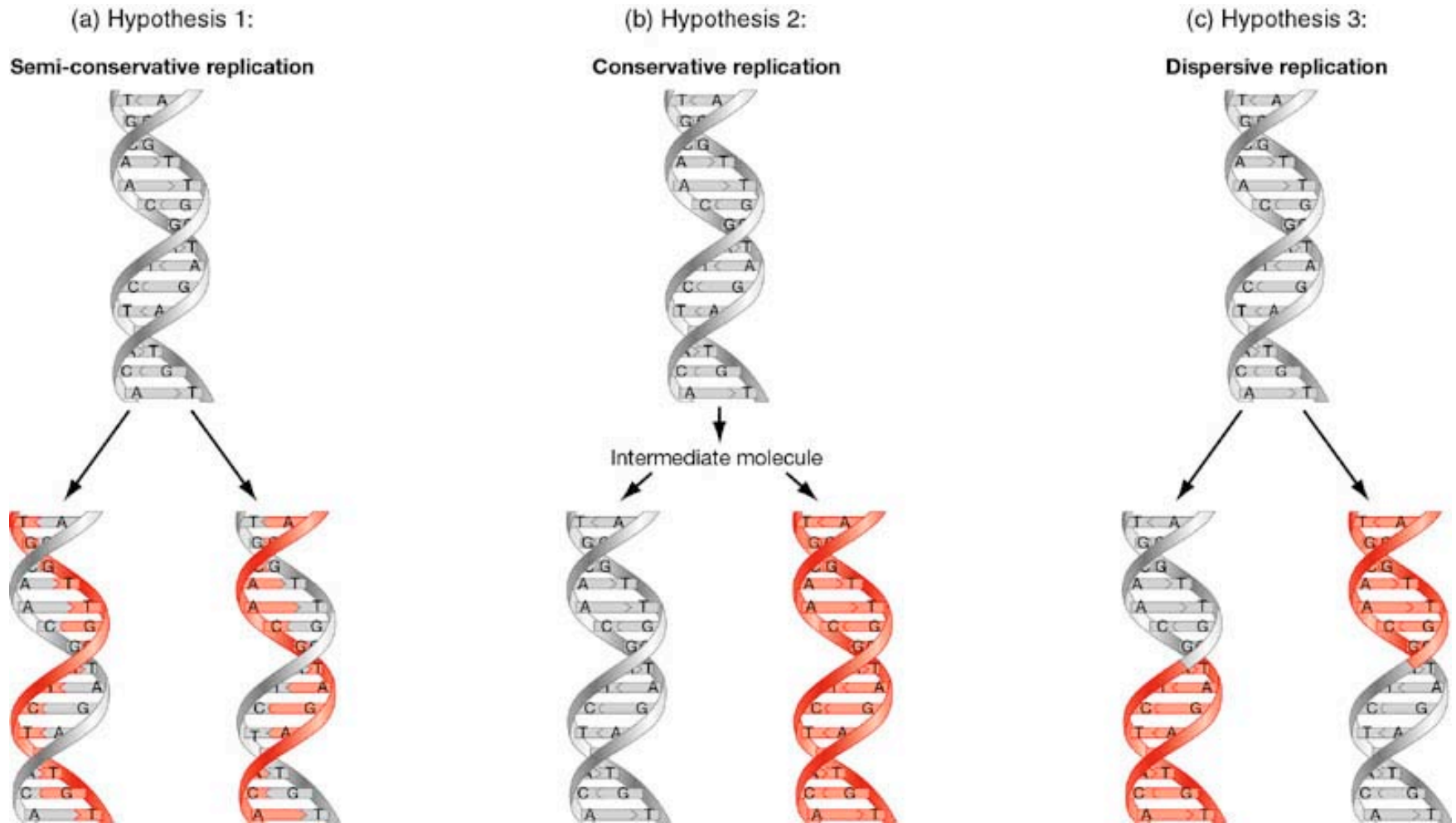


LA REPLICAZIONE DEL DNA

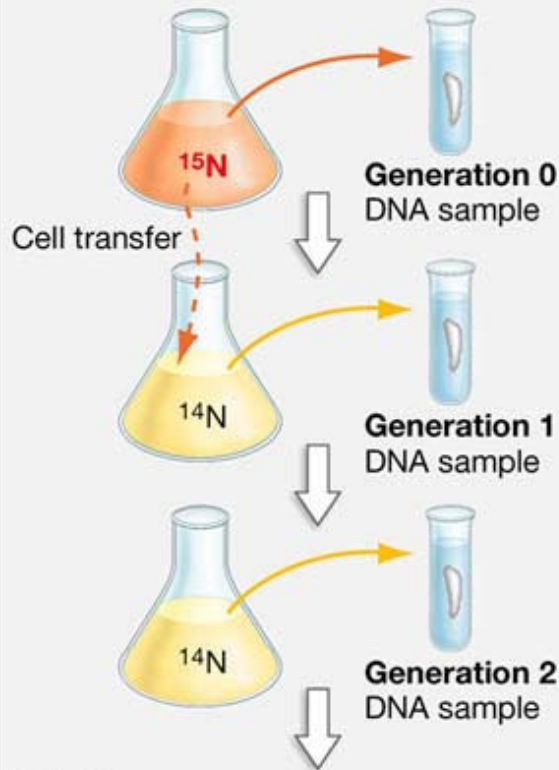
<https://dnalc.cshl.edu/resources/animations/>

Tre ipotesi sull'esito del processo replicativo del DNA



(a) MESELSON-STAHN EXPERIMENT

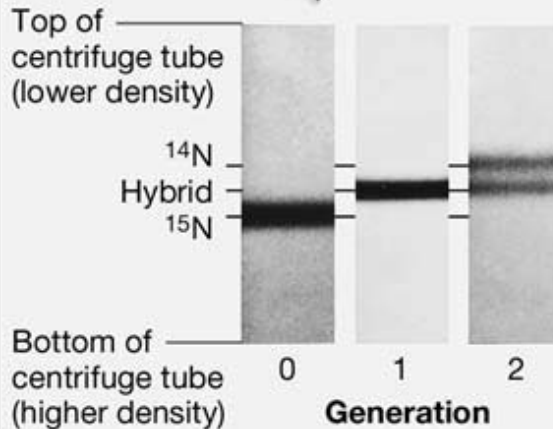
Question: Is replication conservative or semi-conservative?



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.



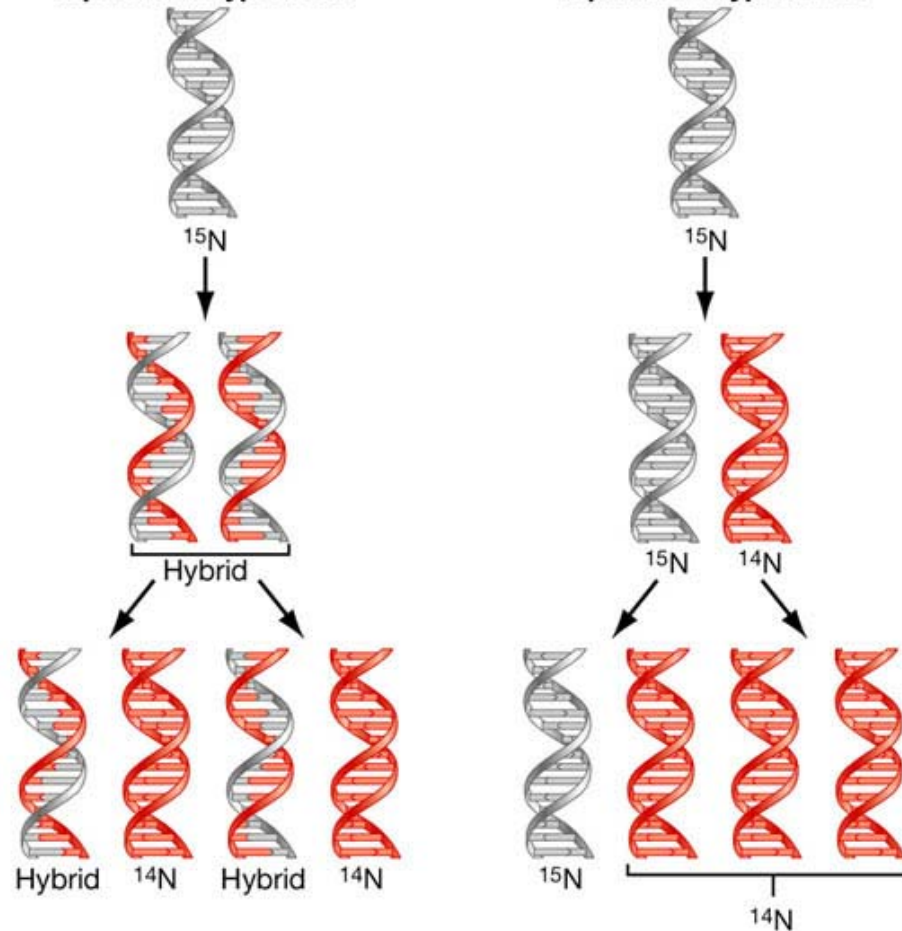
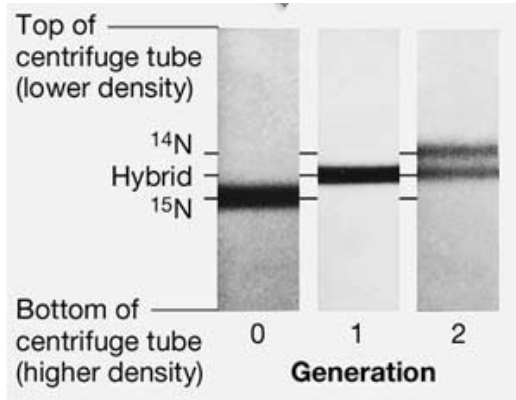
4. Centrifuge the three samples and compare the location of the bands. DNA containing ^{15}N is heavier than DNA containing ^{14}N and forms a band lower in the tube.

Conclusion? →

(b) Predictions

Semi-conservative replication hypothesis

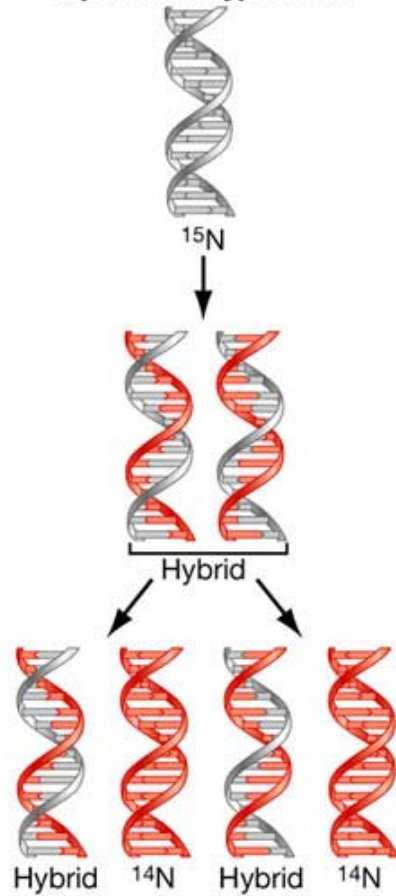
Conservative replication hypothesis



Quale delle 2 ipotesi è in accordo con i dati sperimentali?

(b) Predictions

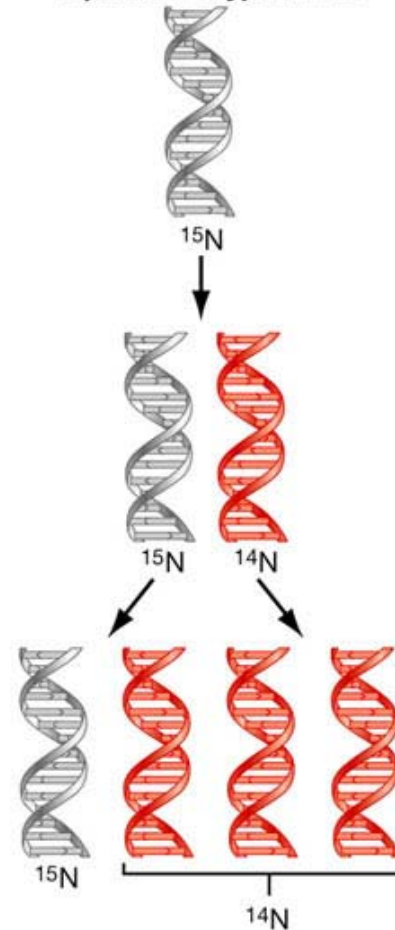
Semi-conservative replication hypothesis



