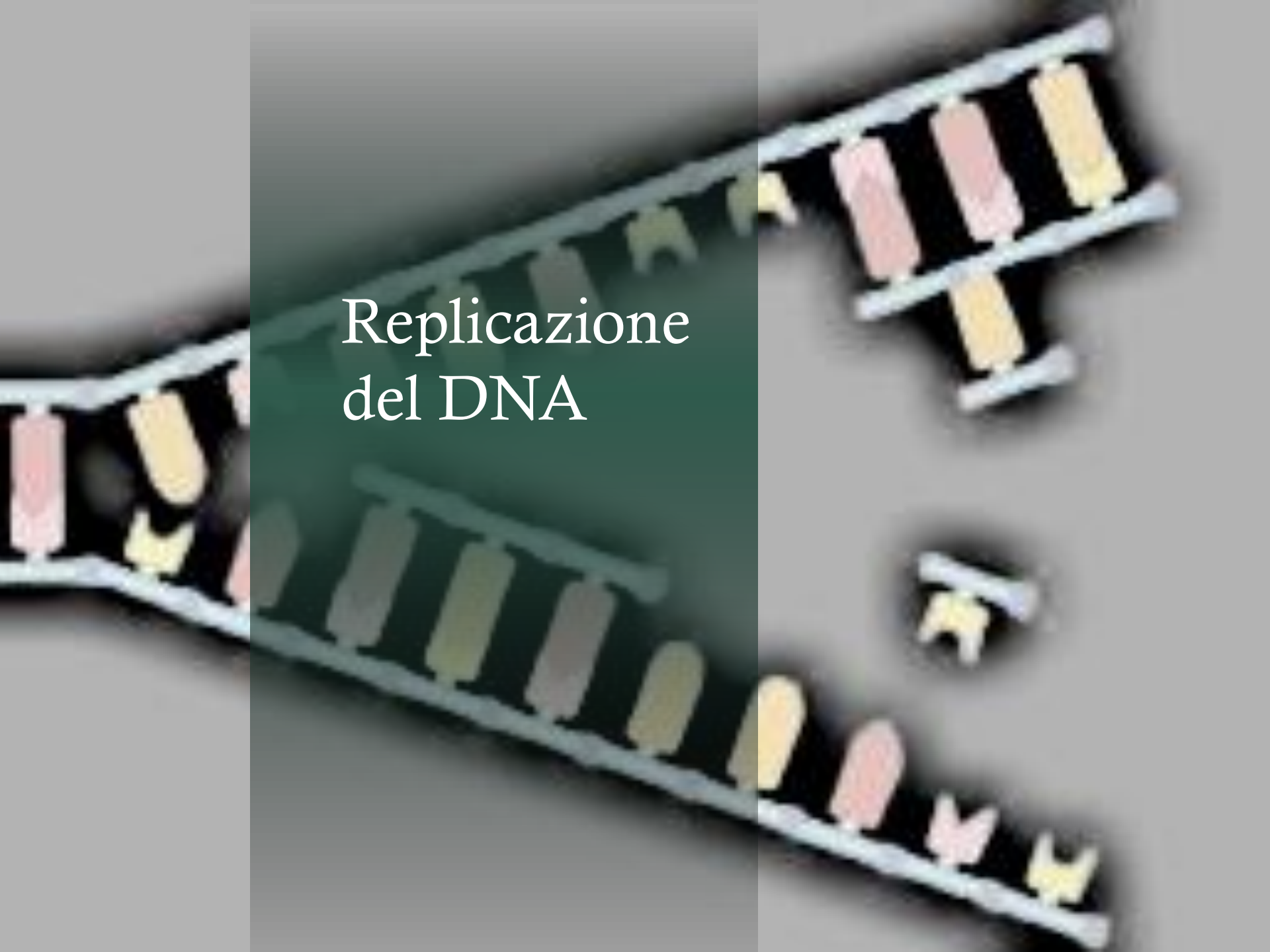


Replicazione del DNA



Replicazione del DNA



Processo biologico per il quale si formano
2 molecole di DNA identiche ad un'altra molecola
madre di DNA originale

Come avviene?

Replicazione del DNA

- La complementarità della doppia elica del DNA portò a ipotizzare che un filamento servisse da stampo per la sua replicazione.
- Si ipotizzarono 3 diversi meccanismi di replicazione del DNA:

1. Replicazione semiconservativa:

Questa ipotesi prevedeva che i 2 filamenti si separassero durante la replicazione

2. Replicazione conservativa

Questa ipotesi non prevede la separazione della doppia elica nei singoli filamenti, ma sarebbe la intera doppia elica che servirebbe da stampo dando luogo alla molecola figlia uguale a la molecola madre

3. Replicazione di tipo dispersivo

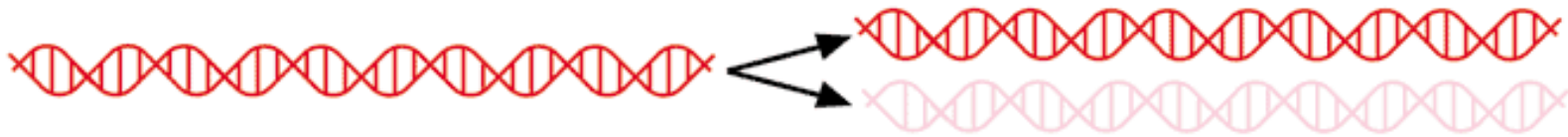
Durante la replicazione il DNA viene frammentato e nelle molecole figlie coesisterebbero tratti di DNA parentale e neosintetizzati

Replicazione del DNA

Three postulated methods of DNA Replication



Semi-Conservative



Conservative*



Dispersive*



Newly, synthesized strand

Original template strand

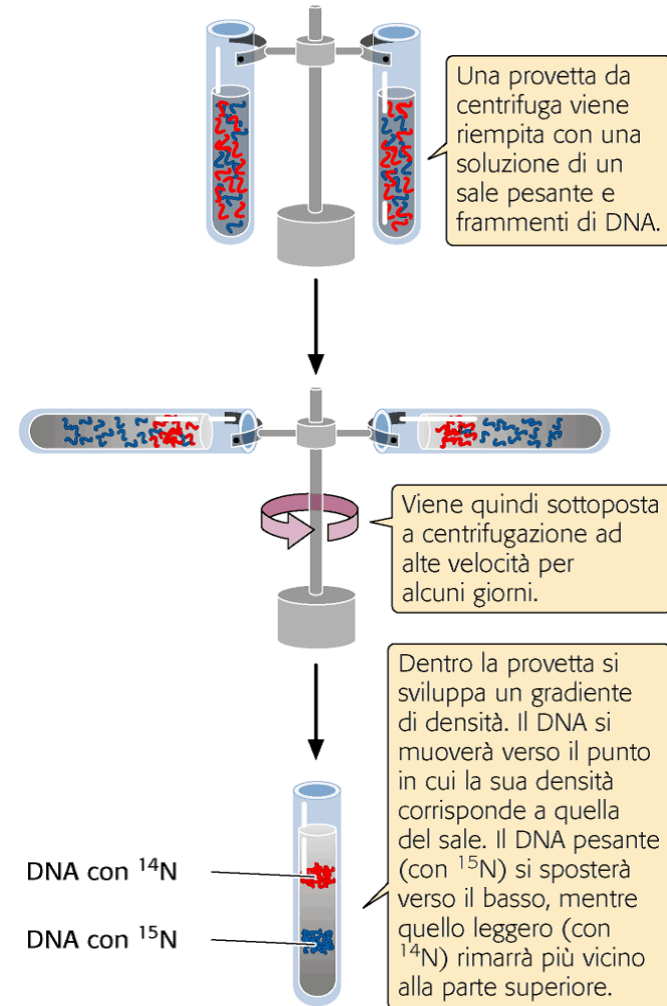
* not found to be
biologically significant

Esperimento di Meselson e Stahl

Gradiente in CsCl

Il **cloruro di Cesio** è un composto chimico che quando si centrifuga distribuisce gli ioni cesio e cloruro verso il fondo della provetta formando un gradiente con la concentrazione più elevata verso il fondo.

