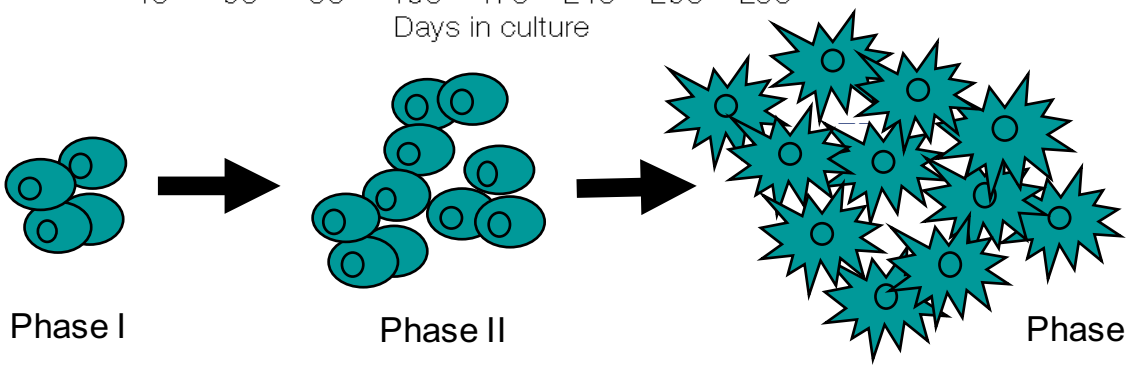
IN EMBRYONIC CELLS
IN ADULT STEM CELLS
IN CANCER CELLS

Leonard Hayflick, 1960`s

The "Hayflick limit", the "end replication problem" and telomeres

"…normal "primary" human cells have a limited potential of cell proliferation (ca. 50 divisions)





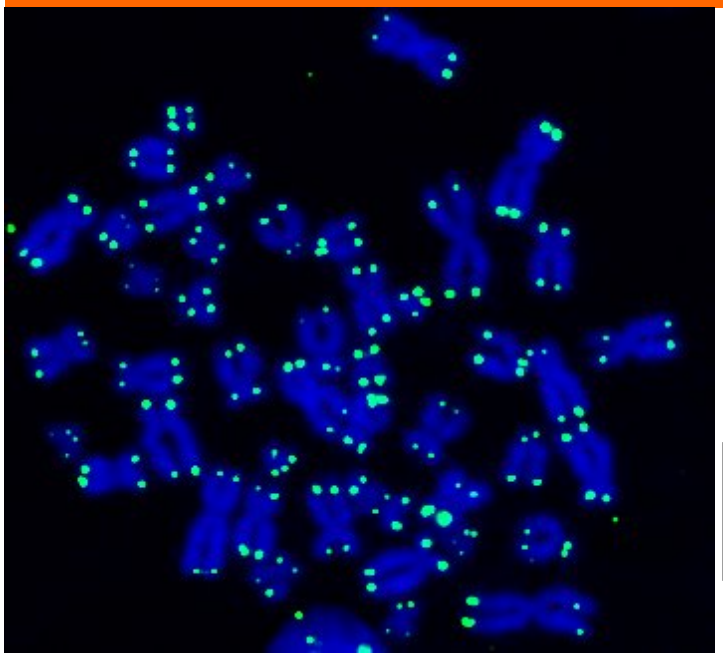
Phase I — primary culture

Phase II — exponential growth

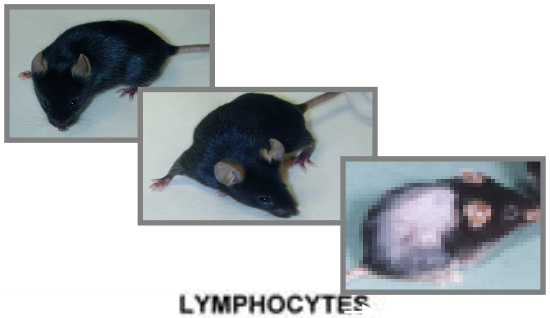
Phase III — Metablism "on", replication "off" SENESCENCE

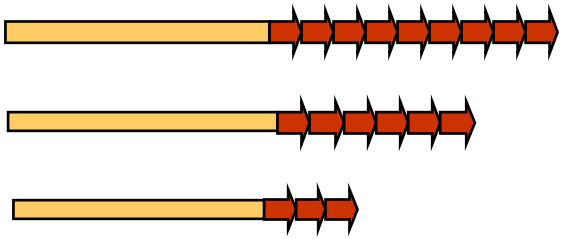
Existence of a countig mechanism that tracks the number of cell divisions
→ ORGANISMAL AGING

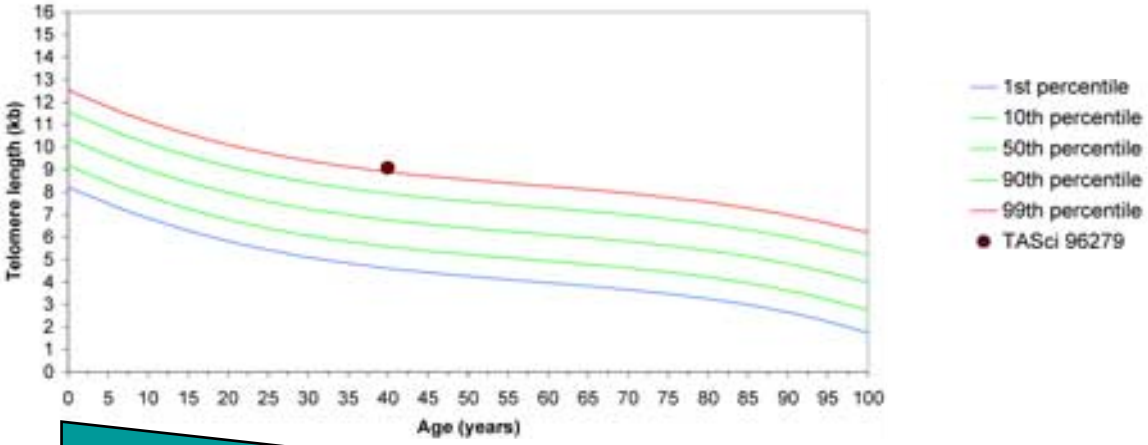
Telomeres shorten due to the end replication problem: Result: organismal aging



Telomeres:
TTAGGG repeats at chromosome ends (human 10-40kb)
Recruit proteins that protect chromosome ends
When lost → no protection → DNA damage → cells stop to proliferate→→ **AGING**
Important in stem cells!!!







telomere length