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

✓ Hypothesis supported

Conservative replication hypothesis

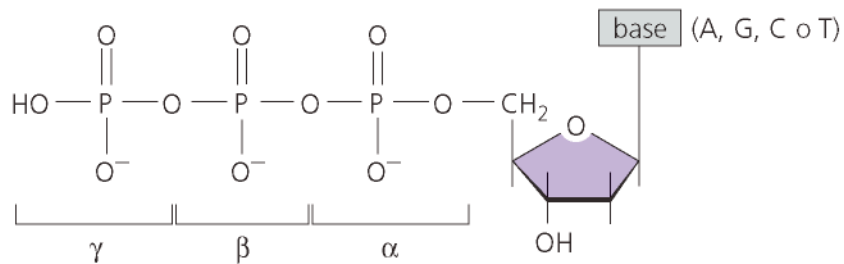


After 2 generations:
1/4 high density DNA
3/4 low density DNA

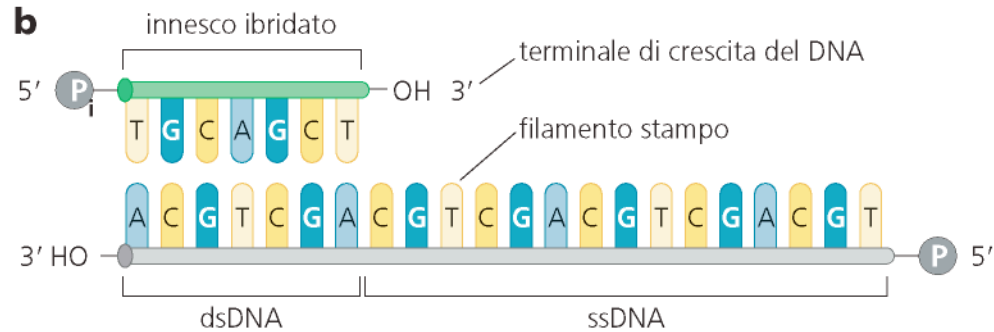
✗ Hypothesis rejected

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

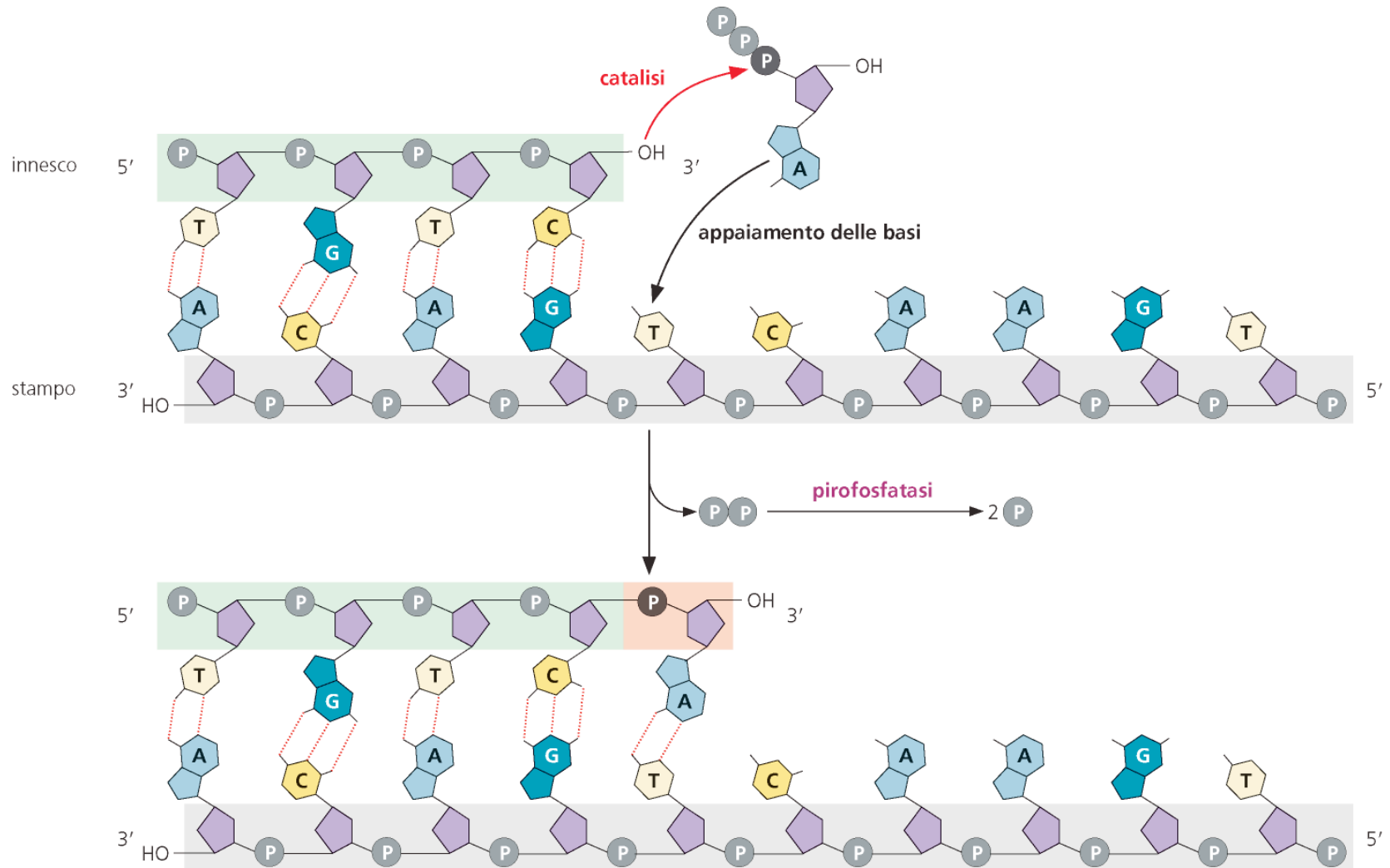
a



b

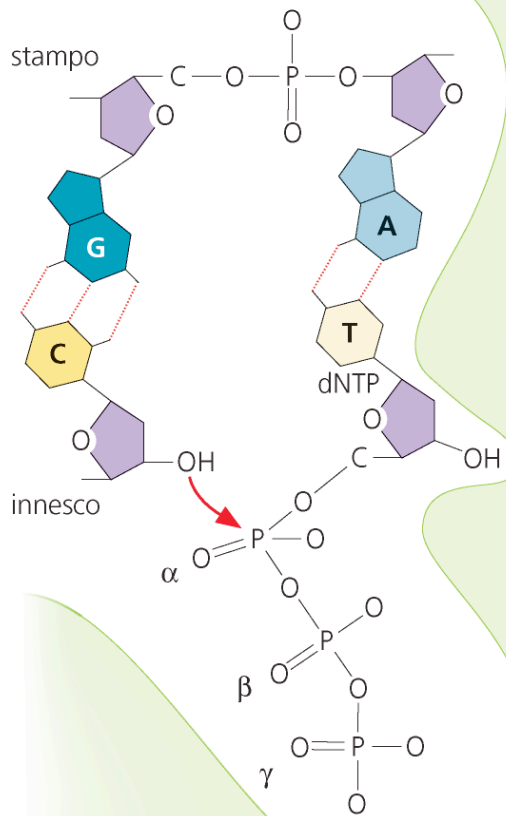


Il DNA è sintetizzato allungando il terminale 3' dell' innesco

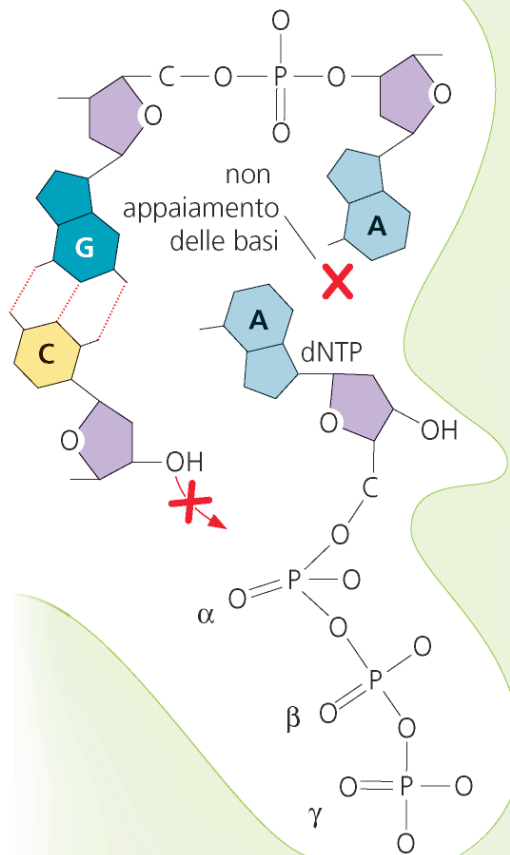


La DNA pol utilizza un singolo sito attivo per catalizzare la sintesi di DNA

a appaiamento corretto

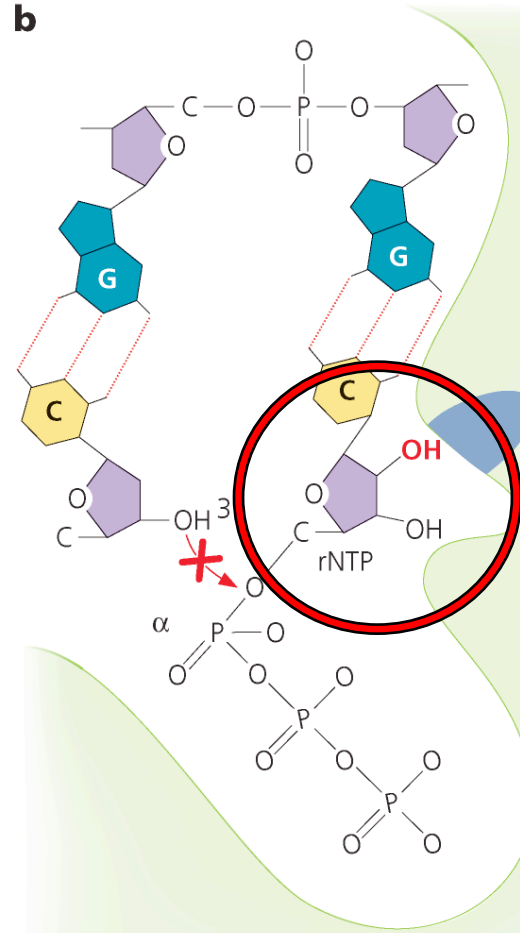
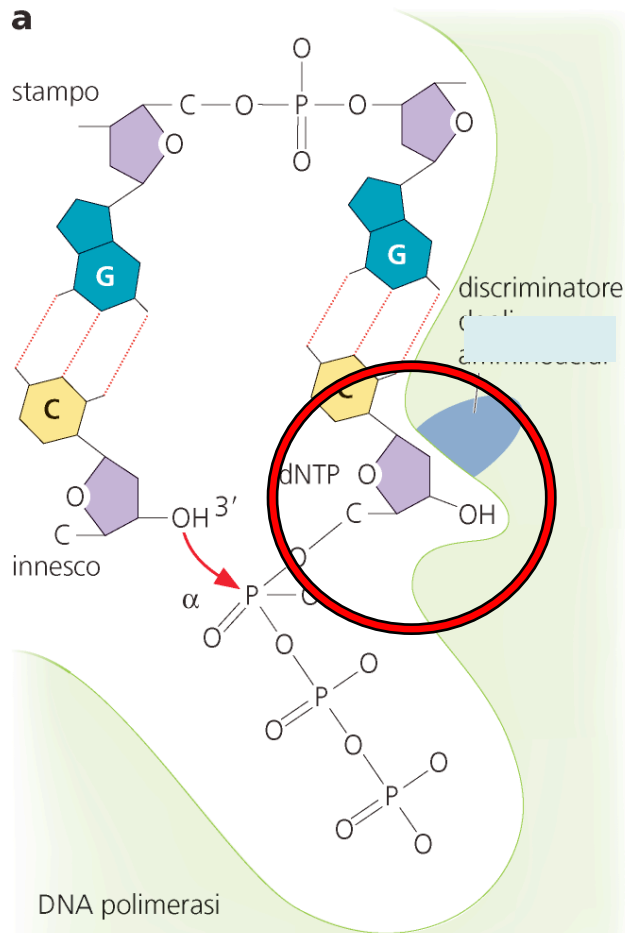


b appaiamento scorretto



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 non se entra il nucleotide corretto. La velocità di formazione aumenta di molto (10.000x) quando il nucleotide è corretto.

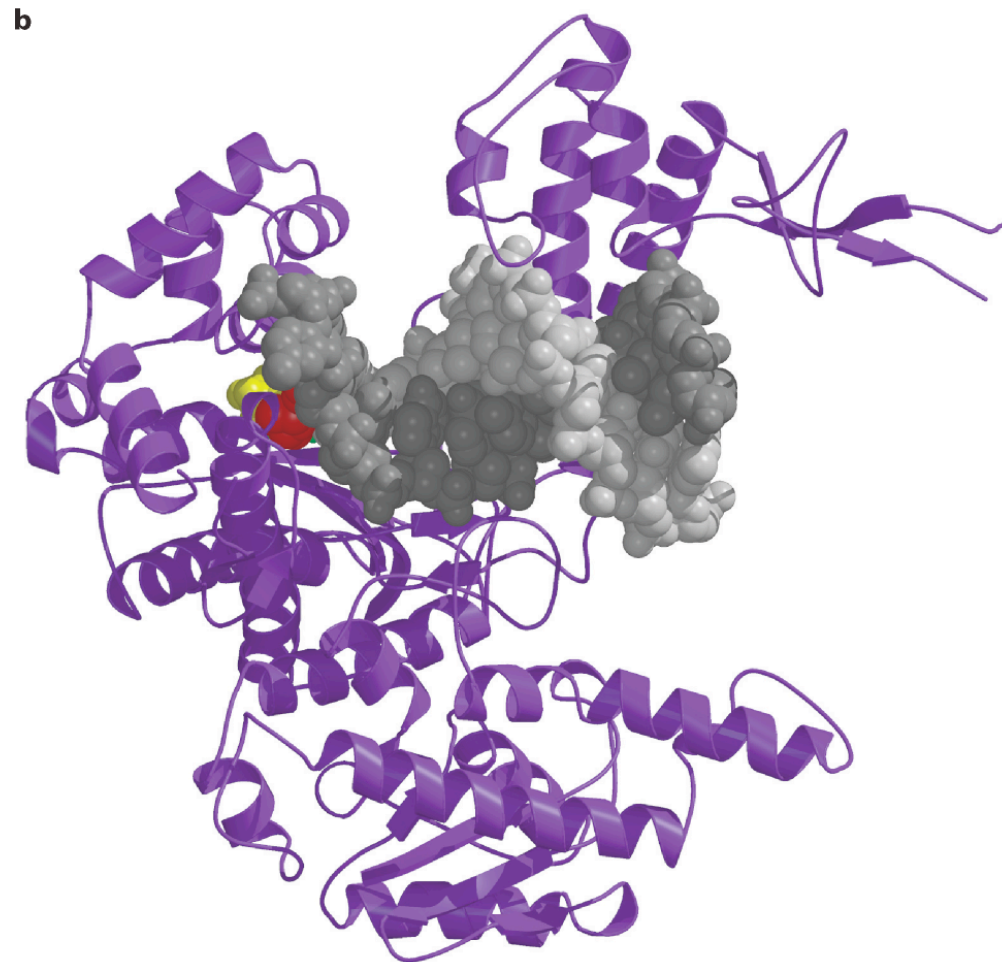
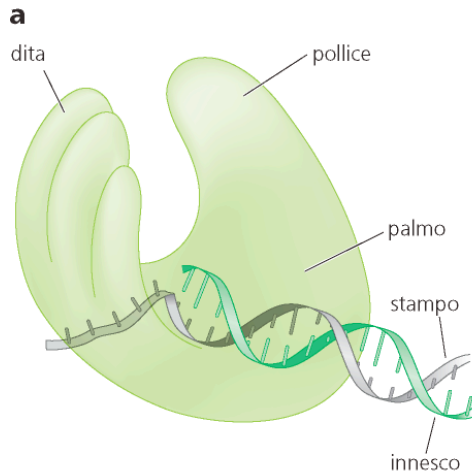
La DNA pol discrimina fra rNTP e dNTP



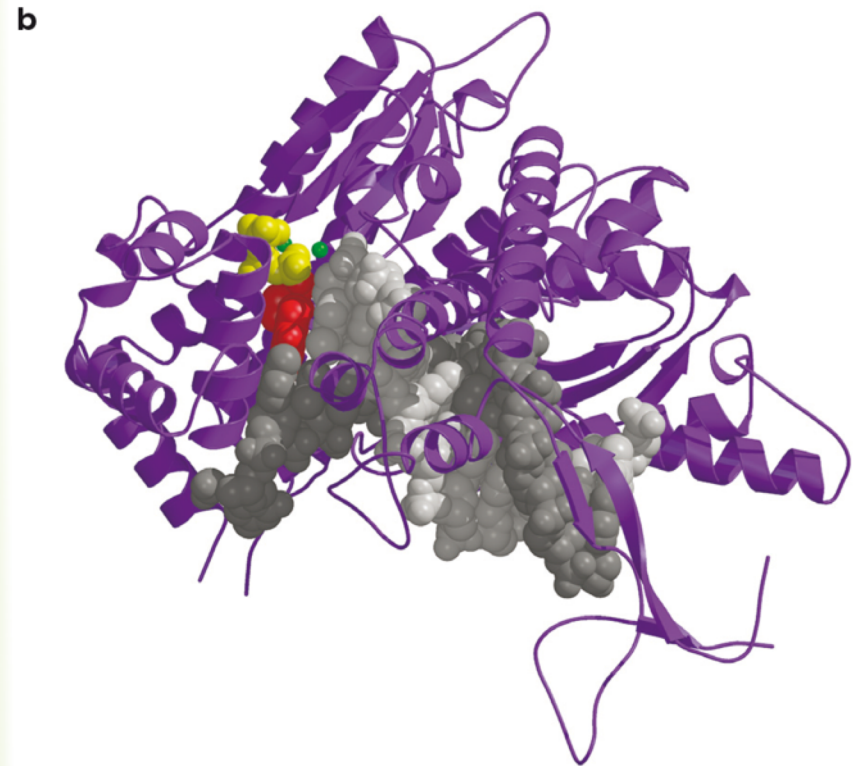
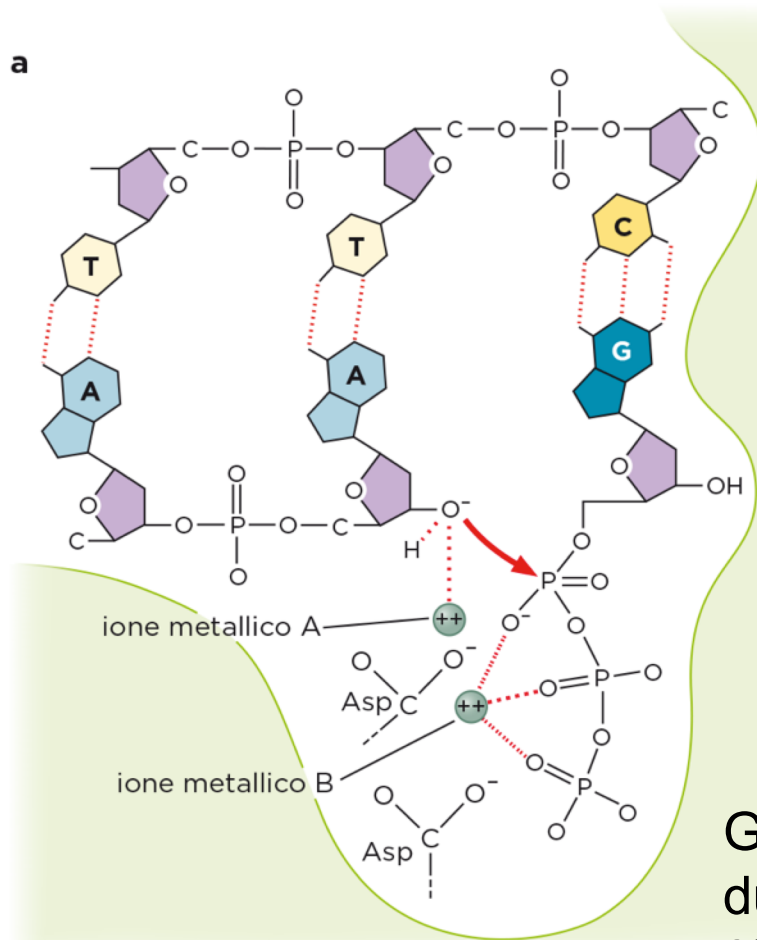
La presenza del 2' -OH determina un **impedimento sterico**.

I ribonucleotidi, anche se sono presenti nella cellula ad una concentrazione molto più elevata dei desossiribonucleotidi, vengono incorporati con una frequenza molto bassa 1/1000.

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

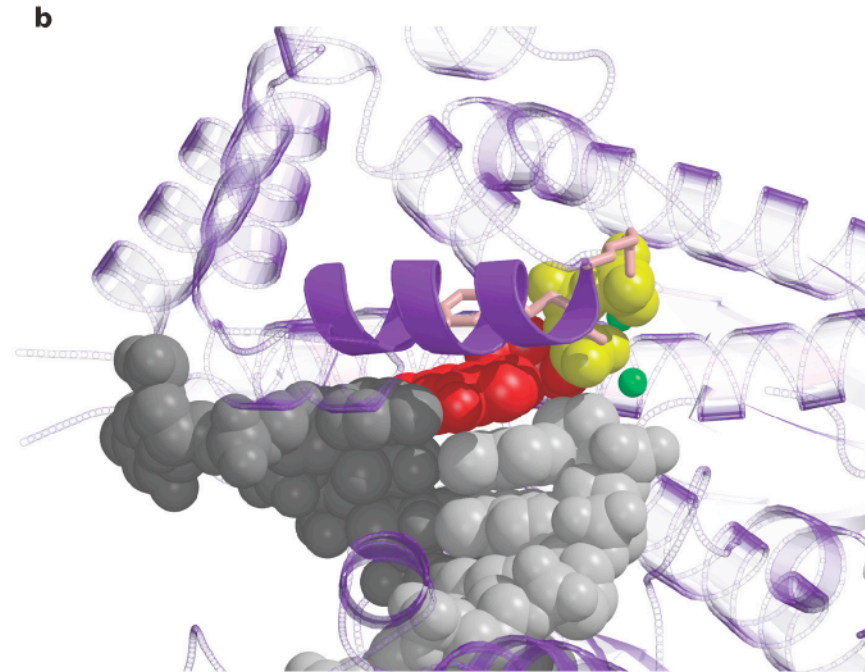
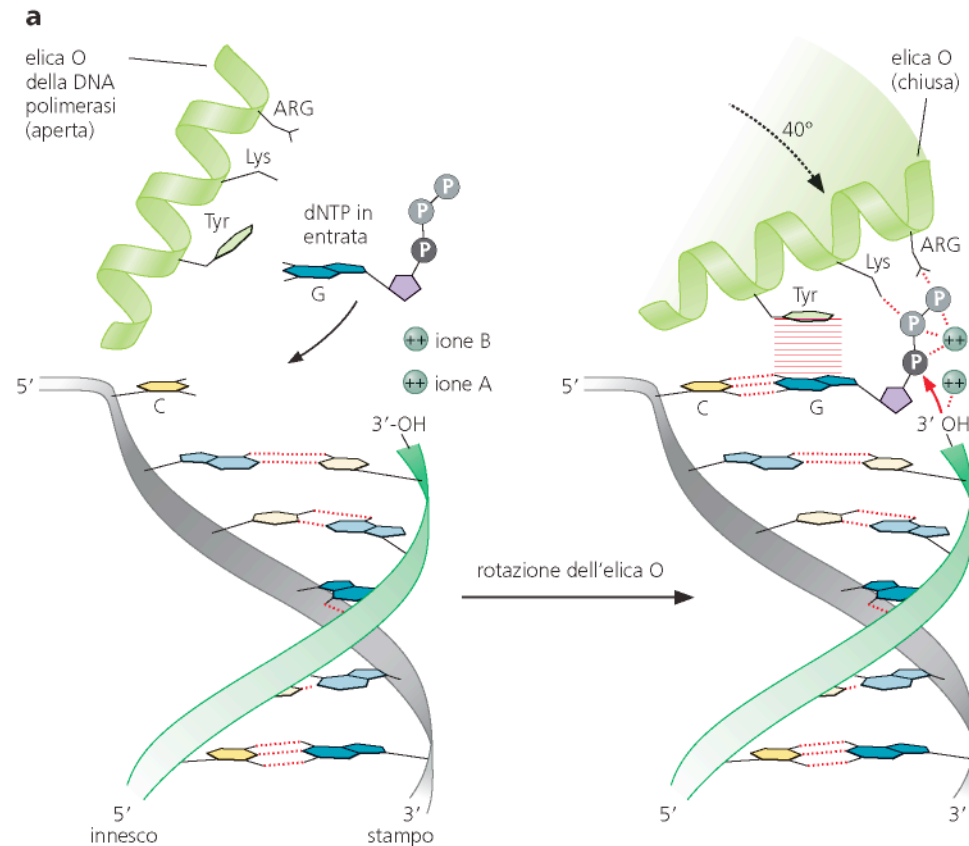