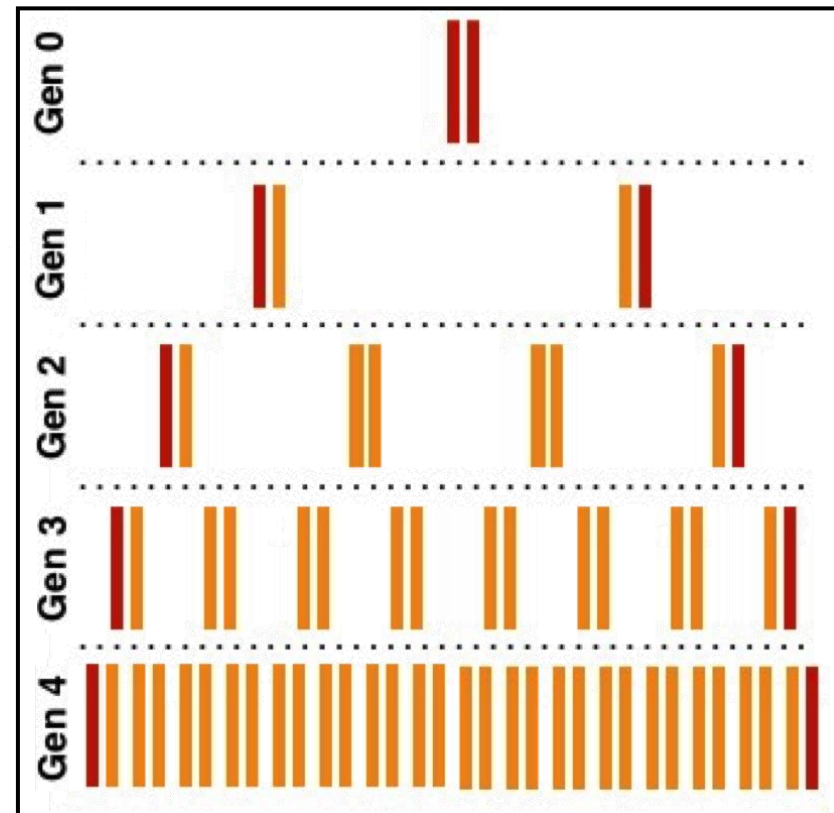
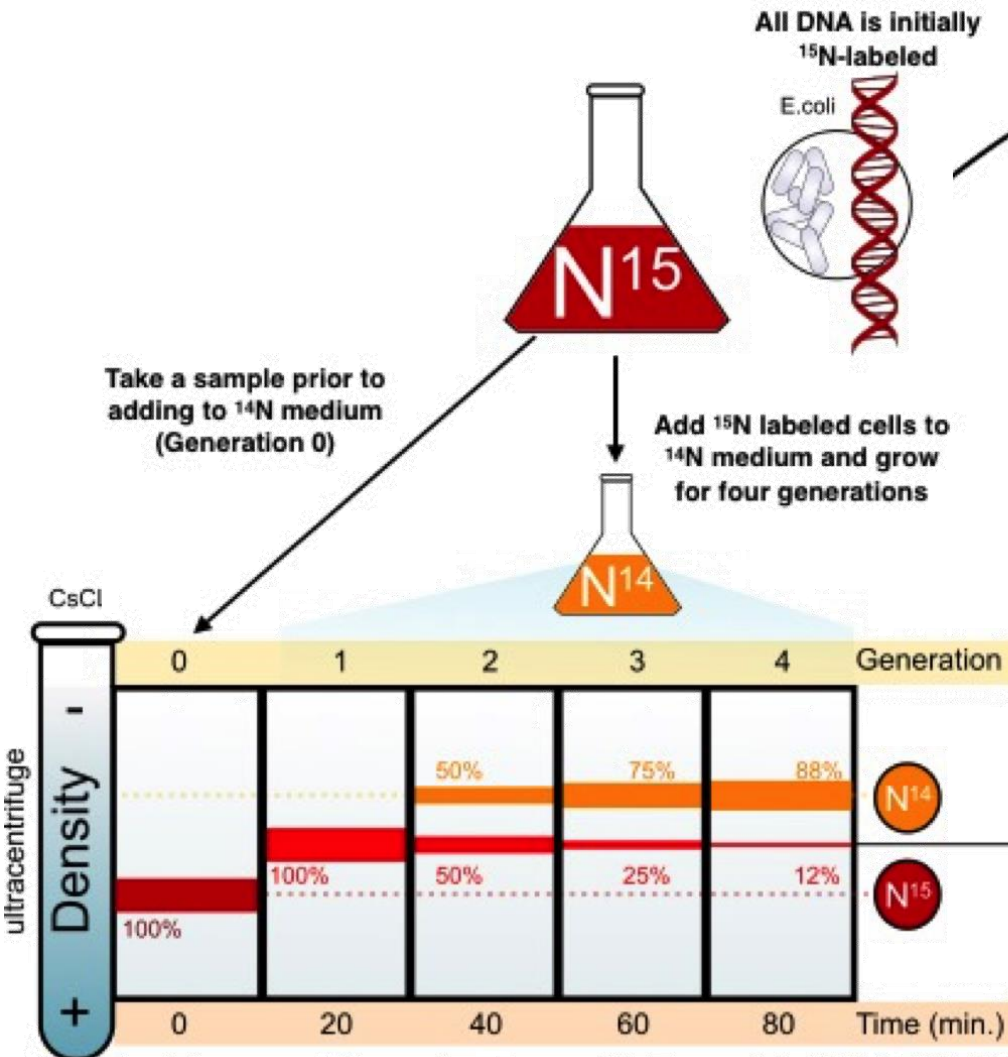
Se c'è del DNA in soluzione anche questo viene spinto verso il fondo finché trova l'equilibrio di densità o **densità di galleggiamento**, a partire dalla quale si può ricavare la composizione di basi del DNA



Esperimento di Meselson e Stahl

Dimostrano che la replicazione avviene in modo **semiconservativo**

<https://www.youtube.com/watch?v=oQp7VIWpzNw>





Dove inizia la
replicazione?

Replicazione del DNA: Modello del replicone

F. Jacob, S. Brenner e F. Cuzin (1963)

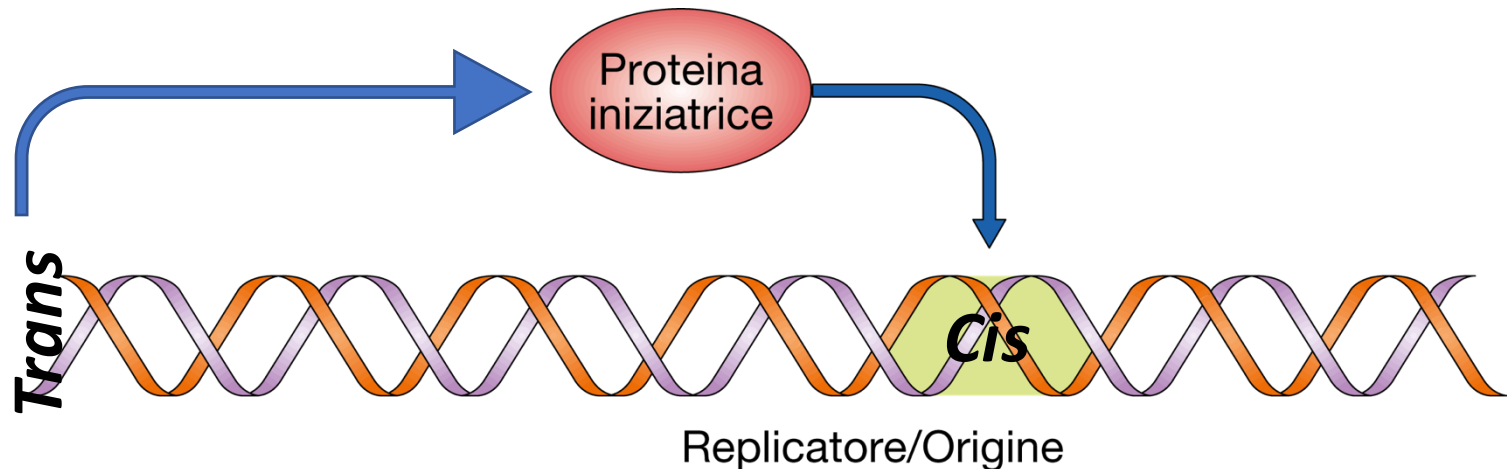
Il modello del replicone postula che:

1. L'inizio della replicazione è geneticamente controllato da sequenze specifiche ***in Cis*** sul DNA
2. Queste sequenze indicano dove può partire la replicazione dopo l'interazione con specifiche proteine o **iniziatori *in trans***



Fla

- Elementi in ***Cis*** si trovano nello stesso filamento del DNA, in questo caso potrebbe essere il punto dove inizia la replicazione u Origine di replicazione. (Cis=vicino)
- Elementi ***in Trans*** sono fattori che codificati in regioni più lontane nel genoma. Possono essere proteine regolatrici della replicazione che agiscono sul origine della replicazione (regione in Cis)



Esperimento di John Cairns

Importante perché ispirò l'ipotesi del modello del replicone allo stesso tempo che confermava la replicazione semiconservativa

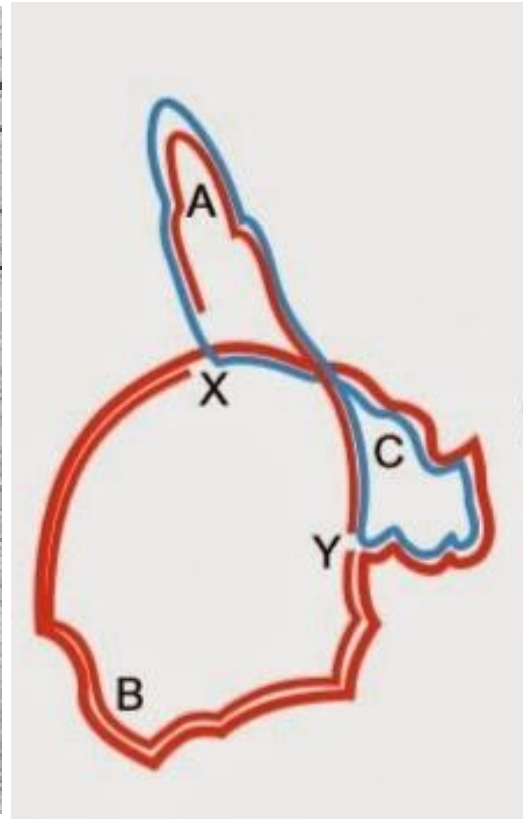
Studia la geometria del cromosoma durante la replicazione mediante l'incorporazione di radioattività e autoradiografia.

Cresce batteri (*E.coli*) con DNA circolare chiuso in un **mezzo contenente $[^3\text{H}]$ -Timidina** che si incorporerà al DNA in replicazione.

A diversi tempi J.Cairns lisò le cellule in modo di non rompere i cromosomi. Raccolse i cromosomi su un filtro che appoggiava su un vetrino coperto da una emulsione sensibile alle radiazioni emesse dalla $[^3\text{H}]$ -Timidina (incorporata al DNA). Il risultato era una autoradiografia del cromosoma



Esperimento di John Cairns



In questo esperimento le cellule sono cresciute in mezzo con $[^3\text{H}]$ -Timidina una generazione e mezza

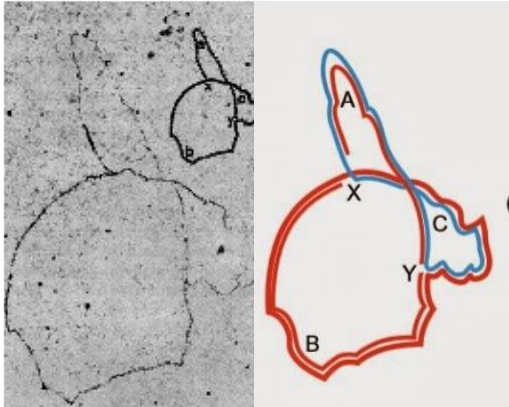
- La molecola rimane integra formando una struttura θ teta.

- Si vedono 3 anse **A**, **B** e **C**.

L'ansa **B** contiene più radioattività (più granuli di argento sulla lastra fotografica, rosso nel disegno) che le altre 2 anse, indicando che ha replicato 2 volte.