Durante la polimerizzazione 2 ioni metallici bivalenti riducono l'affinità del 3'-OH per il suo idrogeno



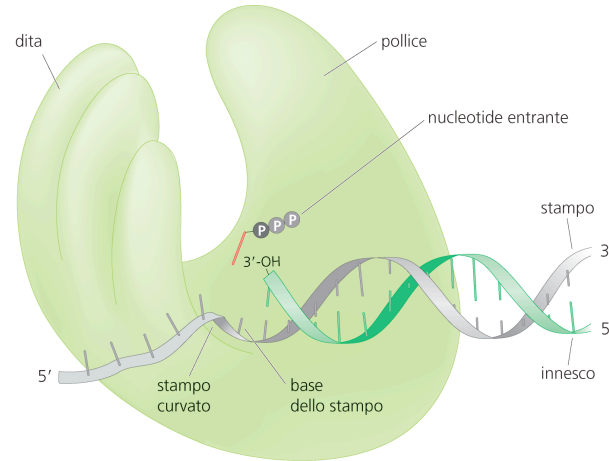
Gli ioni metallici sono tenuti in posizione da due residui acidi. Lo ione A interagisce con 3'OH mentre il B con i trifosfati del nucleotide entrante. Attacco nucleofilo sul **P**.

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



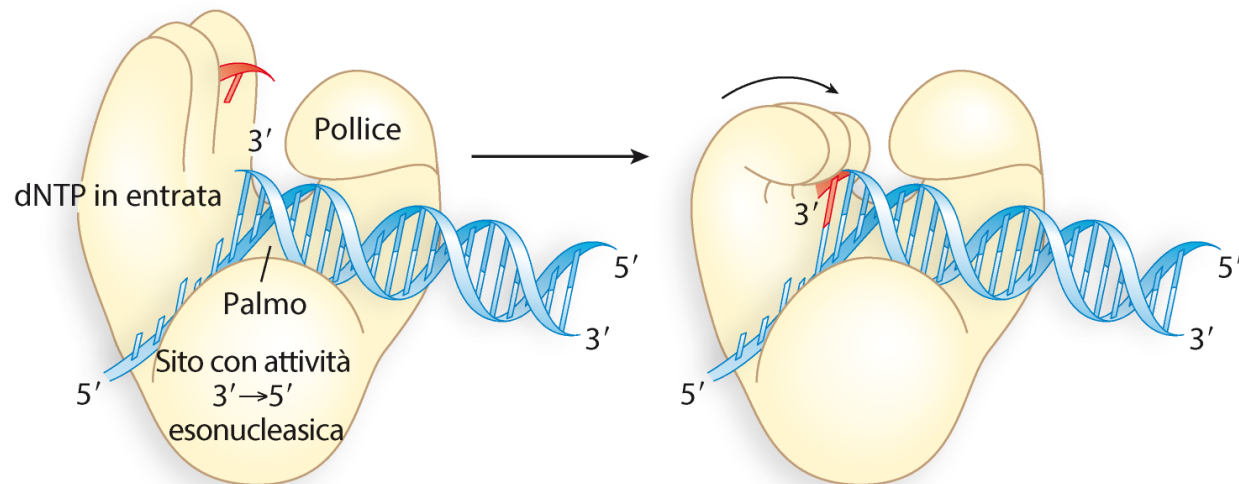
L'appaiamento del nucleotide provoca dei cambiamenti strutturali sulla DNA pol (rotazione di 40°) stimolando la catalisi.

Le dita piegano di 90° lo stampo esponendo solo la base da appaiare

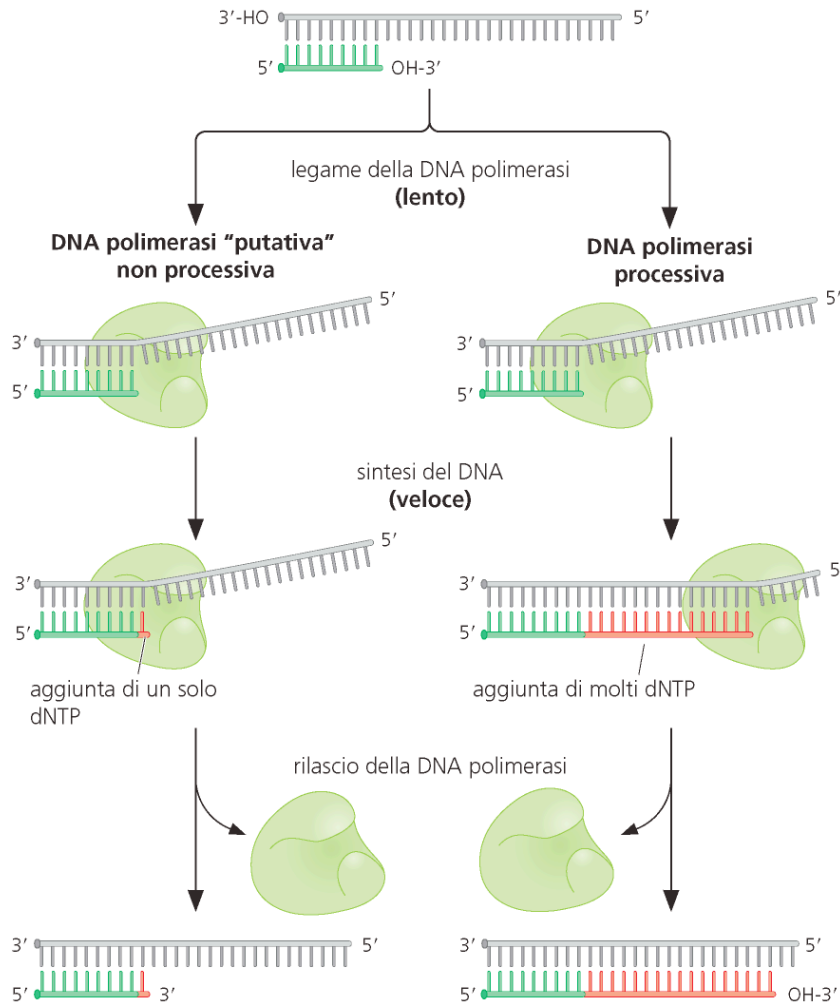


(a) Pol I, forma aperta

(b) Pol I, forma chiusa



Il pollice non è direttamente coinvolto nella catalisi, ma interagisce con il DNA neosintetizzato

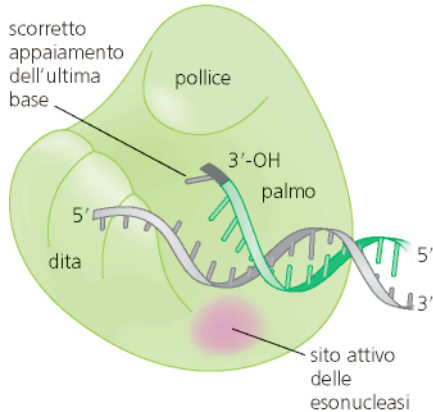


- mantiene in corretta posizione l'innesco ed il sito attivo,
- stabilizza il complesso DNA pol e substrato.

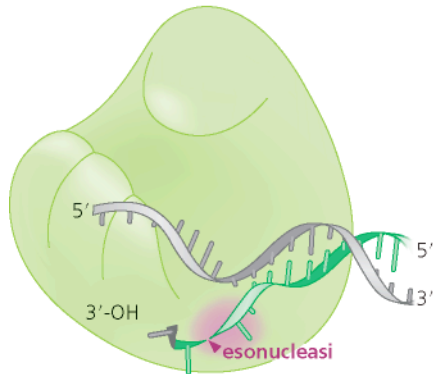
Natura **processiva** della DNA pol (1000 n/s): numero medio di nucleotidi polimerizzati ogni volta che si lega all'innesco.

Ha alta processività, può arrivare fino a 50.000 nt ad ogni legame.

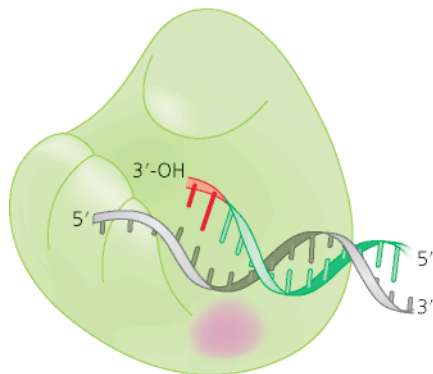
a sintesi del DNA lenta o assente



b rimozione dei nucleotidi male appaiati



c ripristino della normale attività di sintesi



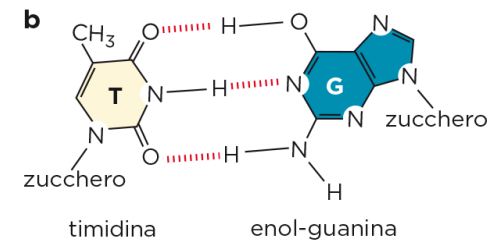
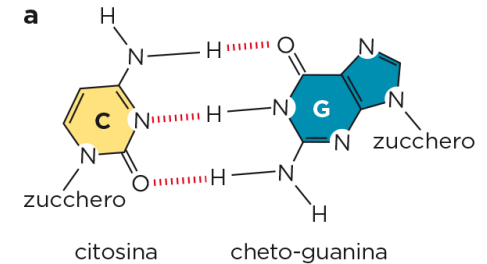
Attività esonucleasiche correggono gli errori sul DNA neosintetizzato

~ $1/10^5$ viene inserita una forma tautomerica **Esonucleasi correttore di bozze** corregge questi errori dalla estremità 3' della catena.

Quando viene aggiunto un nucleotide non corretto diminuisce la velocità di polimerizzazione perchè la base non è correttamente appaiata e non fornisce un buon innesco.

Il sito attivo della DNA pol lega con scarsa affinità lo stampo male appaiato mentre il sito attivo della esonucleasi ha un' affinità 10 x più alta per l' estremità 3' a singolo filamento.

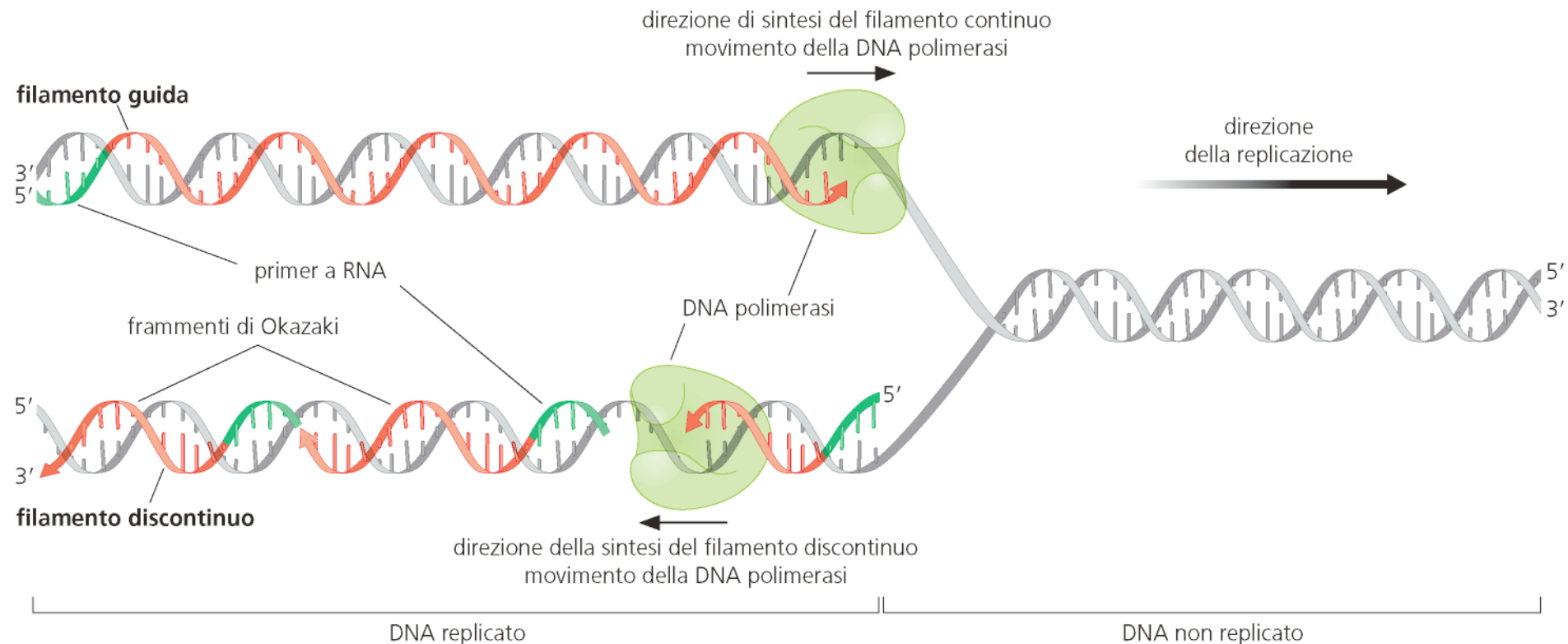
Tasto *delete* porta da $1/10^5$ a $1/10^7$ quello che si rileva è $1/10^{10}$ -> riparazione del DNA.



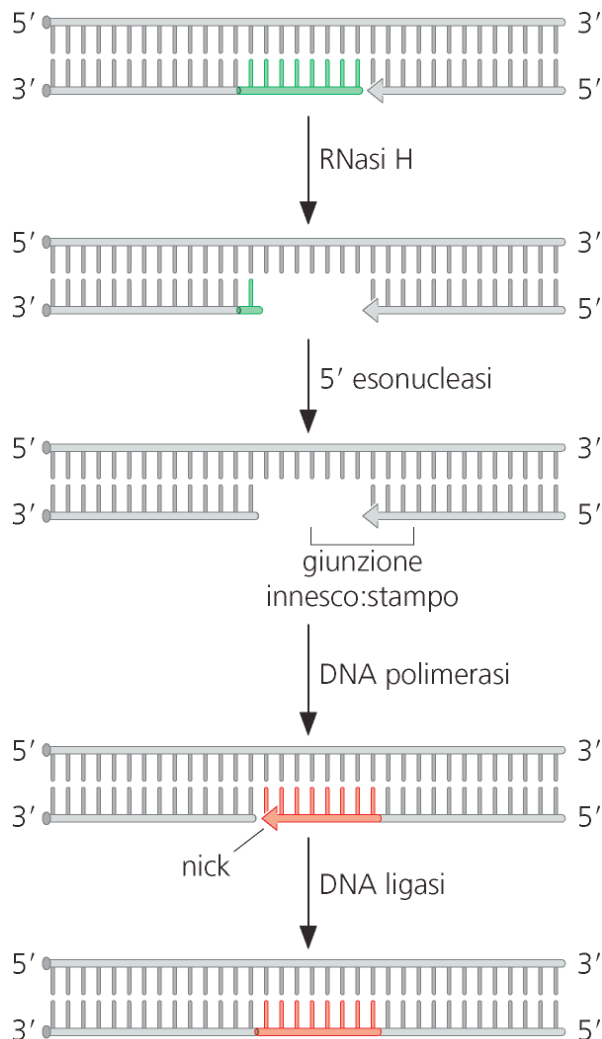
Entrambi i filamenti di DNA vengono sintetizzati a livello della forca replicativa

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 1.000-2.000 nei batteri, 100-400 eucarioti)



L' inizio di un nuovo filamento richiede un innesco a RNA che poi viene rimosso



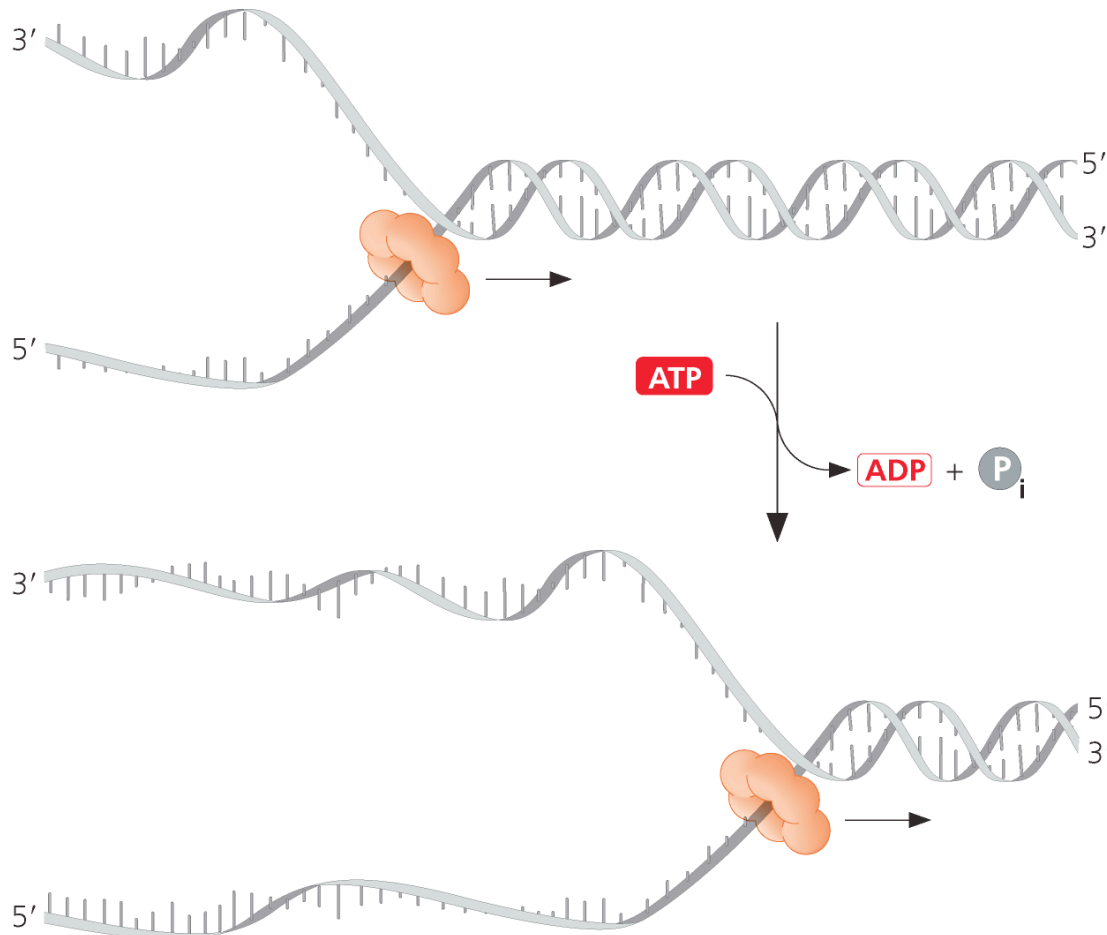
La **primasi** è una RNA pol che forma corti inneschi che poi vengono allungati dalla DNA pol.