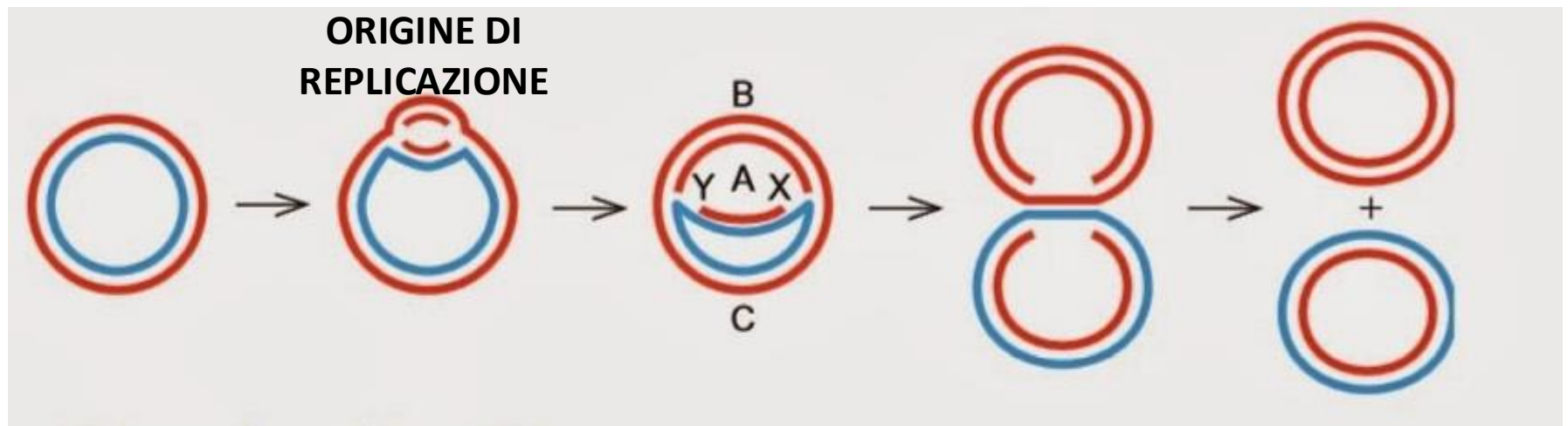
Le anse **A** e **C** presentano meno granuli radioattivi (circa la metà), indicando la presenza di un filamento marcato (rosso) e l'altro no (azzurro.)

Origine di Replicazione

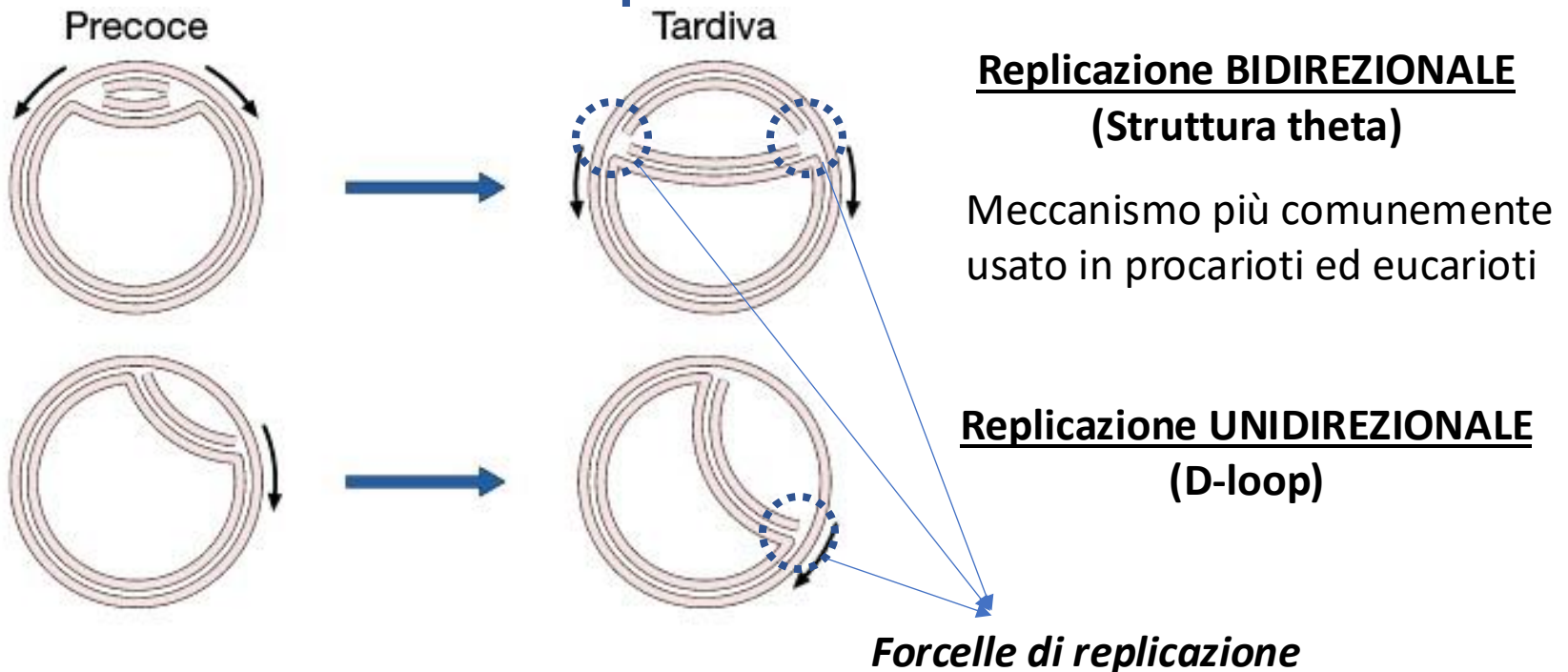


Questo esperimento portò a ipotizzare che la replicazione comincia in un punto (sequenza) che oggi viene chiamato **ORIGINE DI REPLICAZIONE**

ORIGINE DI REPLICAZIONE: particolare sequenza di DNA da cui parte il processo replicativo.

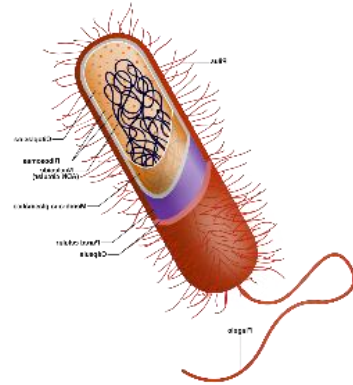


Replicazione dal Origine di Replicazione



Identificazione delle Origini di

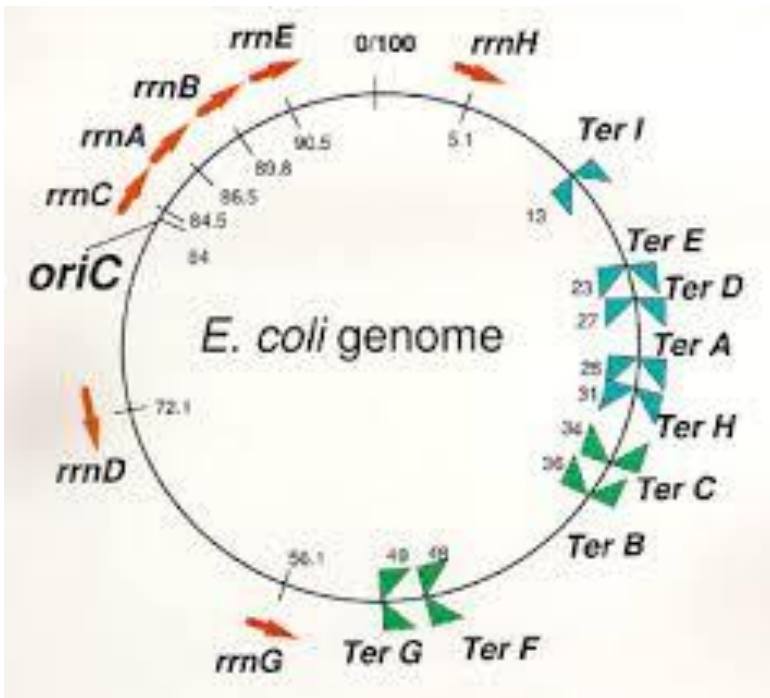
Procarioti : *Escherichia coli*
DNA circolare doppia elica: 4.2Mpb



Il cromosoma di *E. coli* contiene un unico origine di replicazione: ***OriC***

Caratteristiche del *OriC* :

- Ha una dimensione minima di 245 pb,
- è molto ricco in A e T: questa è una caratteristica comune di tutti gli origini di replicazione già che queste regioni devono potere aprirsi. Le coppie A-T richiedono meno energia per denaturarsi che le G-C
- contiene 4 ripetizioni di 9pb e 3 ripetizioni di 13pb, molto simili tra di loro: Le regioni ripetute in frammenti di DNA associati a funzione si chiamano **BOX**, e si assume che siano riconosciute da proteine specifiche.



E. coli ha un unico *OriC* → 4.2Mbp → Replica in 40 min: 60000pb/min per forcella

Identificazione delle Origini di Replicazione

Eucarioti

Cellule embrionali --→ Blastula ---→ Embrione

Non esistono siti
specifici d'inizio
della replicazione

Esistono origini di
replicazione
specifici

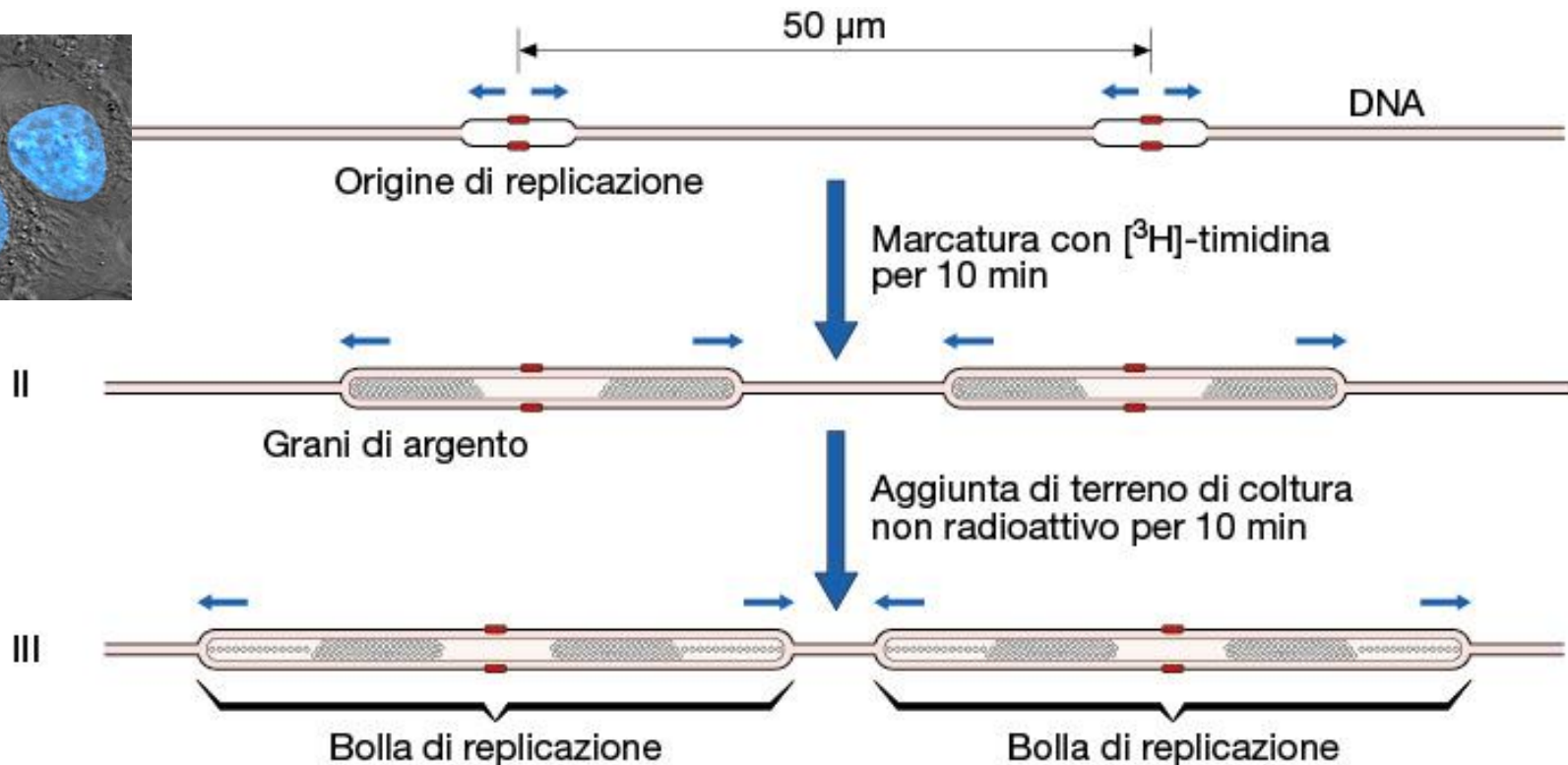
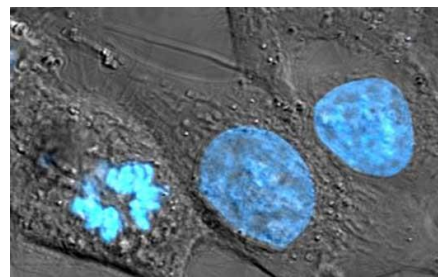
IN EUCARIOTI esistono da 10-30000 origini di replicazione

Esperimenti di Joel A. Huberman & Arthur Riggs

Identificazione delle Origini di Eucarioti Replicazione

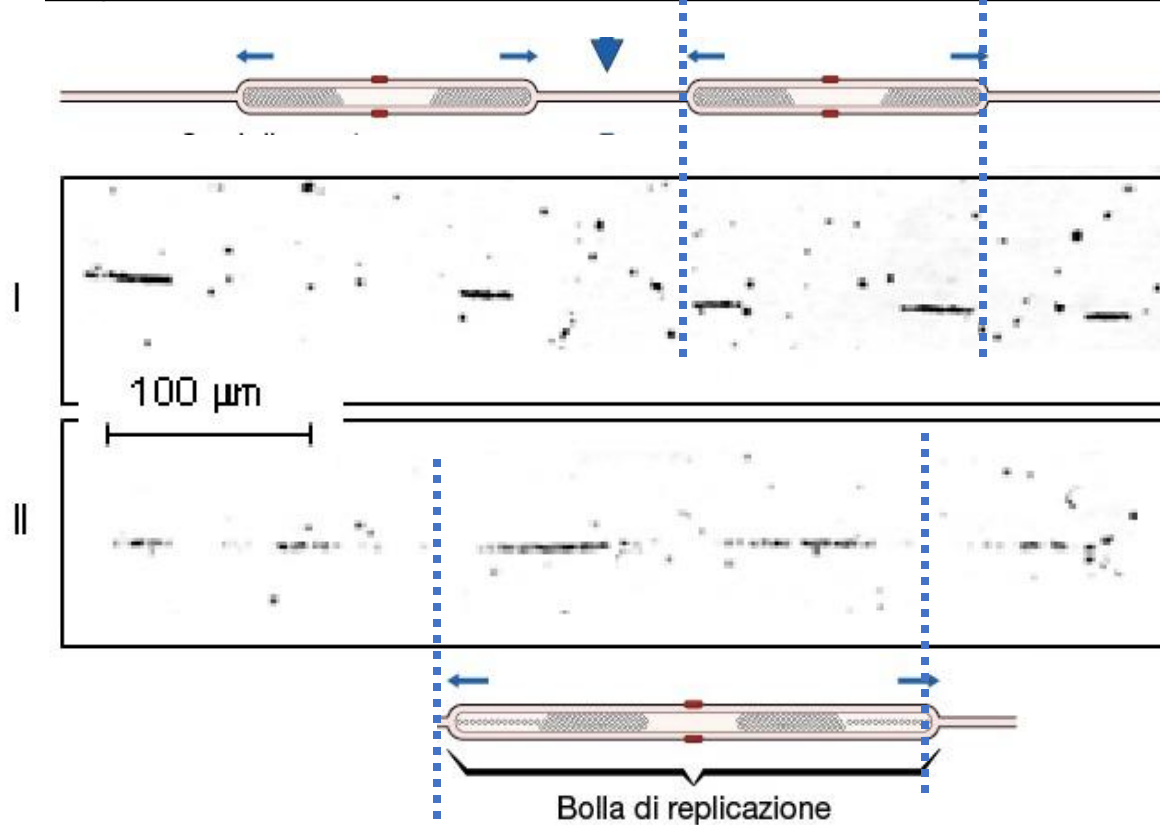
Esperimenti di Joel A. Huberman & Arthur Riggs

Incorporazione di radioattività in cellule umane in coltura non sincronizzate dove la replicazione è già iniziata al momento che comincia la marcatura



Identificazione delle Origini di Eucarioti

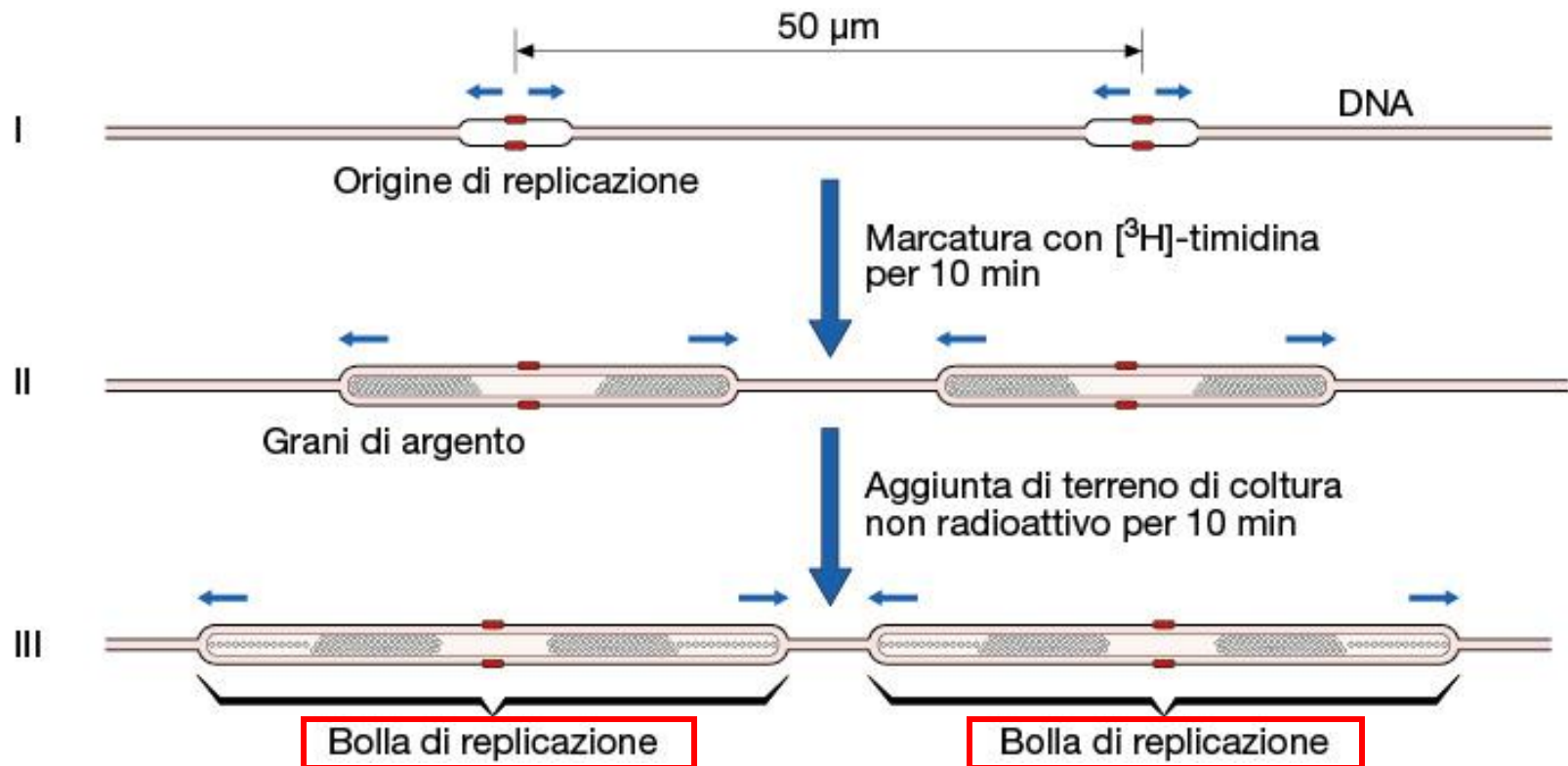
Esperimenti di Joel A. Huberman & Arthur Riggs



Identificazione delle Origini di Eucarioti Replicazione

Esperimenti di Joel A. Huberman & Arthur Riggs

In questo particolare esperimento si può vedere che ci sono 2 origini di replicazione e che la replicazione procede in modo bidirezionale



Identificazione delle Origini di Eucarioti Replicazione



- In questo tratto di cromatina si osserva la presenza di 4 bolle di replicazione.
- La differente dimensione indica che alcune hanno iniziato la replicazione prima
- Se definisce la esistenza di **origini «precoci» e «tardive»**, e le forcine di replicazione che partono da ogni OR possono alla fine fondersi quando si incontrano
- Ogni origine di replicazione dà luogo ad un **replicone**

Eucarioti: 10-30000 repliconi; ogni replicone è lungo 40-100kpb

Velocità di replicazione: 500-3500 pb / min (a seconda della specie)