Il filamento guida richiede un innesco, l' altro un primer ogni frammento di Okazaki.

RNasi H riconosce e degrada l' innesco, viene poi riempito dalla **DNA pol** ed il nick sigillato dalla **DNA ligasi**.

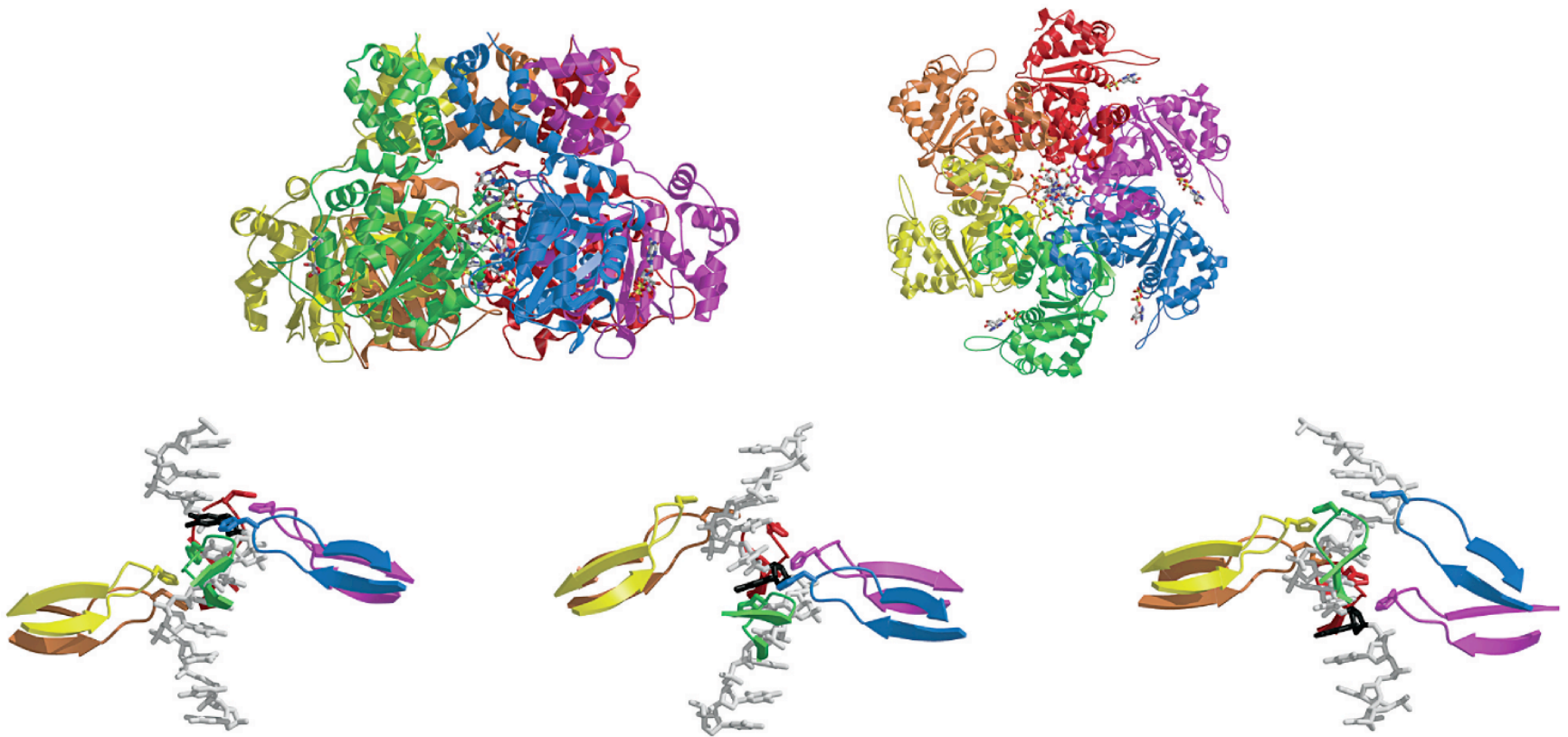
La DNA elicasi separa i due filamenti di DNA

Enzimi che legano e si spostano lungo il ssDNA utilizzando **ATP**.
Proteine esameriche che assumono la forma ad anello. Altamente processive.
Sia 5' → 3' che 3' → 5'



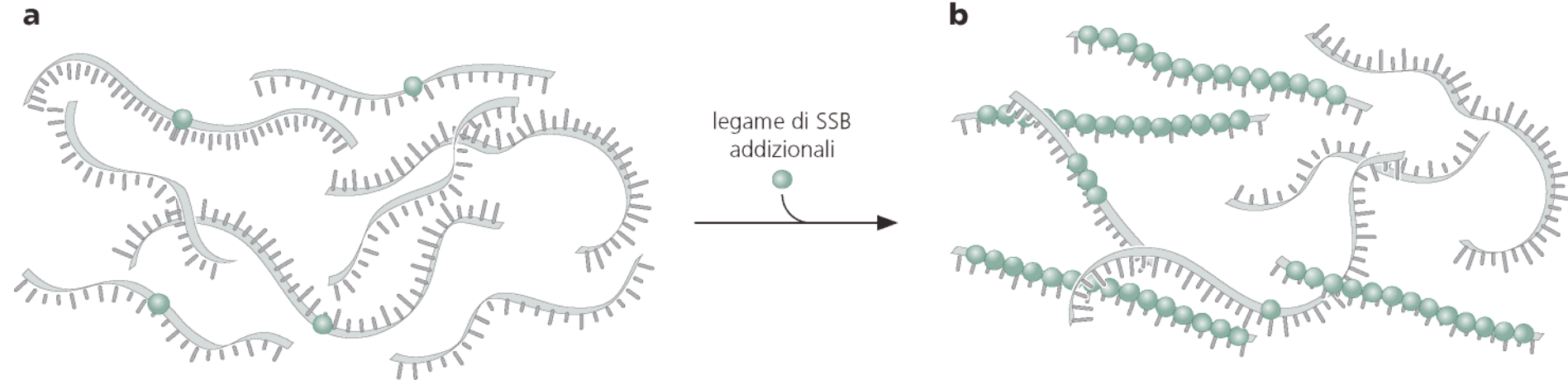
La DNA elicasi tira il DNA a singolo filamento attraverso un poro centrale

Ciascuna subunità ha un'ansa a “**forcina**” che lega un fosfato e i due desossiribosi del DNA. Separa anche i due filamenti (**poro centrale stretto** per il doppio filamento passa solo il singolo). “**6 mani che tirano una fune**”.

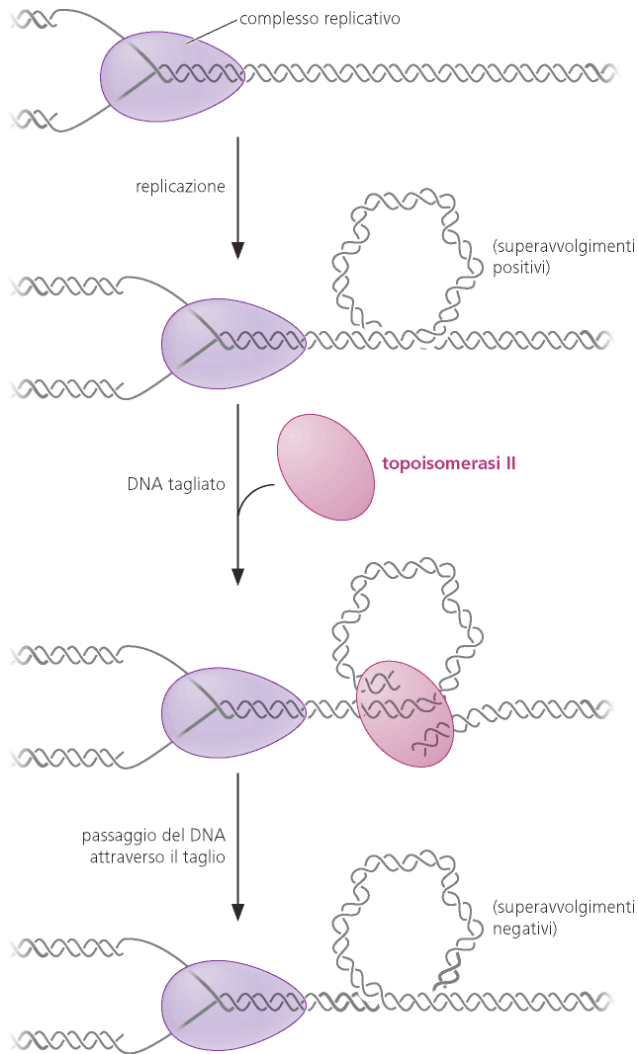


Proteine che legano il ssDNA stabilizzano la sua struttura prima della replicazione

Dopo il passaggio dell'elicasi il DNA potrebbe riappaiarsi. Per stabilizzare -> **ssDNA-binding proteins**. Legame cooperativo.



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.

Topoisomerasi!!

Le DNA polimerasi sono specializzate in ruoli differenti

TABELLA 9.1 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 2-7	Complesso Mcm 2-7
SSB	SSB	RPA	RPA
Topoisomerasi	Girasi, topoisomerasi I	Topoisomerasi I, II	Topoisomerasi I, II

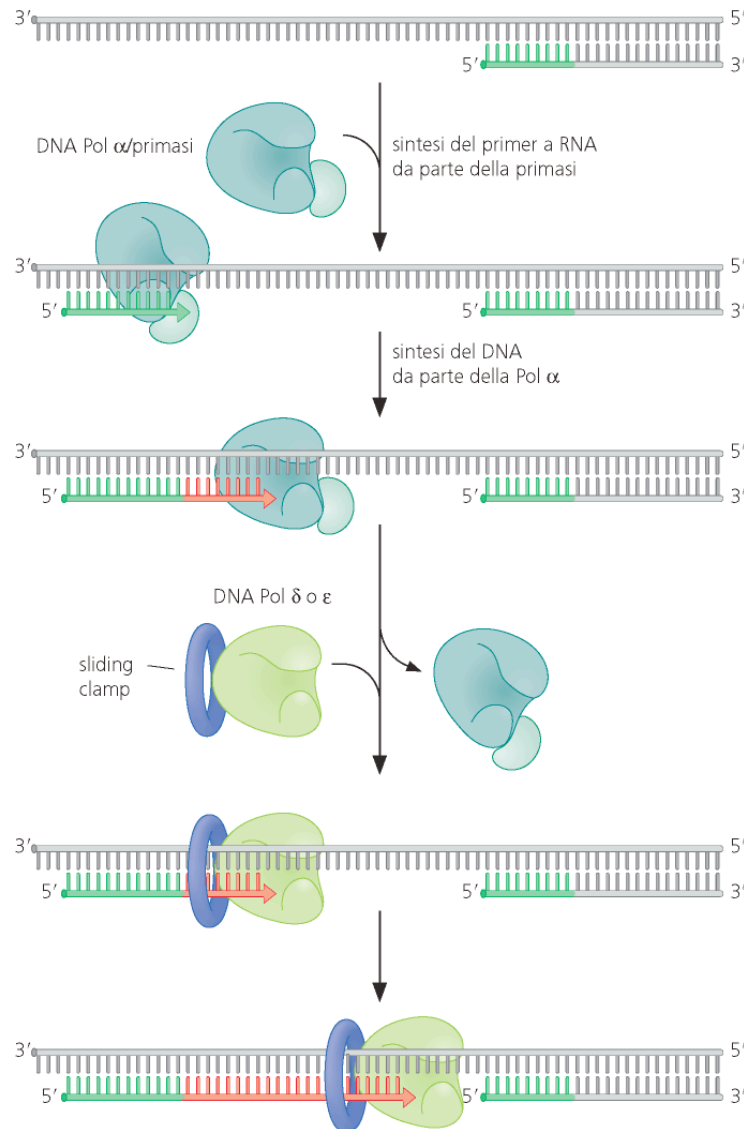
TABELLA 9.2 Attività e funzioni delle DNA polimerasi

	Numero delle subunità	Funzioni
Procarioti (<i>E. coli</i>)		
Pol I	1	Rimozione dell'innesco a RNA, 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		
Pol α	4	Sintesi dell'innesco durante la replicazione del DNA
Pol β	1	Riparazione per escissione delle basi
Pol γ	3	Replicazione del DNA mitocondriale e riparazione
Pol δ	2-3	Sintesi di DNA sul filamento discontinuo; riparazione per escissione delle basi e dei nucleotidi
Pol ϵ	4	Sintesi di DNA sul filamento guida; riparazione per escissione delle basi e dei nucleotidi
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
RevI	1	TLS

DNA pol α è costituita da **4 subunità: 2 primasi e 2 DNA polimerasi**. La primasi sintetizza ex-novo un tratto di RNA di 7-12 ribonucleotidi che viene di poco allungato con deossiribonucleoti dalle altre 2 subunità.

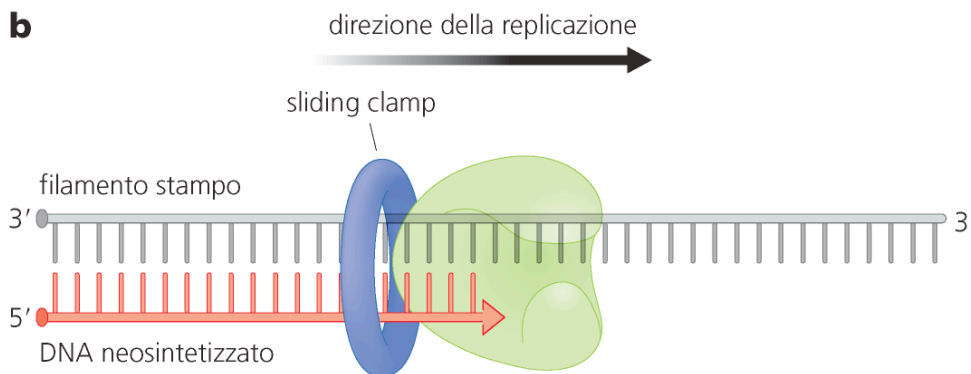
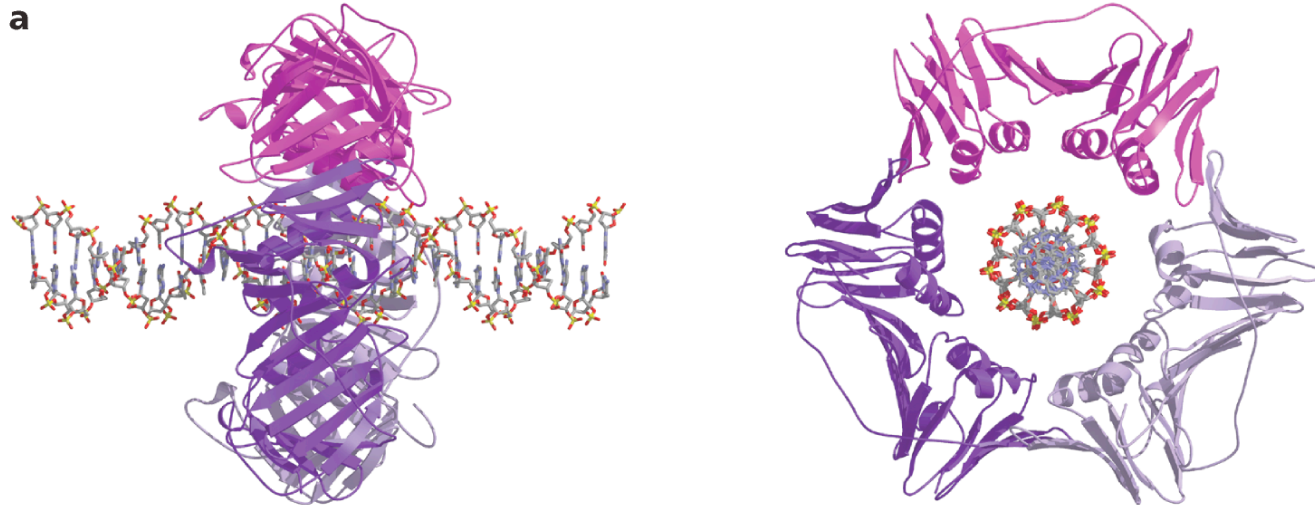
Switching della polimerasi (eucarioti)