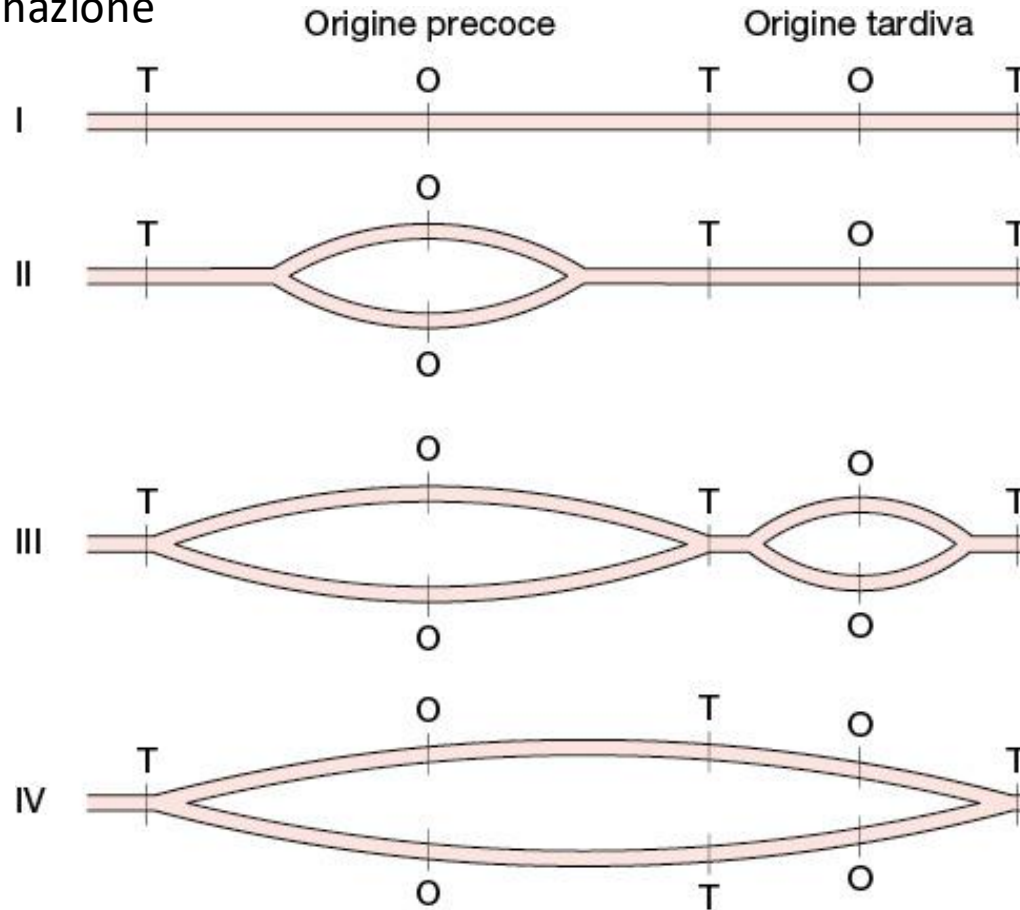
Nel uomo si stima ci siano intorno a 10000 origine di replicazione (non tutti attivi sempre)

Origini di Replicazione

«precoci» e «tardivi»

O: origine di replicazione

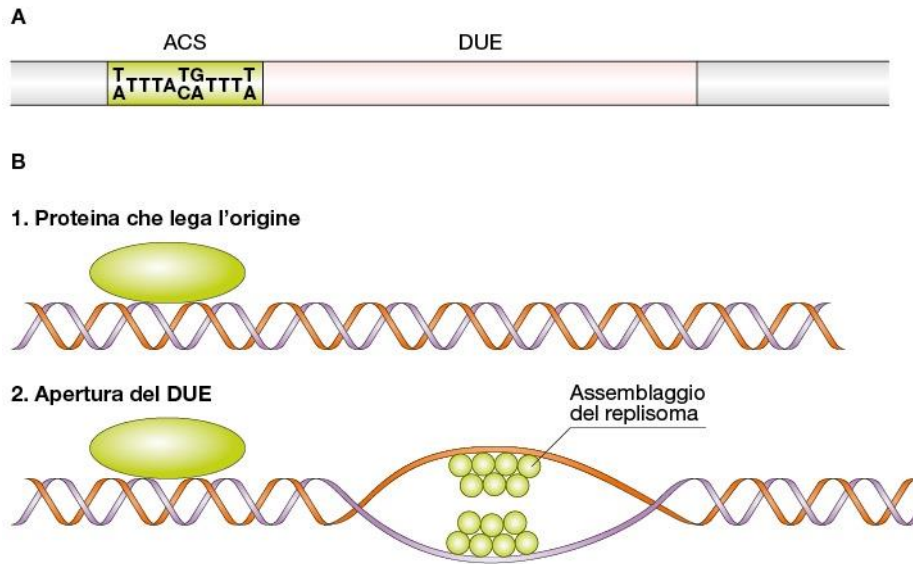
T: punto di terminazione



Regolazione dell'asimmetrica attivazione temporale delle Ori

Saccharomyces cerevisiae: 13.5 Mbp, 16 cromosomi lineari con diversi Ori

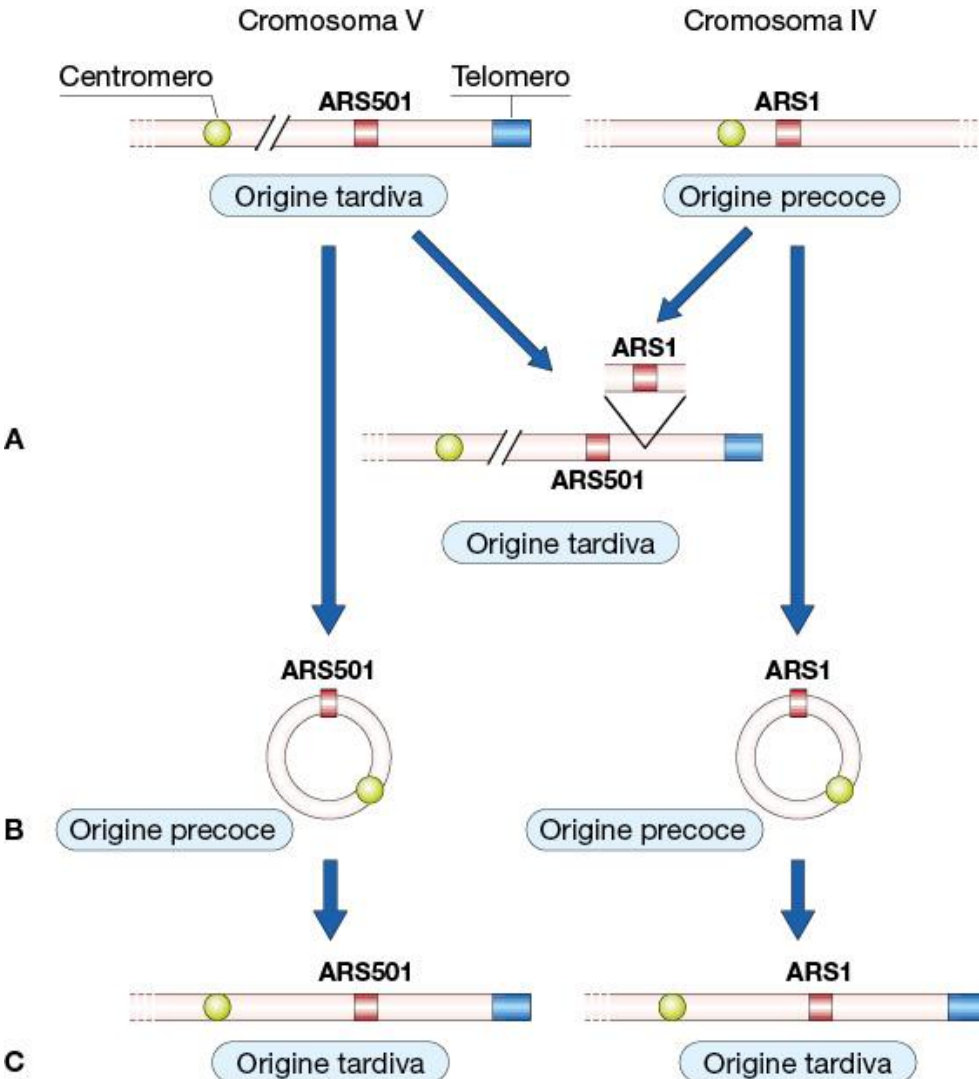
Le Ori di *S. cerevisiae* si chiamano **ARS (Autonomously Replicating Sequences)**, ed esiste uno ogni 40 kpb con un totale di 350 ARS



- ARS di lievito contengono almeno 1 «**ARS consensus sequence**» o **ACS** caratterizzata da una sequenza nucleotidica conservata ricca in A-T. Singole mutazioni puntuali all'interno delle ACS causano la perdita funzionale delle ARS.
- Le **sequenze DUE (DNA unwinding elements)** si trovano vicini alle ACS e anche questi hanno delle sequenze ricche in A-T

L'inizio della replicazione avviene con l'interazione di una proteina alle ACS, successiva apertura delle DUE ed assemblaggio del macchinario utile per la replicazione o REPLISOMA

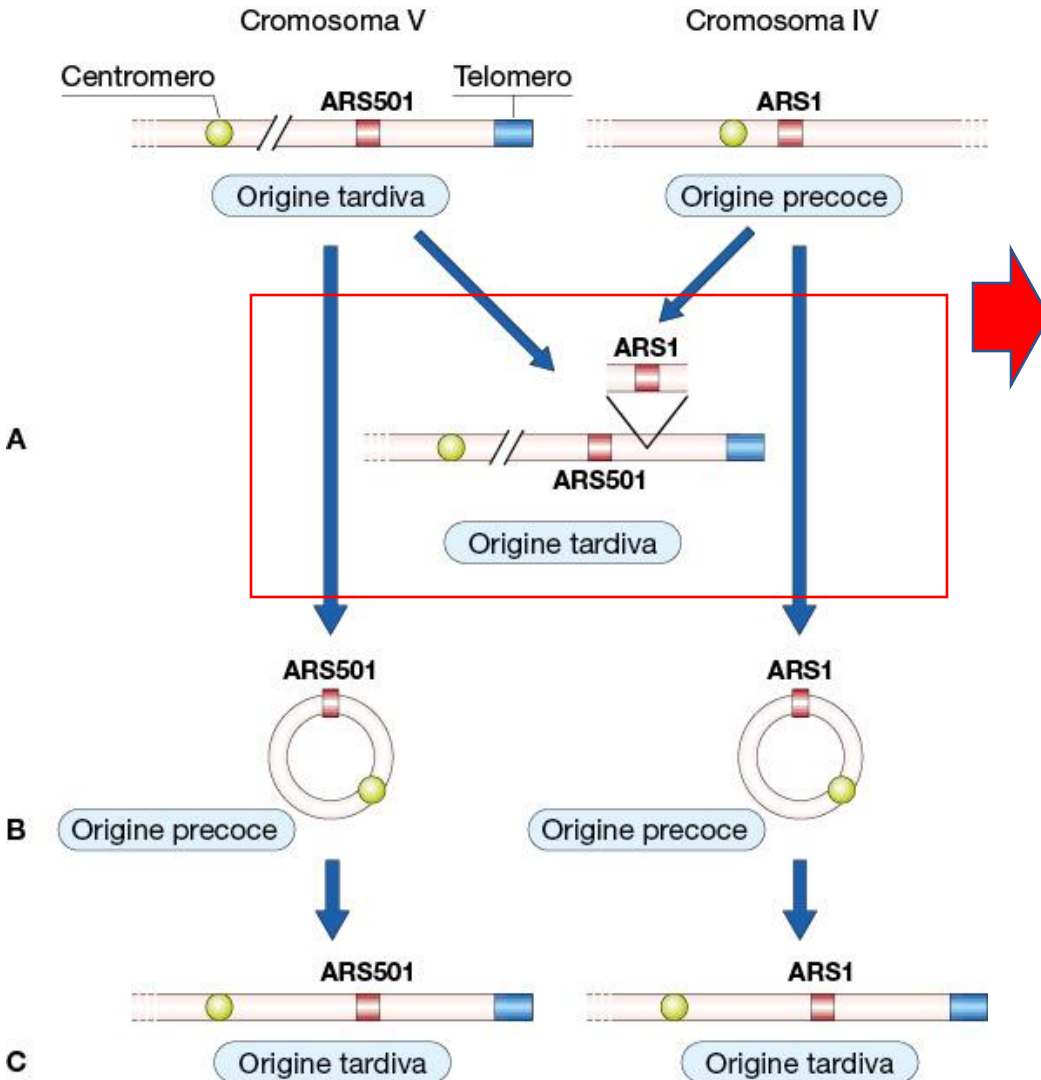
Regolazione dell'asimmetrica attivazione temporale delle Ori



La replicazione tardiva o precoce delle ARS dipende da:

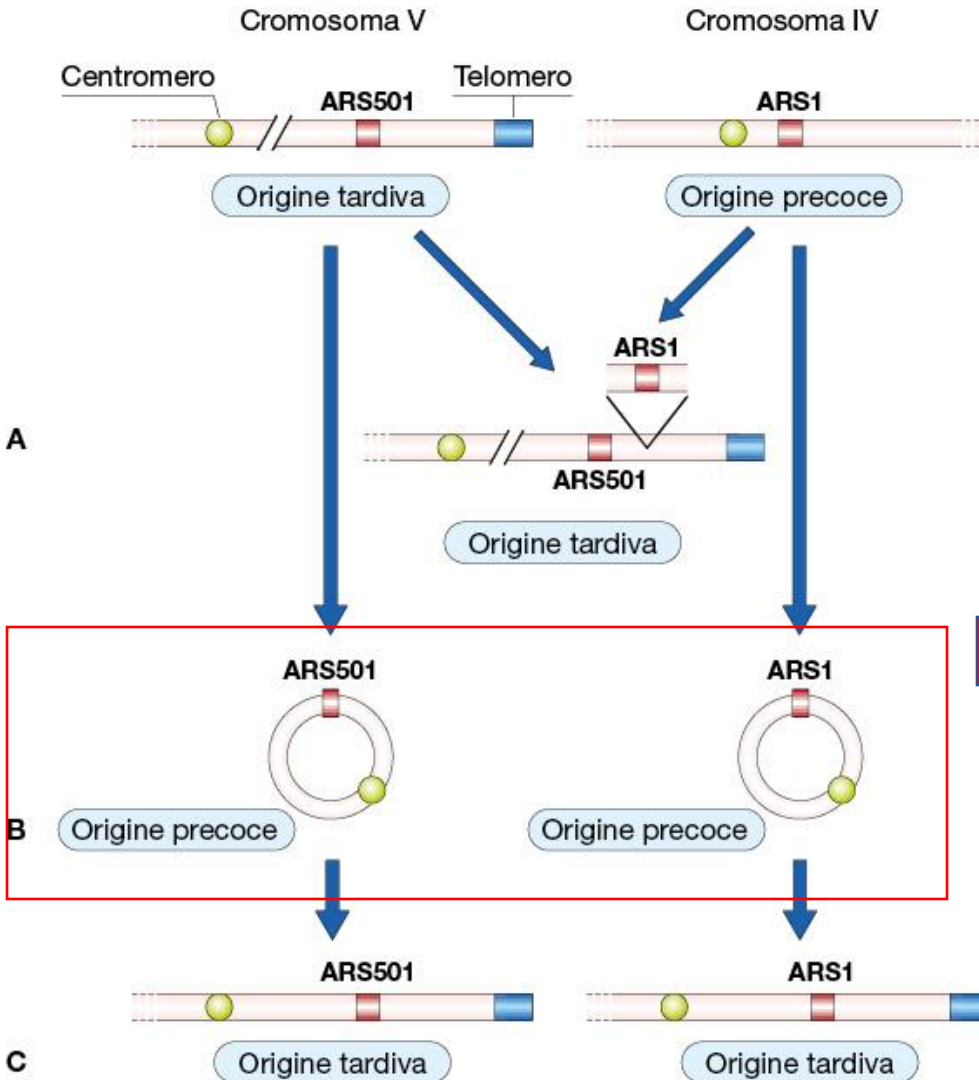
1. Geni che regolano il ciclo cellulare
2. La struttura della cromatina

Regolazione dell'asimmetrica attivazione temporale delle Ori



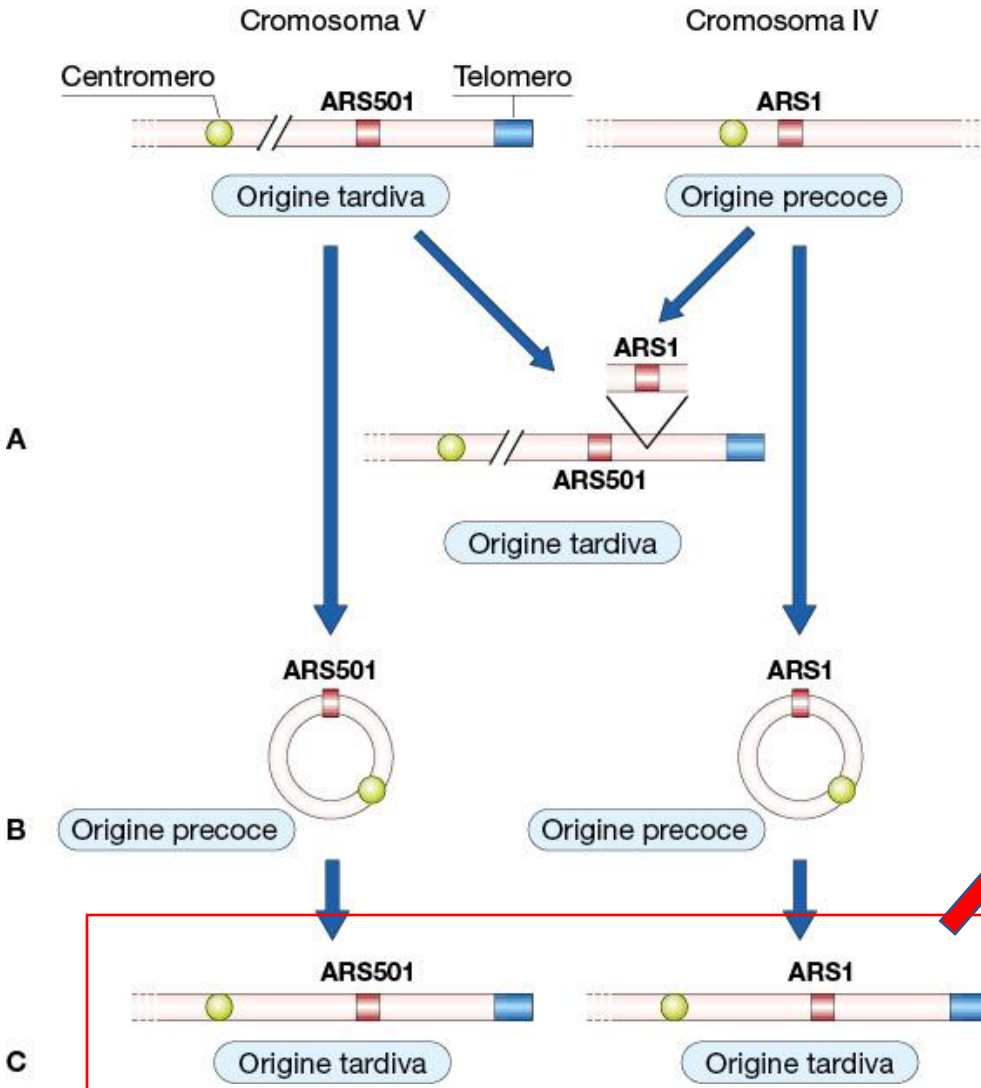
Se l'origine precoce si sposta vicino a una regione telomerica, lo stesso ARS diventa tardivo, suggerendo che il controllo temporale sull'accensione di un ARS non dipende dalla sequenza di questa, ma dal contesto cromosomico in cui si trova