Prima la DNA pol α

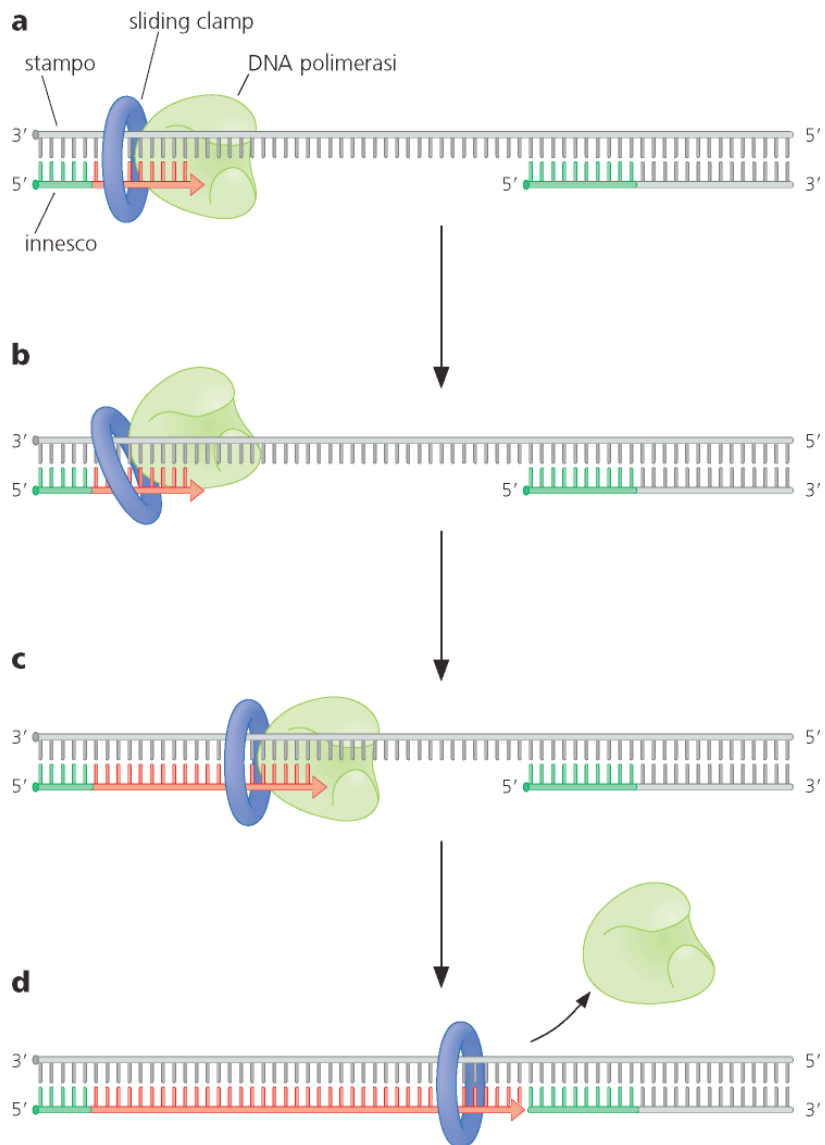


poi la DNA pol δ o ϵ

Le proteine che permettono lo scivolamento delle polimerasi (**sliding clamp**) aumentano la processività delle DNA pol



Più subunità a formare una
ciambella.
Interagiscono con le DNA pol.



La **DNA pol** ha una grande affinità per la **sliding clamp**, ma quando raggiunge l'estremità la presenza di dsDNA nel suo sito attivo induce un cambiamento conformazionale che ne riduce l'affinità. Quindi viene rilasciata.

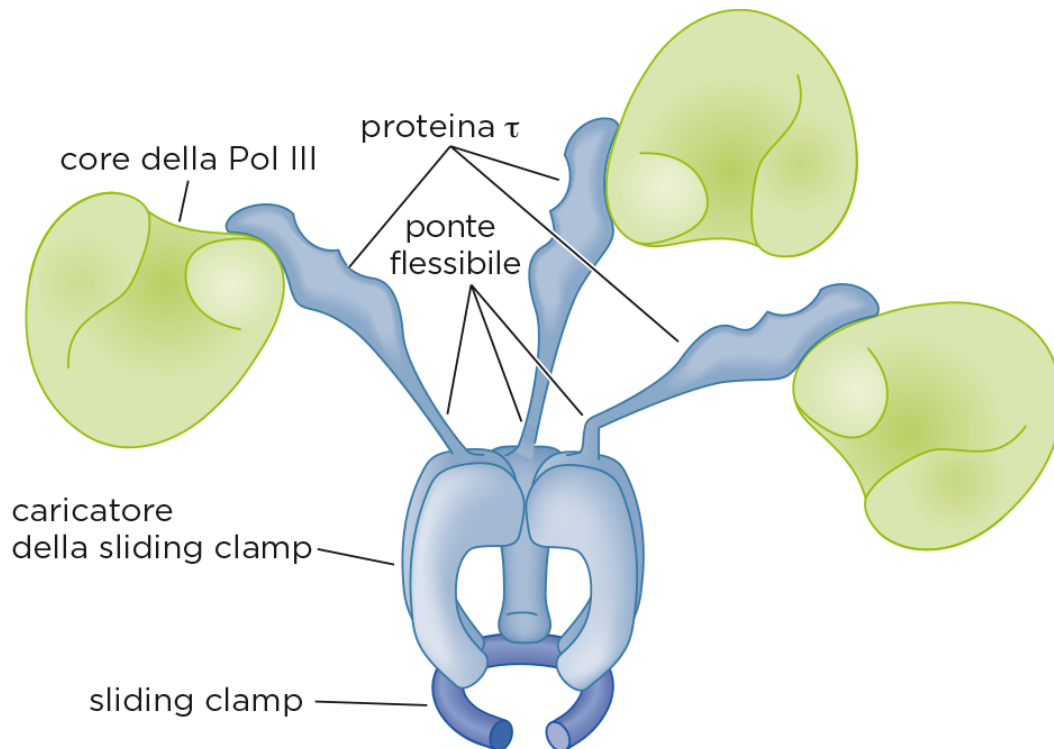
La DNA sliding clamp negli eucarioti si chiama **PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)**.

La sintesi del DNA a livello della forca replicativa

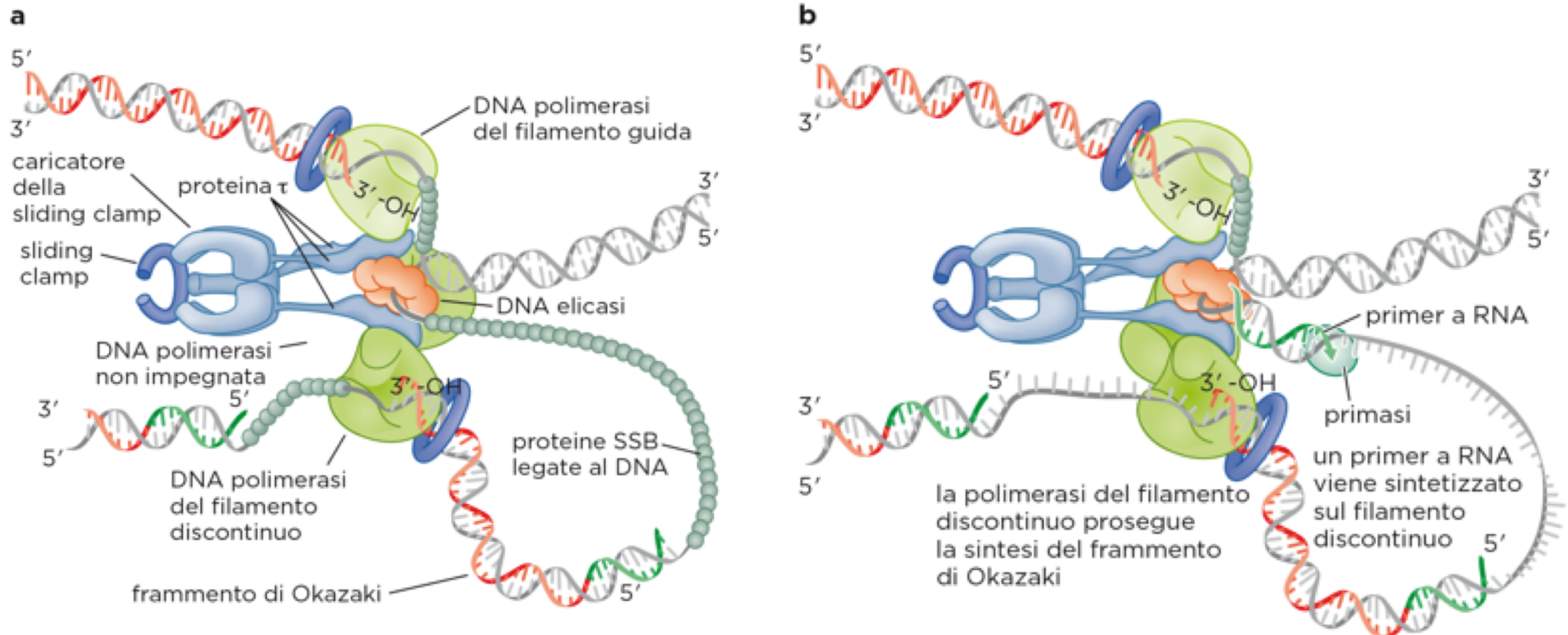
A livello della forca replicativa il **filamento guida** e quello **discontinuo** sono **sintetizzati simultaneamente**.

Per limitare la presenza di ssDNA -> **molte DNA pol lavorano sulla forca**.

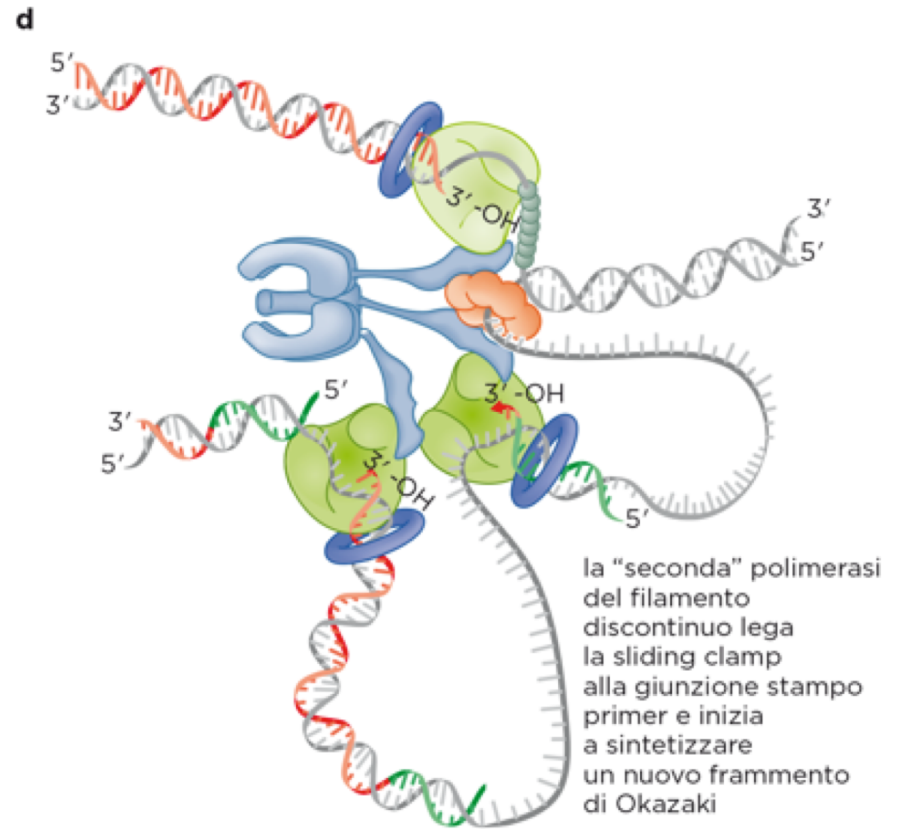
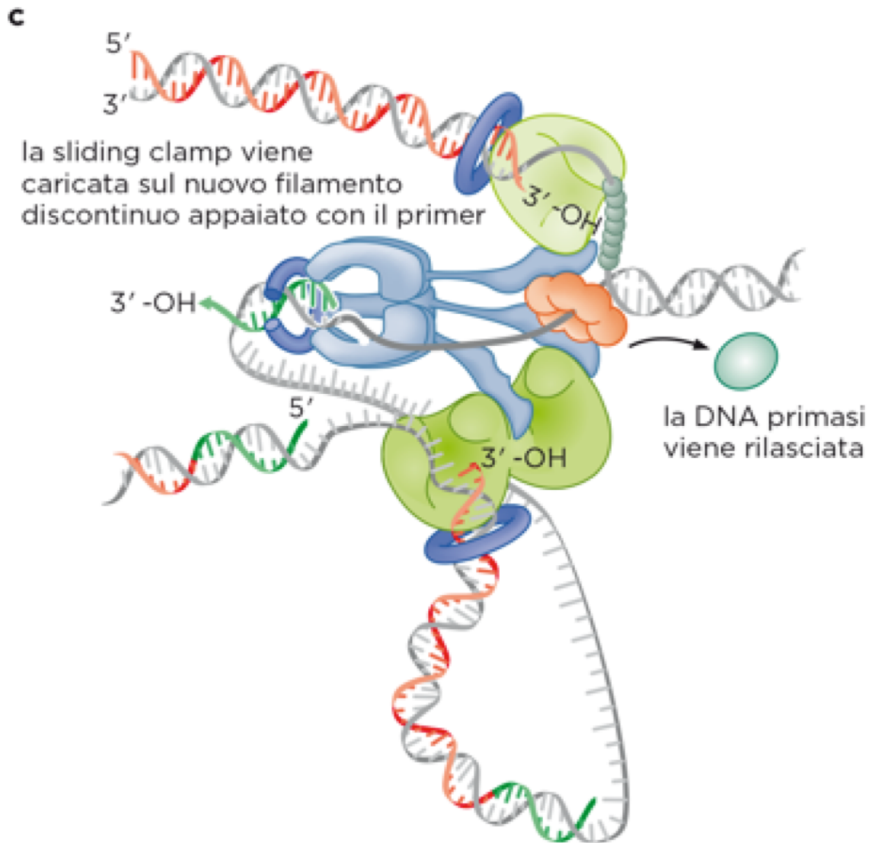
In *E. coli* l'enzima **DNA pol III** è costituito da **3 (2?) copie** del core enzimatico e fattori che ne regolano la funzione.



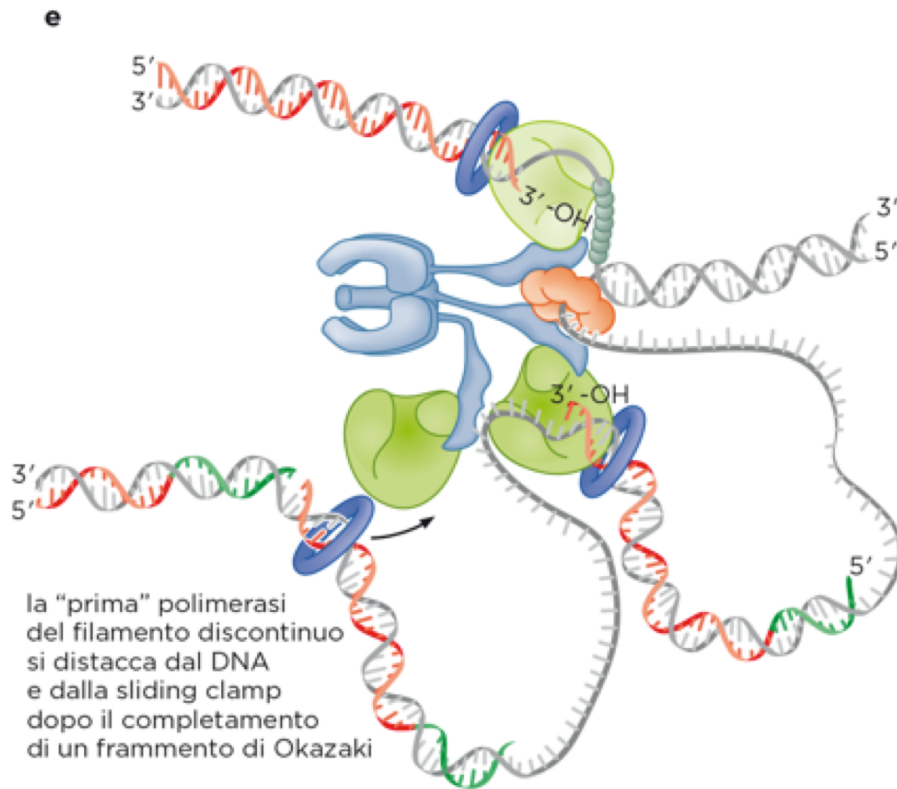
Modello della sintesi di DNA sulla forca replicativa