Regolazione dell'asimmetrica attivazione temporale delle Ori



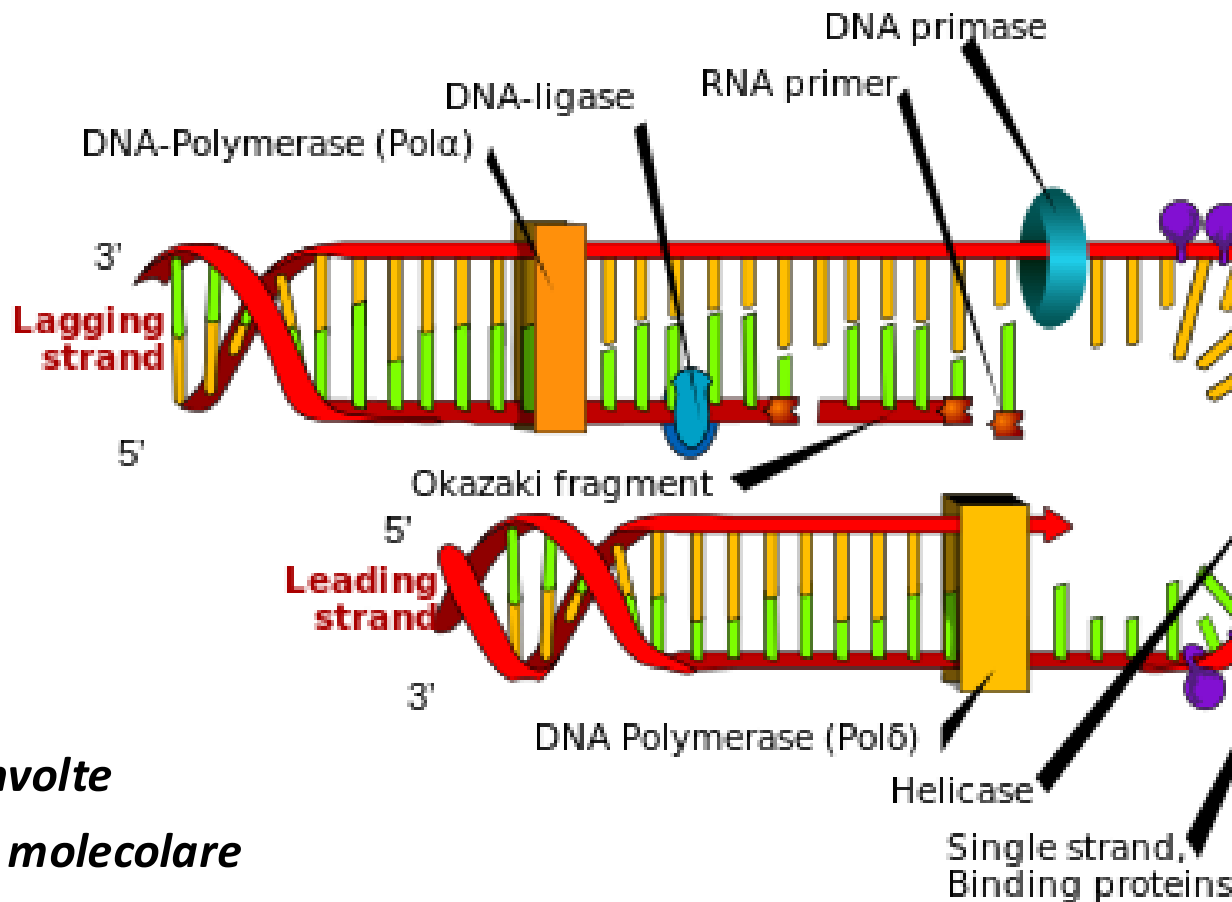
Se le ARS (tardivo o precoce) sono spostati su un plasmide tutti e due si comportano come precoci.

Regolazione dell'asimmetrica attivazione temporale delle Ori



Se i plasmidi contenenti le ARS (tardivo o precoce) sono linearizzati e aggiunte sequenze telomeriche alla fine le ARS diventano tutte e due tardive

Il controllo temporale sull'accensione
di un origine di replicazione
non dipende della sequenza nucleotidica
di una origine *per se*, ma
dal contesto cromosomico in cui essa si trova

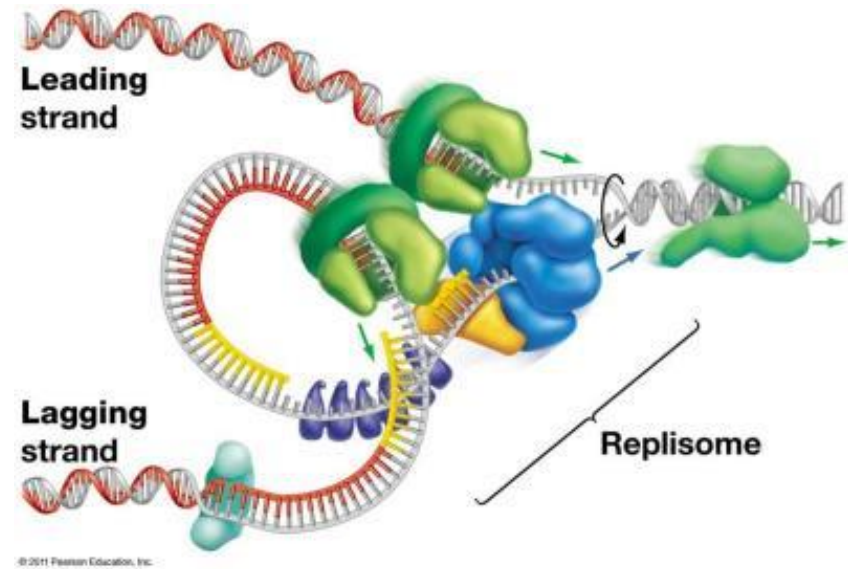


- **Regolazione**
- **Proteine coinvolte**
- **Meccanismo molecolare**

Replicazione nei Procarioti

Procarioti

L'identificazione delle proteine e fattori implicati nella replicazione è risultata molto complicata dovuto al fatto che la replicazione è un processo complesso che richiede l'azione coordinata nel tempo di molteplici proteine.



L'insieme di proteine che compongono la macchina replicativa si chiama **REPLISOMA**

Il replisoma è molto instabile e non si riesce ad isolare l'insieme dei suoi componenti. Questo comporta che per identificare e studiare il loro ruolo nella replicazione bisogna partire dai singoli componenti per assemblarli successivamente

Lo studio del replisoma diventa ancora più complicato nel momento che le proteine replisomiche si trovano a bassissima concentrazione nella cellula

Fondamentale l'uso di **organismi modello: *E.coli***

Procarioti:

Mutanti termosensibili (ts) di *E.coli*

Mutazioni in proteine chiave nel processo replicativo comportano la morte della cellula, per questo motivo non possono essere usate per identificare i componenti del replisoma.

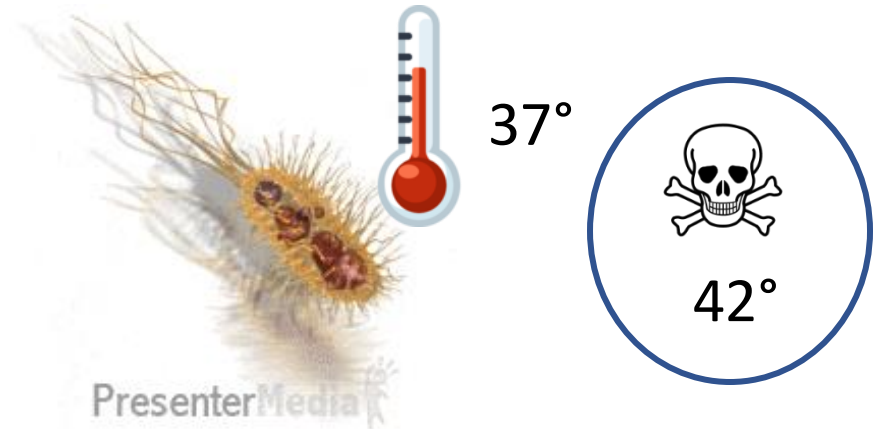
Invece, possono essere usati **mutanti letali-condizionali** che in condizioni permissive non sono letali, ma si possono studiare se le stesse cellule vengono messe in condizioni restrittive.

Per *E.coli*, queste condizioni possono essere regolate dalla temperatura: **mutanti termo-sensibili (ts)**

Ceppo selvatico o wild type (wt)



Ceppi mutanti termo-sensibili ts



Procarioti: Mutanti termosensibili (ts) di *E.coli*

A Isolamento di mutanti temperatura-sensibili

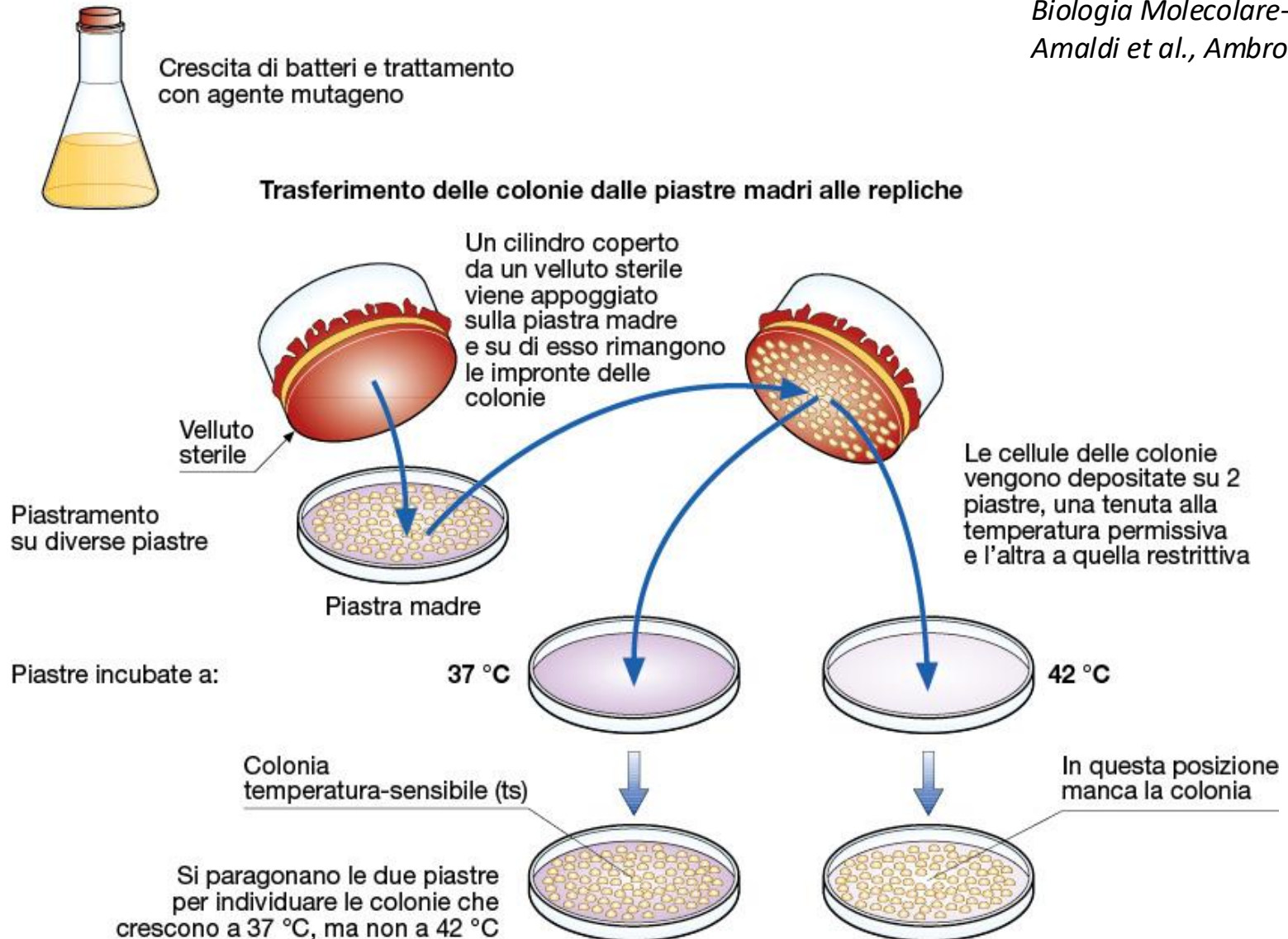
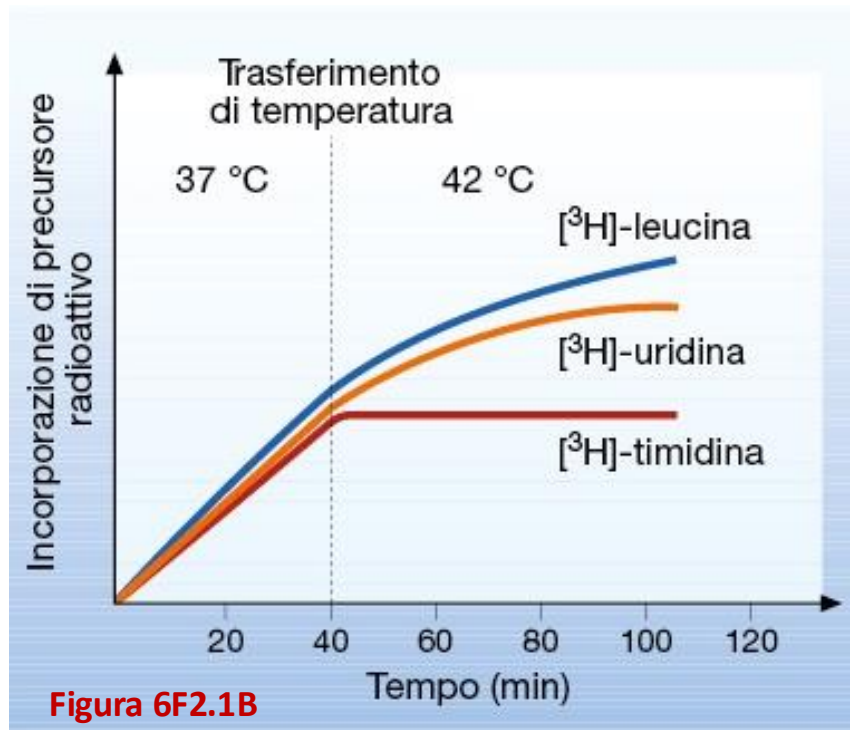