Modello della sintesi di DNA sulla forca replicativa

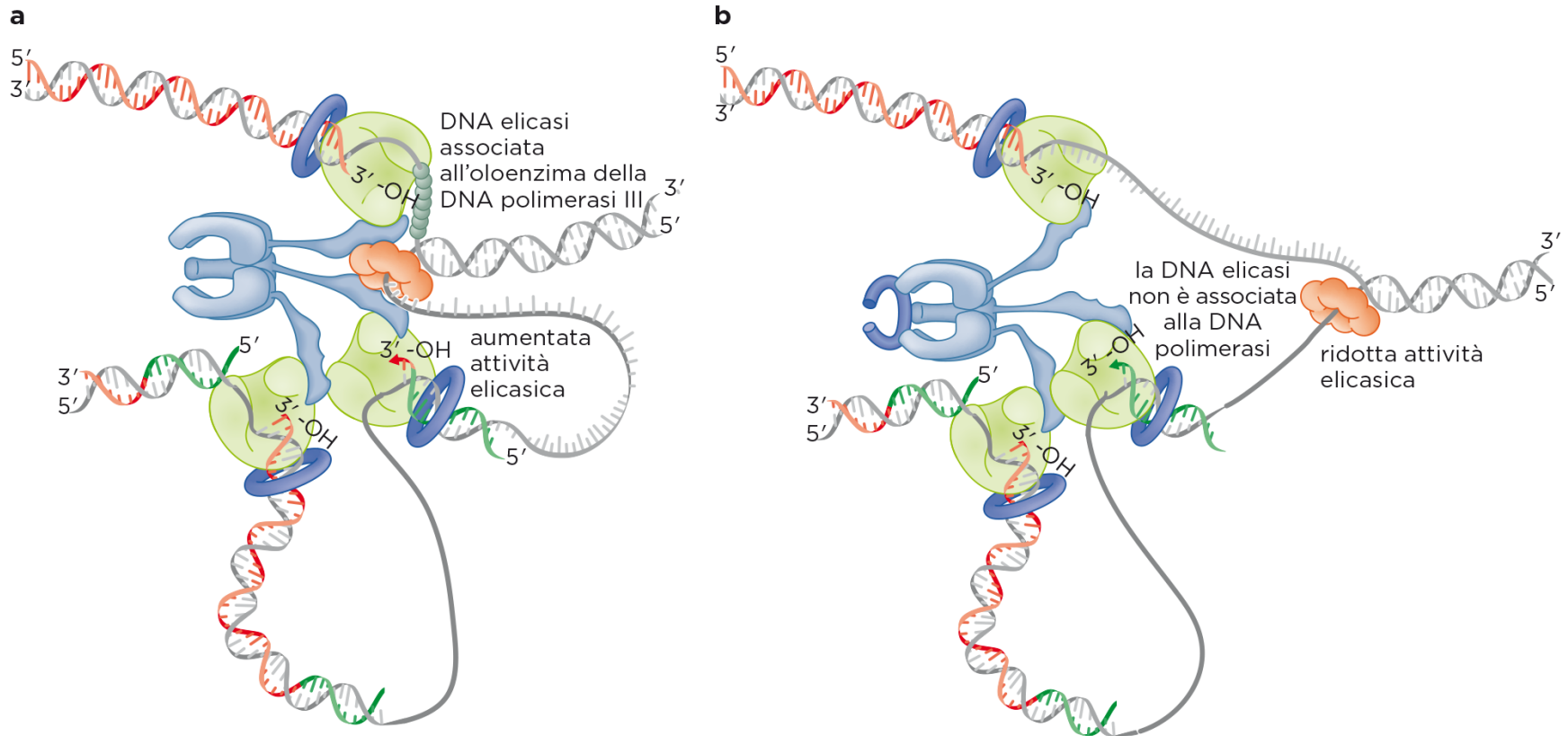


Modello della sintesi di DNA sulla forca replicativa



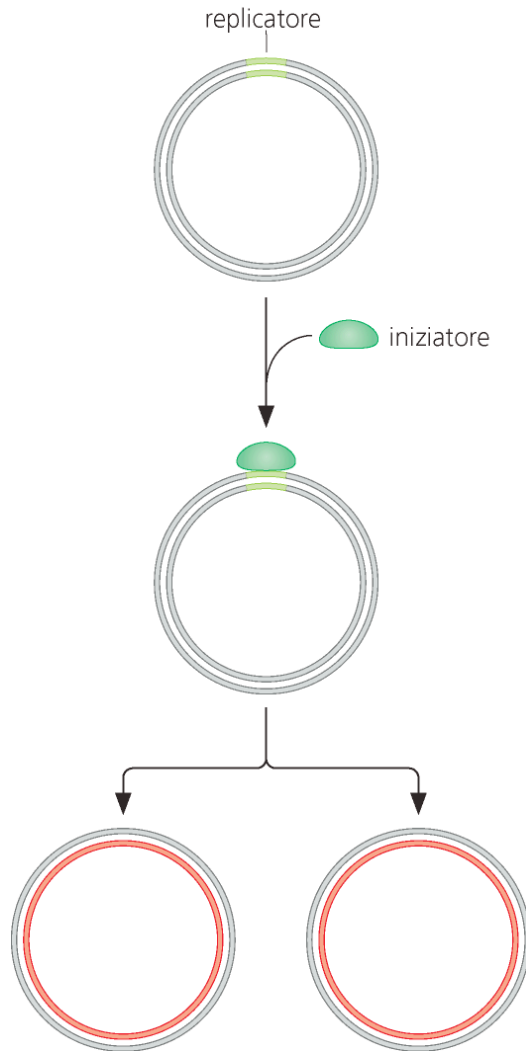
Modello del trombone

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



Il complesso di tutte le proteine che lavorano alla forza replicativa prende il nome di **replisoma**.

Sequenze specifiche promuovono l'inizio della replicazione del DNA: le origini di replicazione



Il modello del **replicone**.

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

L' **iniziatore**: fattore in *trans* (proteina) che si lega.

I replicatori includono siti di legame per l' iniziatore

I **replicatori** includono:

- 1) Sito di legame per la proteina iniziatrice (**verde**)
- 2) Tratti ricchi in AT che si aprono facilmente (**azzurro**)

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.

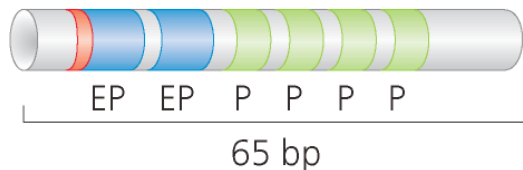
a

oriC (*E. coli*)



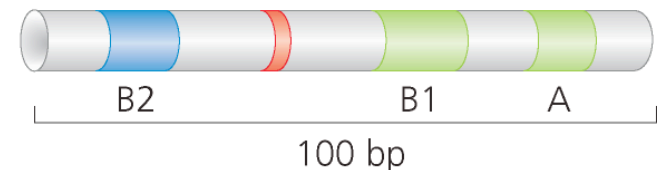
b

SV40

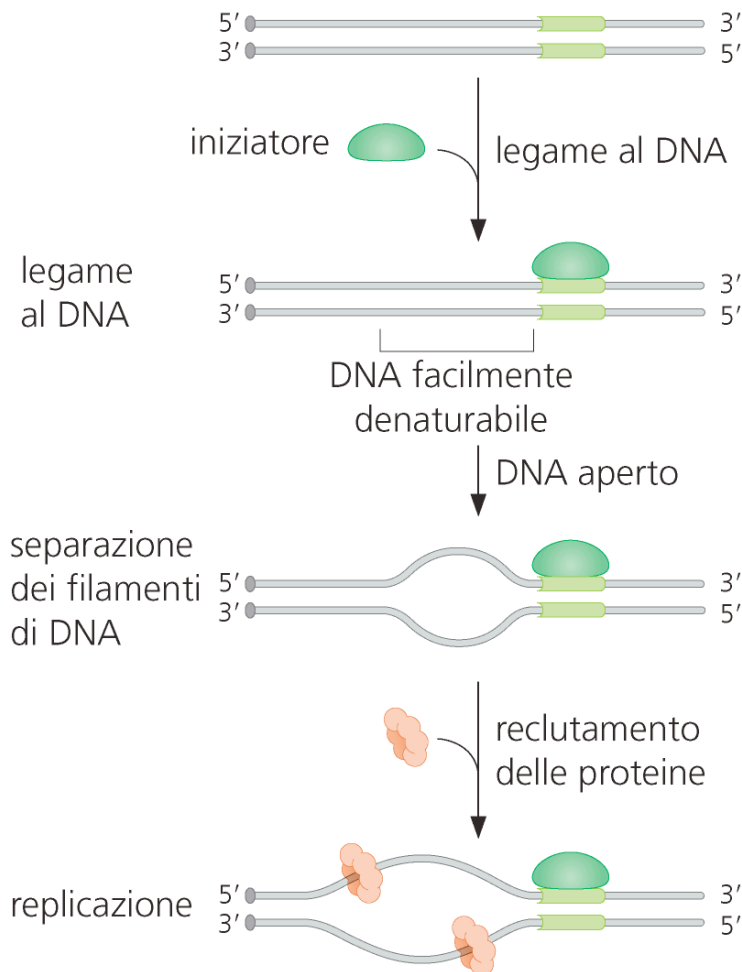


c

S. cerevisiae



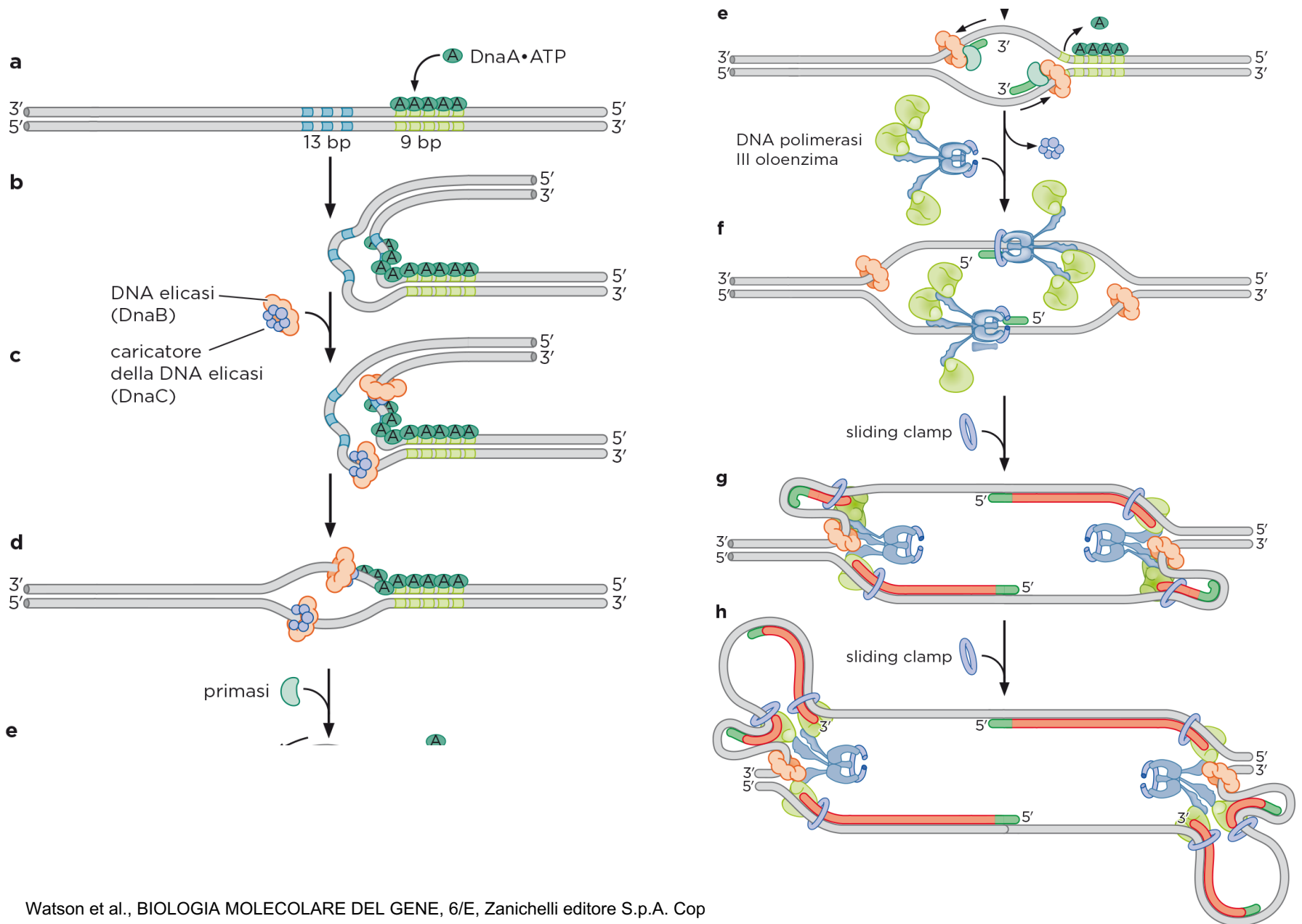
Il legame e l'apertura della doppia elica: l'inziatore seleziona e attiva l'origine



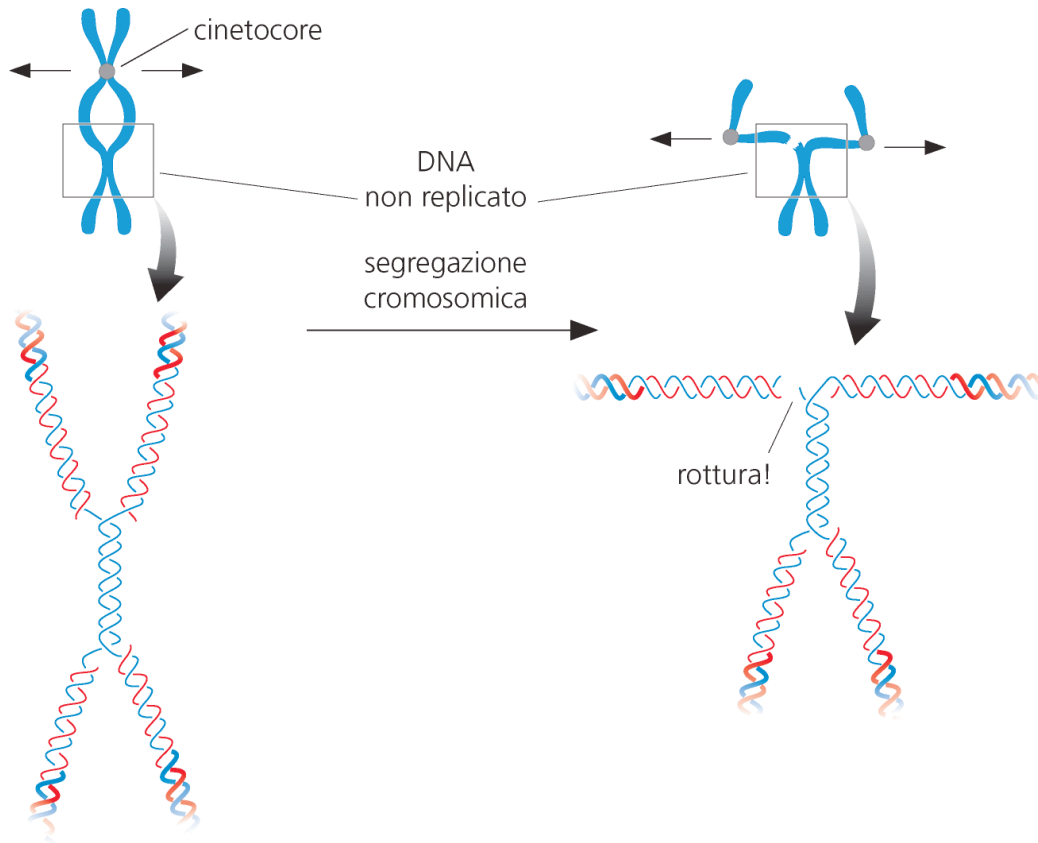
Le proteine iniziatore:

- 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**.

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



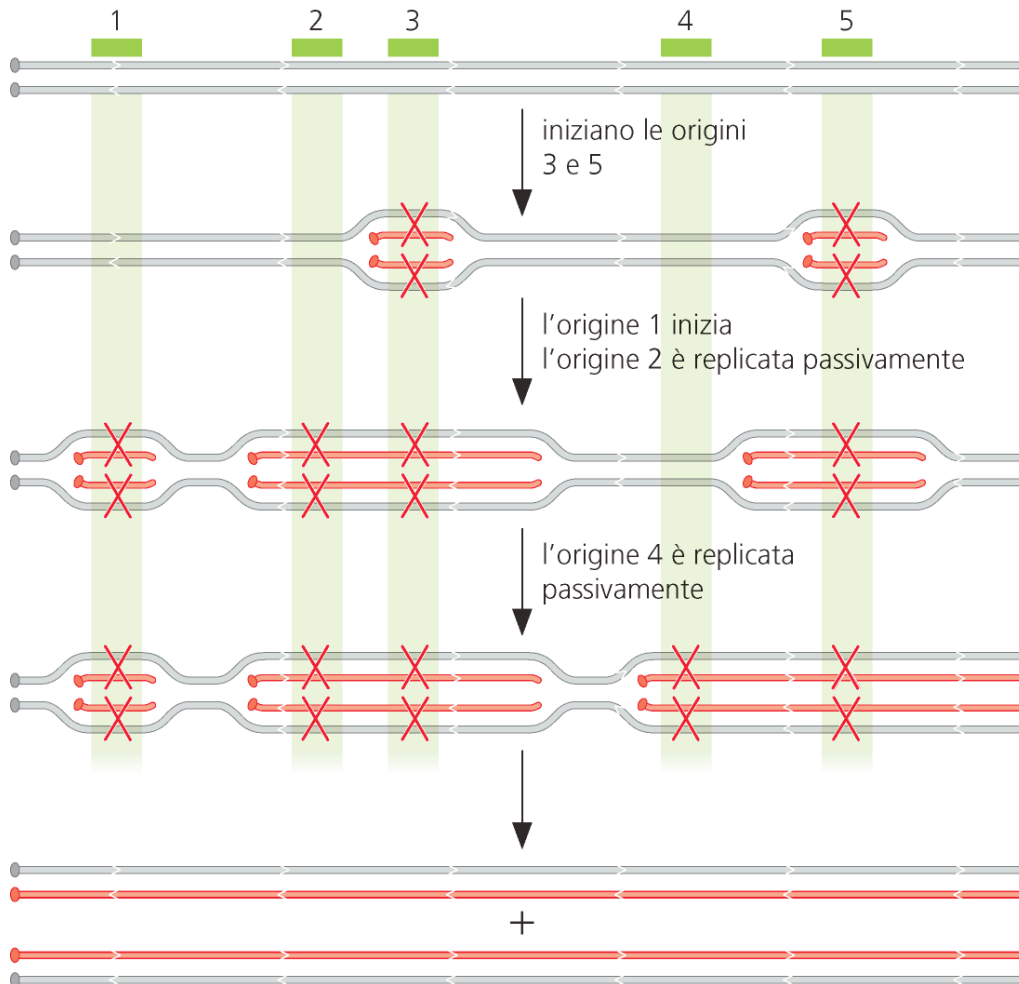
I cromosomi eucariotici vengono replicati una sola volta ogni ciclo cellulare



Nei **procarioti** tipicamente **una** sola **origine** di replicazione ed **un cromosoma circolare**.

I cromosomi eucariotici contengono **origine di replicazione multiple** e quindi la loro attivazione deve essere controllata per evitare ad es. rotture indotte da una replicazione incomplete oppure che vengano attivate più volte durante una divisione cellulare.

I replicatori vengono inattivati dalla replicazione del DNA

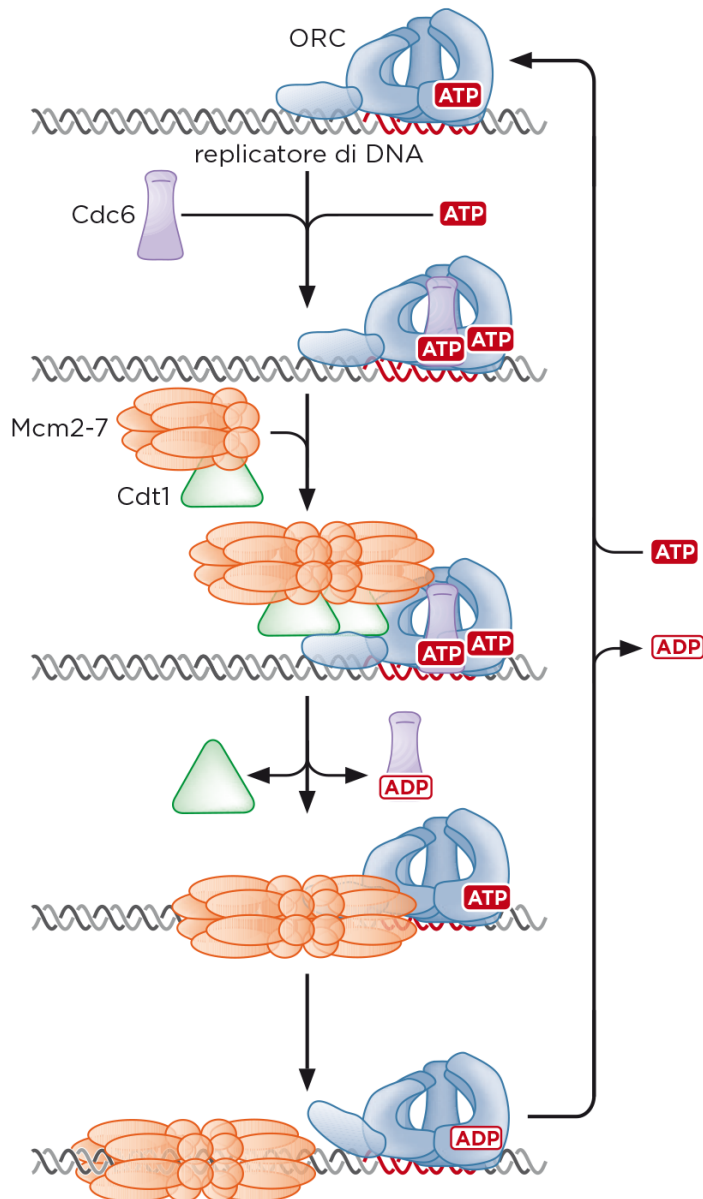


Le origini sono separate da circa 30 Kbp.

Un cromosoma quindi ne può avere diverse migliaia.

Non tutte vengono necessariamente utilizzate ad ogni ciclo -> disattivazione delle origini adiacenti o **replicazione passiva**.

La formazione del complesso prereplicativo (pre-RC) è il primo passaggio per la replicazione eucariotica



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

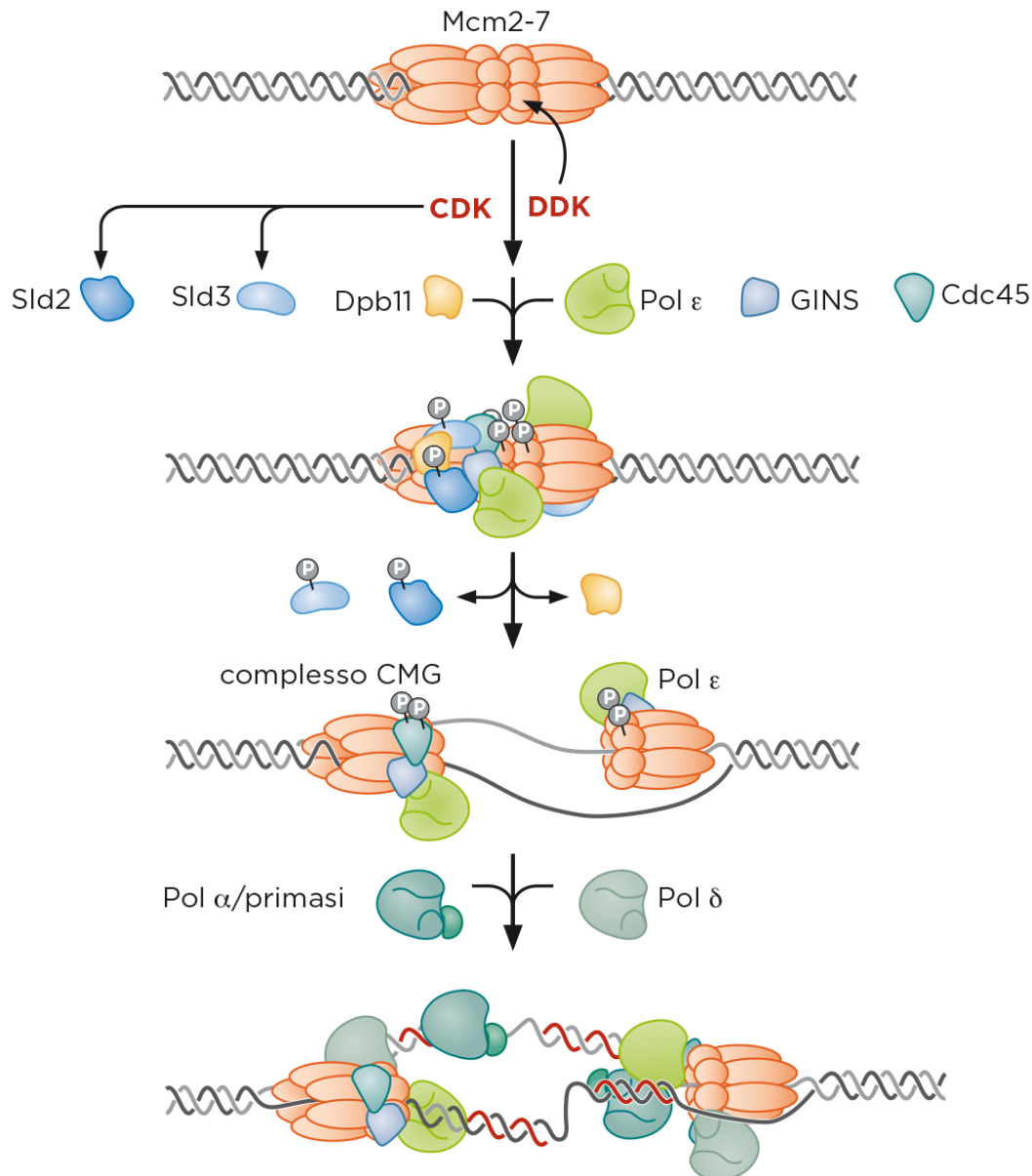
La selezione del replicatore (in cis) individua le sequenze che dirigeranno la sintesi ed è mediata dalla formazione dei complessi pre-replicativi.

Il primo stadio della formazione del pre-RC è il riconoscimento del replicatore da parte del **Complesso dell'Origine di Replicazione (ORC)**.

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

Il complesso recluta poi l' **elicasi** (Mcm2-7).

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

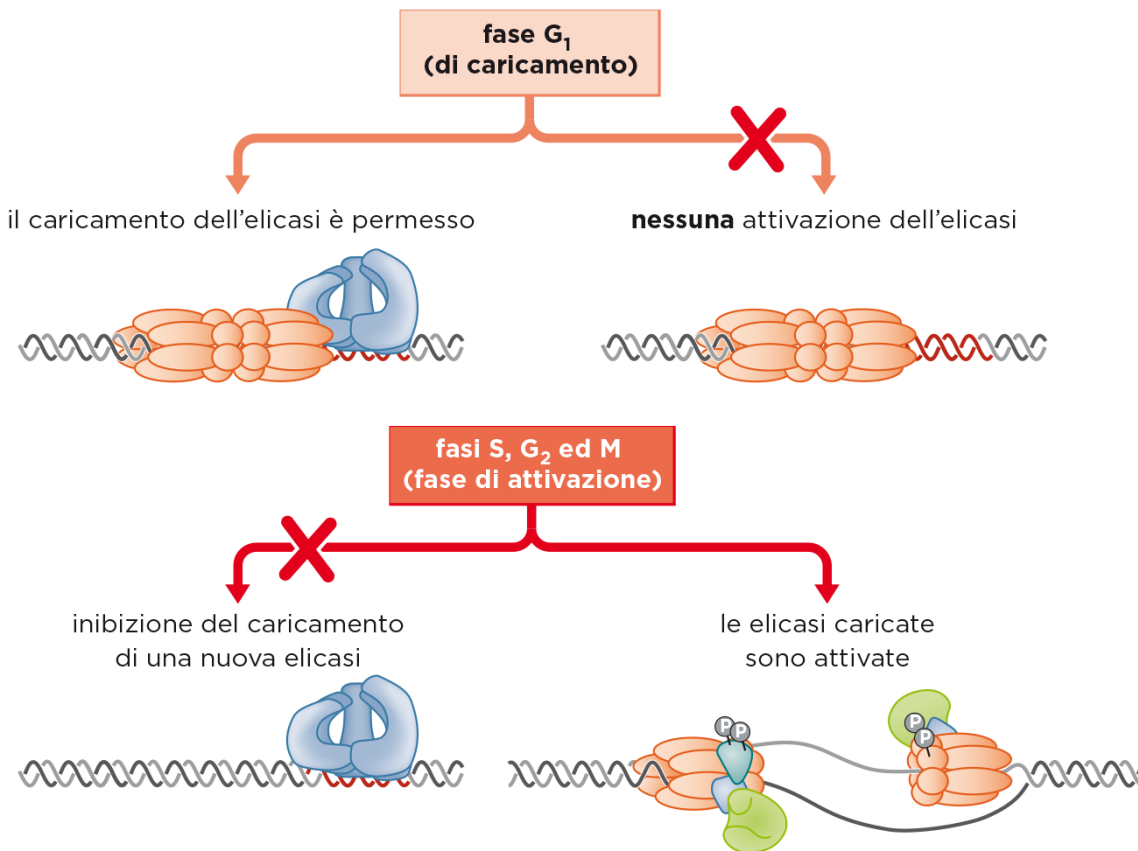


Il pre-RC viene successivamente **attivato da due kinasi: Cdk** (*cyclin-dependent kinase*) e **Ddk** (*Dbf4-dependent kinase*).

Sono inattive in G1 ma vengono **attivate all'ingresso della fase S**.

Fosforilano il pre-RC ed altri fattori. Viene reclutata prima la **DNA pol ϵ** poi la δ e la α /**primasi**, in modo tale che l'innesco viene sintetizzato quando tutte e 3 le pol sono state reclutate.

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

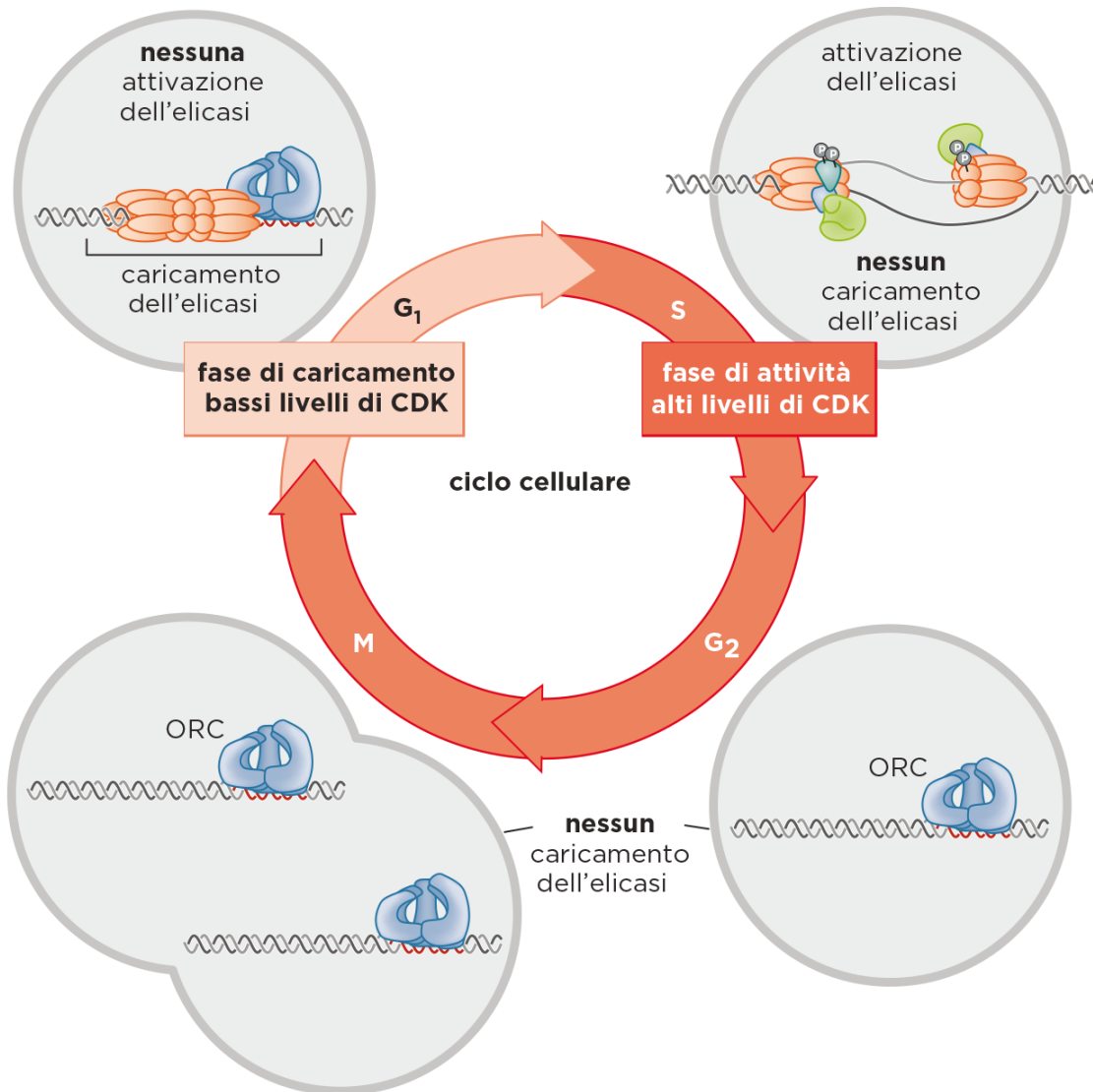


Durante la fase G₁ le cellule sono nella fase di caricamento dell'elicasi e non sono in grado di attivarla.

All'ingresso di S e durante G₂ ed M le elicasi caricate possono essere attivate ma non possono essere caricate di nuove.

-> rigida regolazione della formazione e attivazione del pre-RC da parte delle kinasi ciclina dipendenti (Cdk).

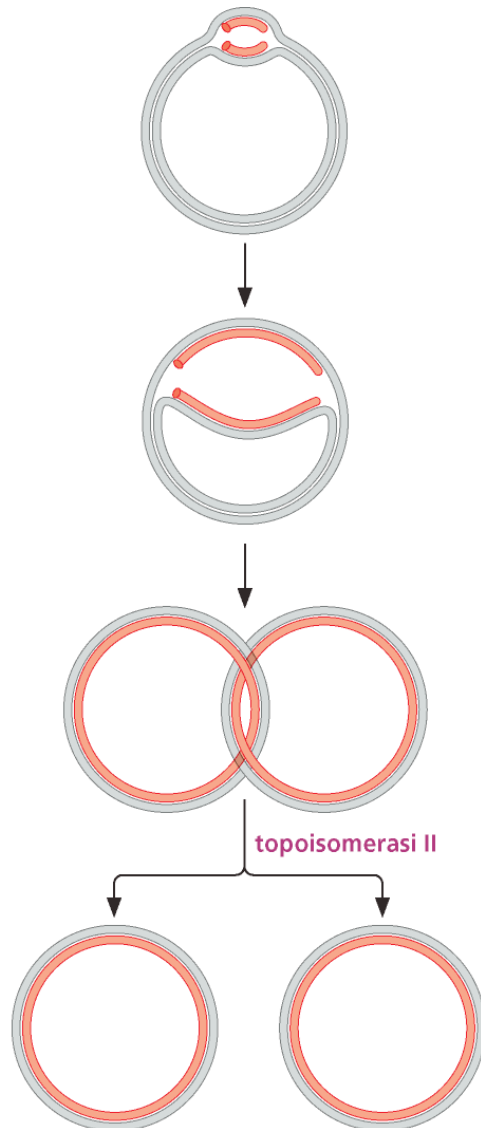
Livelli di Cdk bassi durante G1, mentre sono alti nelle altre fasi



La rigida regolazione della **formazione e attivazione del pre-RC** è dovuta alle **kinasi ciclina dipendenti (Cdk)**.

Duplice ruolo per le cdk:
-**necessarie** per **attivare il pre-RC** in modo tale che possa iniziare la replicazione del DNA;
-**inibiscono** la formazione di **nuovi pre-RC** inibendo il caricamento dell'elicasi (inibiscono funzionalità di ORC, Cdc6 e Cdt1).

La terminazione della replicazione



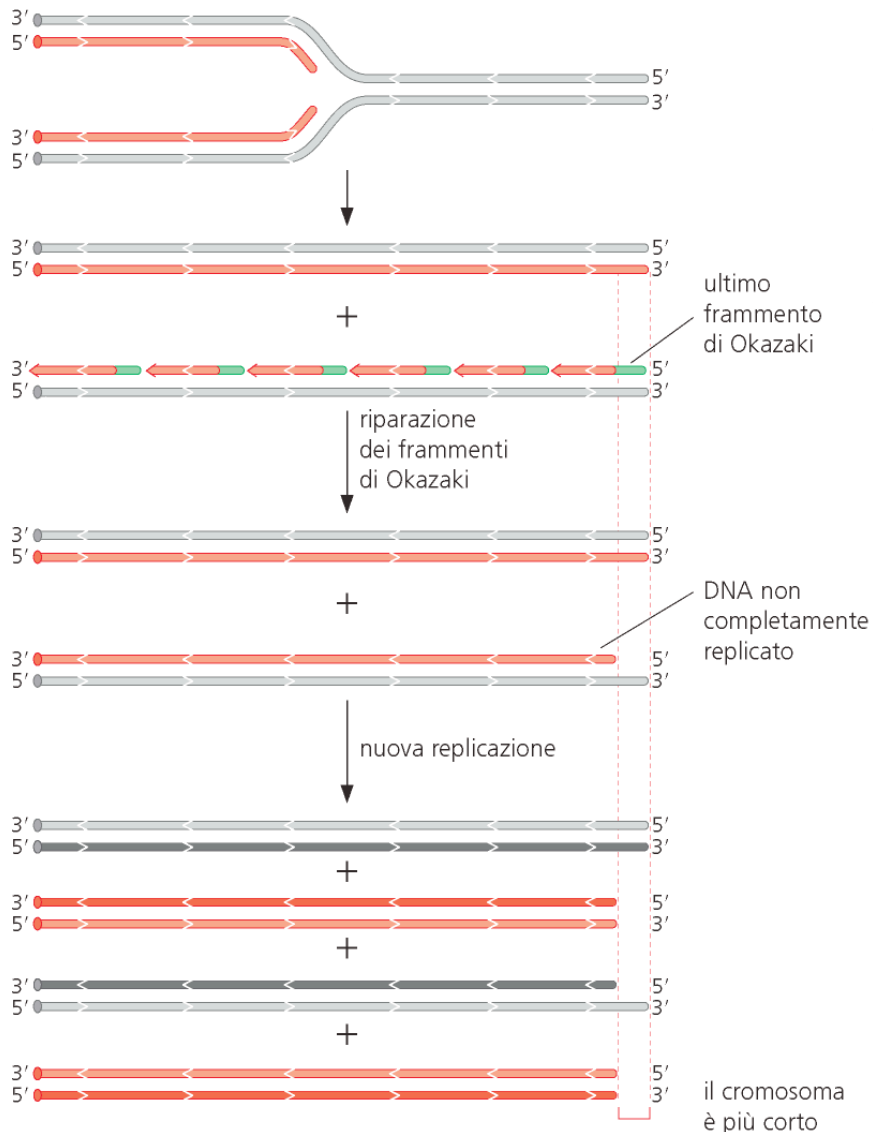
Le topoisomerasi sono necessarie per separare le molecole di DNA figlie.

Sia per molecole di DNA circolarmente chiuse che quelle dei cromosomi lineari.

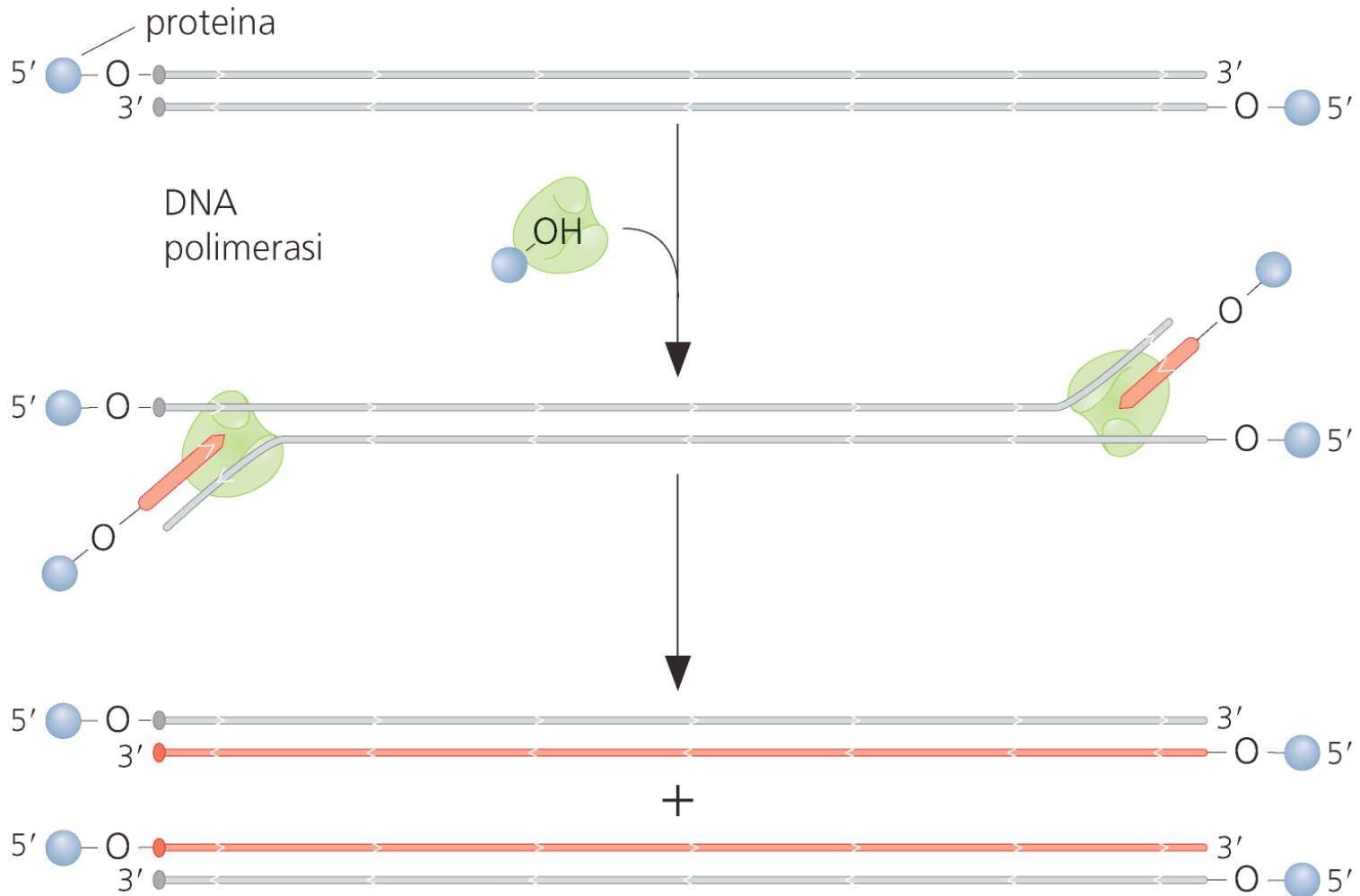
Come vengono copiate le estremità dei cromosomi liberi???

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

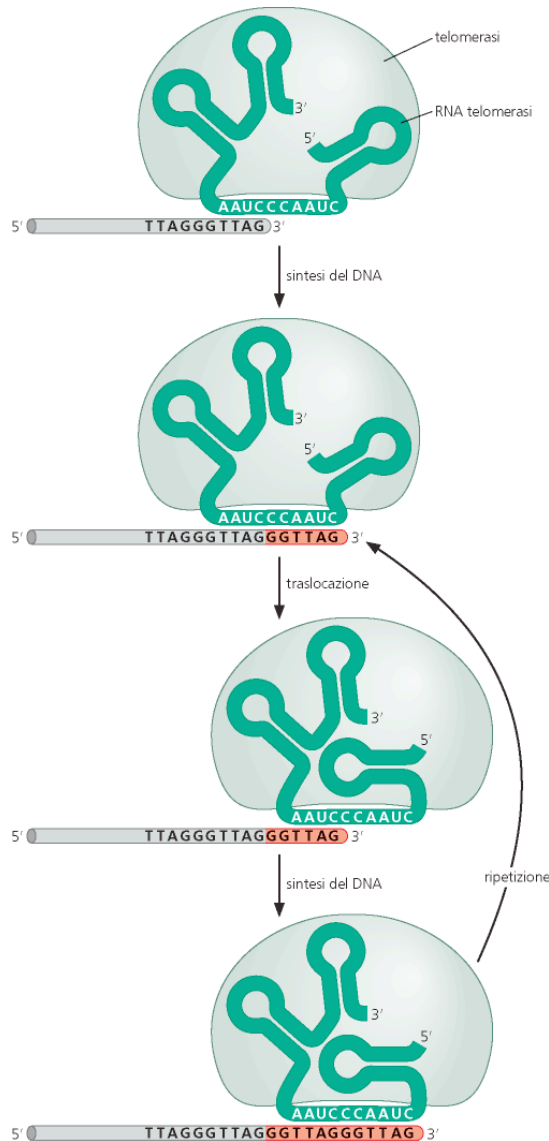
Lentamente dopo alcune generazioni verrebbe perso del DNA.



Virus hanno proteina che lega DNA pol e fornisce innesco



La telomerasi è una DNA pol che non richiede stampo esogeno



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

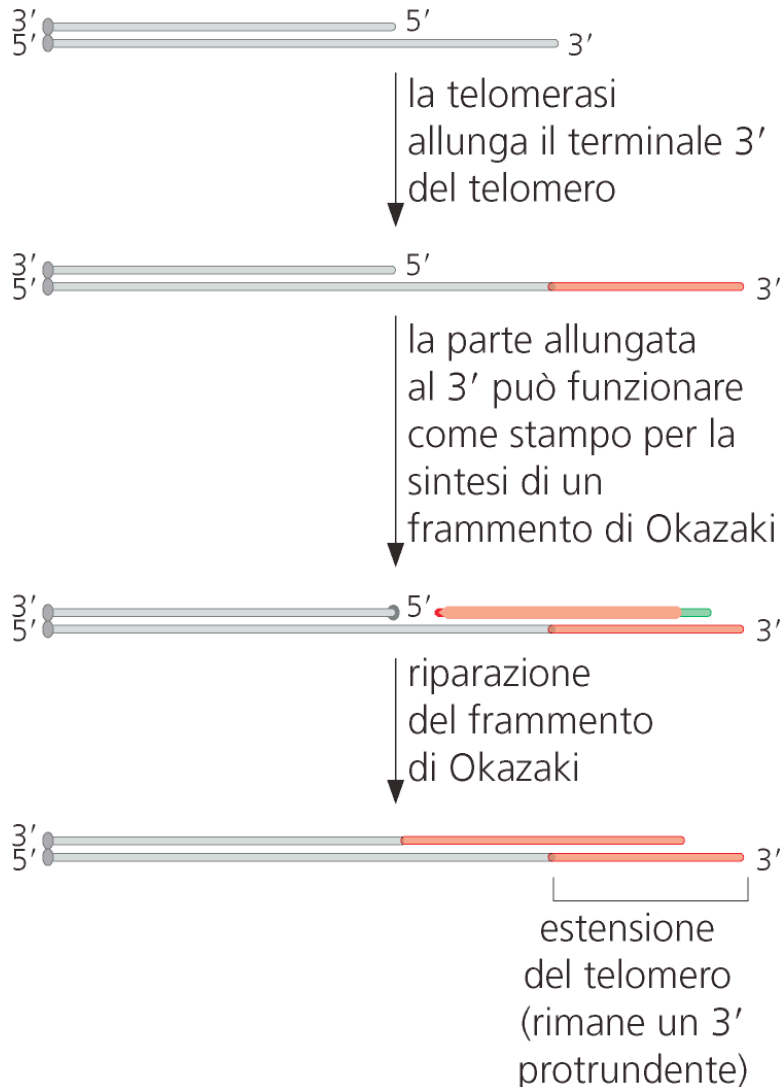
Questa sequenza recluta una DNA pol specifica (**telomerasi**).

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

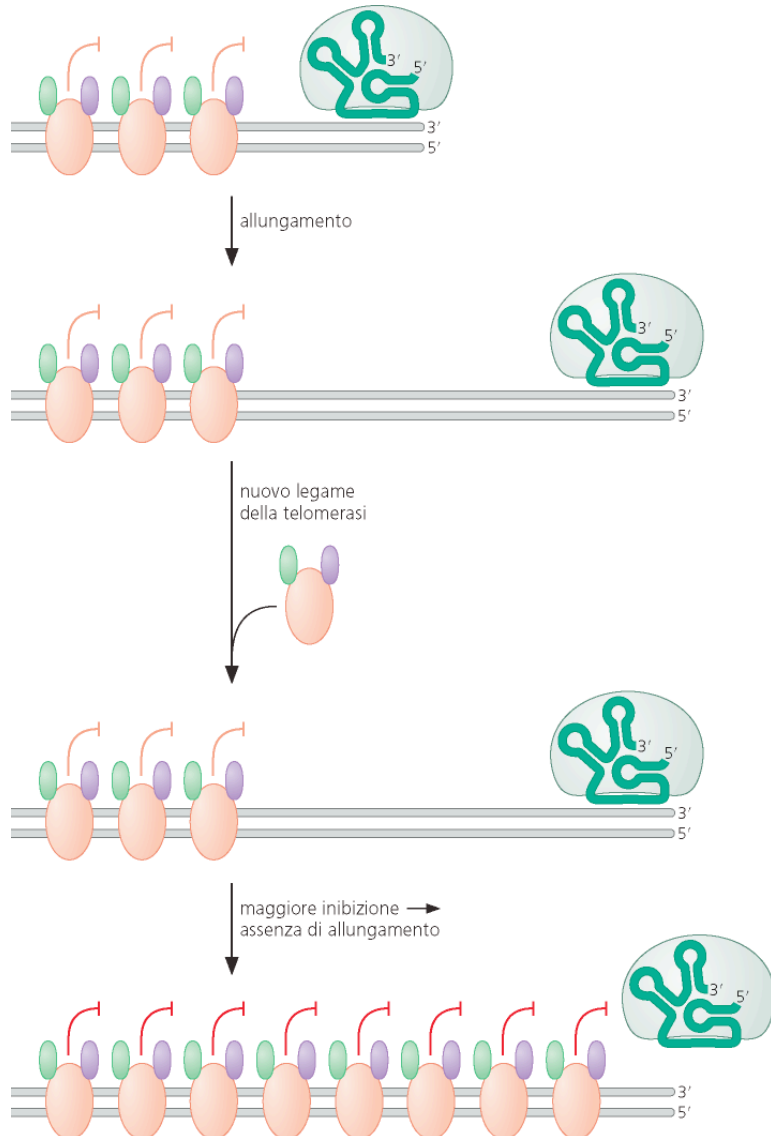
Una subunità della telomerasi (*telomerase reverse transcriptase* - TERT) utilizza come stampo l'RNA, è una **trascrittasi inversa**.

Sintetizza del DNA, trasloca, sintetizza dell'altro DNA,.....

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



Le proteine che legano il telomero inibiscono l'attività telomerasica



Quando il telomero è costituito da un numero ridotto di ripetizioni -> poche proteine si legano -> scarsa inibizione.

Se il telomero è più lungo -> più proteine si legano -> maggior inibizione.

Circuito di **regolazione negativa!**

I telomeri delle cellule in coltura si accorciano progressivamente.

In generale la telomerasi è attiva in cellule tumorali.

Invecchiamento, cancro e l'ipotesi dei telomeri.

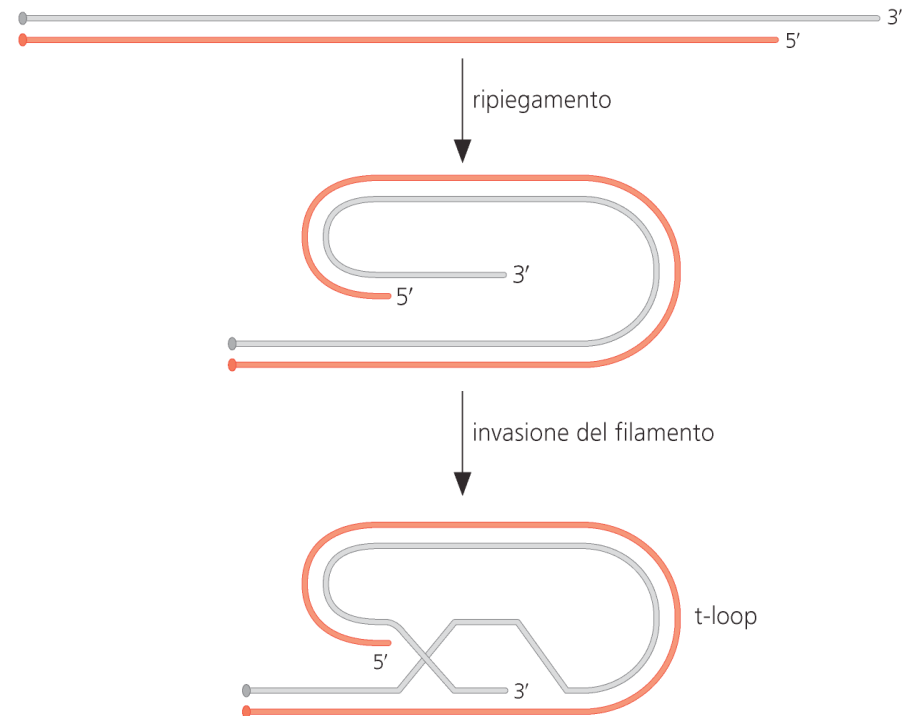
Formazione di una struttura t-loop all'estremità dei telomeri

Funzione protettiva per evitare che sia soggetto a riparazione.

a



b



Video my Zanichelli
La sintesi del DNA
La replicazione del DNA
DNApol, Elicasi e Sliding clamp
L'attività della telomerasi

DNA replication

<https://www.youtube.com/watch?v=aR96YQ1DR4k>

L'azione della telomerasi

<https://www.youtube.com/watch?v=RBPIXJOggUE>