Figura 6F2.1A

Biologia Molecolare-2° ed.
Amaldi et al., Ambrosiana

Procarioti: Mutanti termosensibili (ts) di *E.coli* per proteine implicate nella replicazione

Il mutante ts identificato potrebbe contenere delle mutazioni in proteine implicate in diversi processi fondamentali per la cellula, quali la biosintesi di macromolecole :DNA, RNA o proteine.



Per identificare il processo alterato colture indipendenti di batteri wt e ts vengono fatte **crescere a 37°C (permissiva)** in presenza di uno dei precursori:

3H-Timidina per il DNA

3H- Uridina per il RNA

3H-leucina per le proteine



Le cellule sono **trasferite a 42°C (restrittiva)**

Lo studio della incorporazione della radioattività nel tempo per ogni una delle molecole precursore ci indica quale processo è alterato: **Sintesi del DNA**

Procarioti: Mutanti termosensibili (ts) di *E.coli* per proteine implicate nella replicazione

Per individuare la possibile funzione della proteina mutata nella sintesi del DNA si procede poi a guardare se avviene:

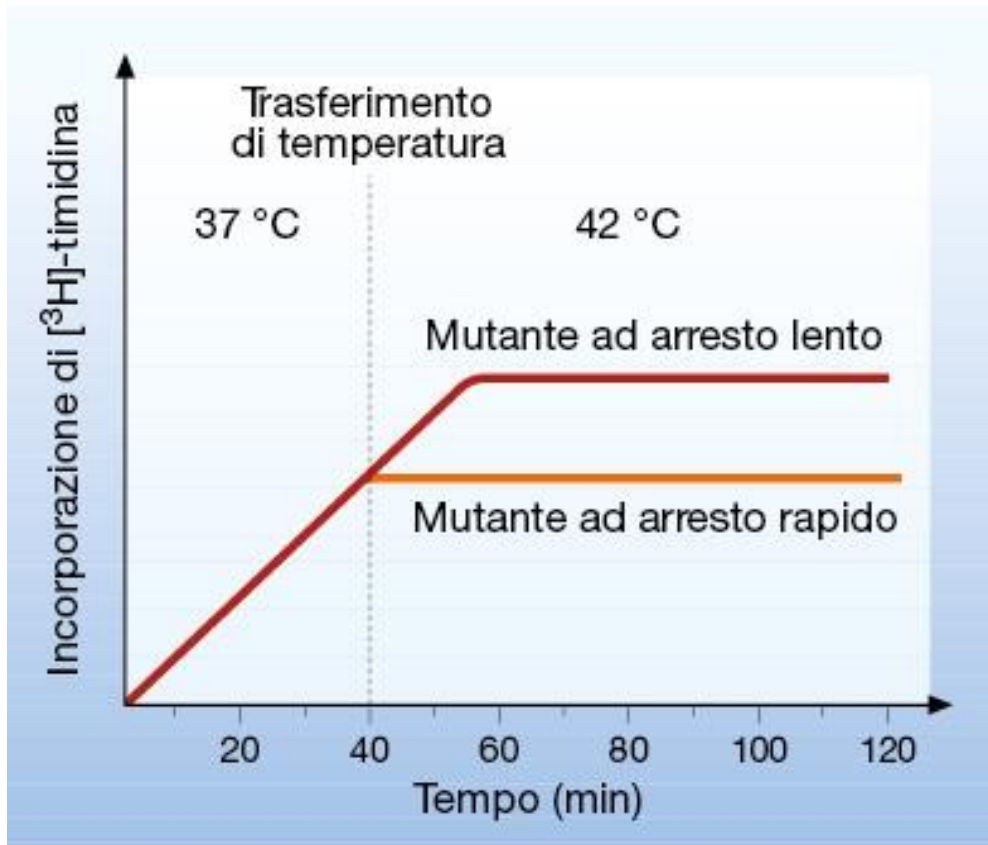
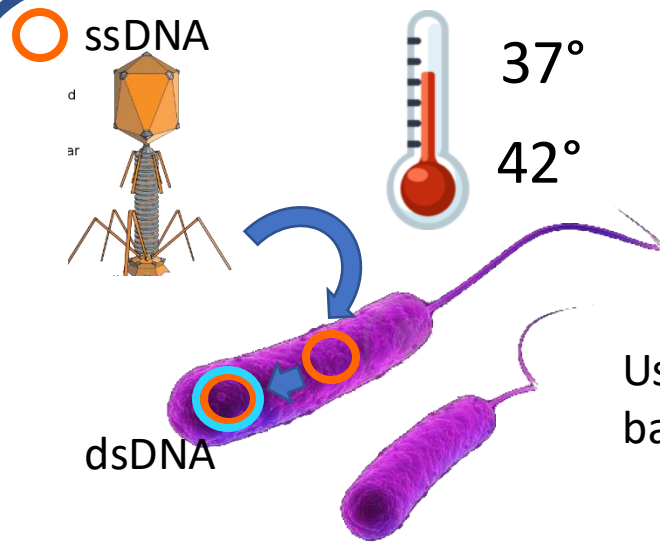


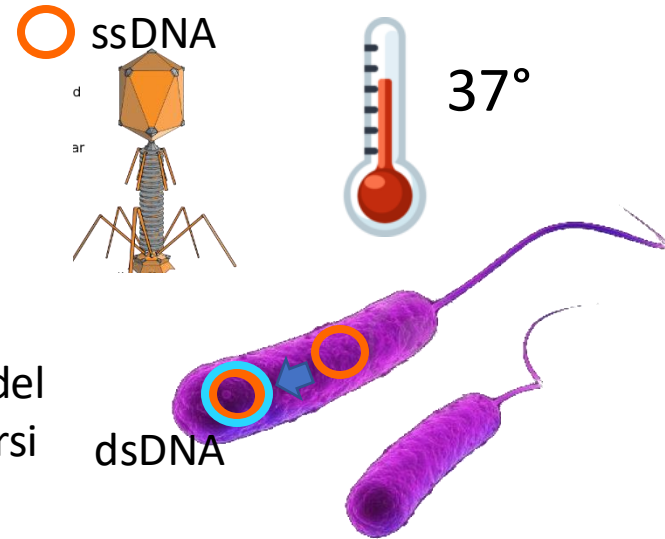
Figura 6F2.1C

- Un arresto immediato della incorporazione di 3H-Timidina : proteina implicata nell'allungamento della molecola
- Un arresto ritardato della incorporazione di 3H-Timidina: proteina implicata nell'inizio della replicazione

Esperimenti di complementazione mediante l'uso di Mutanti *ts*



In un **batterio wt**
questo avviene a 37°C e 42°C



In un **batterio mutante condizionale *ts***
questo avviene solo a 37°C

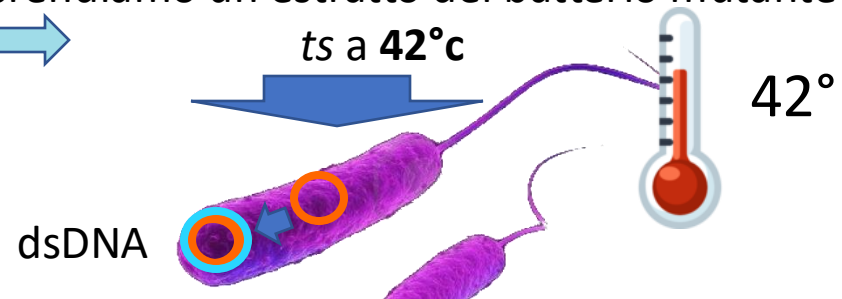
Estratto batteri wt

Complementazione *in vitro*

La espressione del gene selvatico (wt) **complementa** l'effetto di una mutazione nello stesso gene

Se prendiamo un estratto del batterio mutante

ts a 42°C



Procarioti: Proteine identificate mediante saggi di complementazione con Mutanti *ts*

Tabella 6.1 Elenco di alcuni geni e funzioni coinvolte nella replicazione del DNA in *Escherichia coli*.

Gene	Fenotipo del mutante <i>ts</i>	Funzione della proteina
DnaA	Arresto ritardato	Riconoscimento di <i>oriC</i>
DnaB	Arresto rapido/ritardato	DNA elicasi
DnaC	Arresto rapido/ritardato	Stimola la DNA elicasi
DnaG	Arresto rapido	DNA primasi
DnaE	Arresto rapido	Subunità α della DNA polimerasi III
DnaN	Arresto rapido	Subunità β della DNA polimerasi III
DnaQ	Mutatore	Subunità ϵ della DNA polimerasi III
Ssb	Arresto rapido, difetti di riparazione e ricombinazione	Proteina che lega il DNA a singolo filamento (ssDNA)
Lig	Accumulo di frammenti Okazaki	DNA ligasi

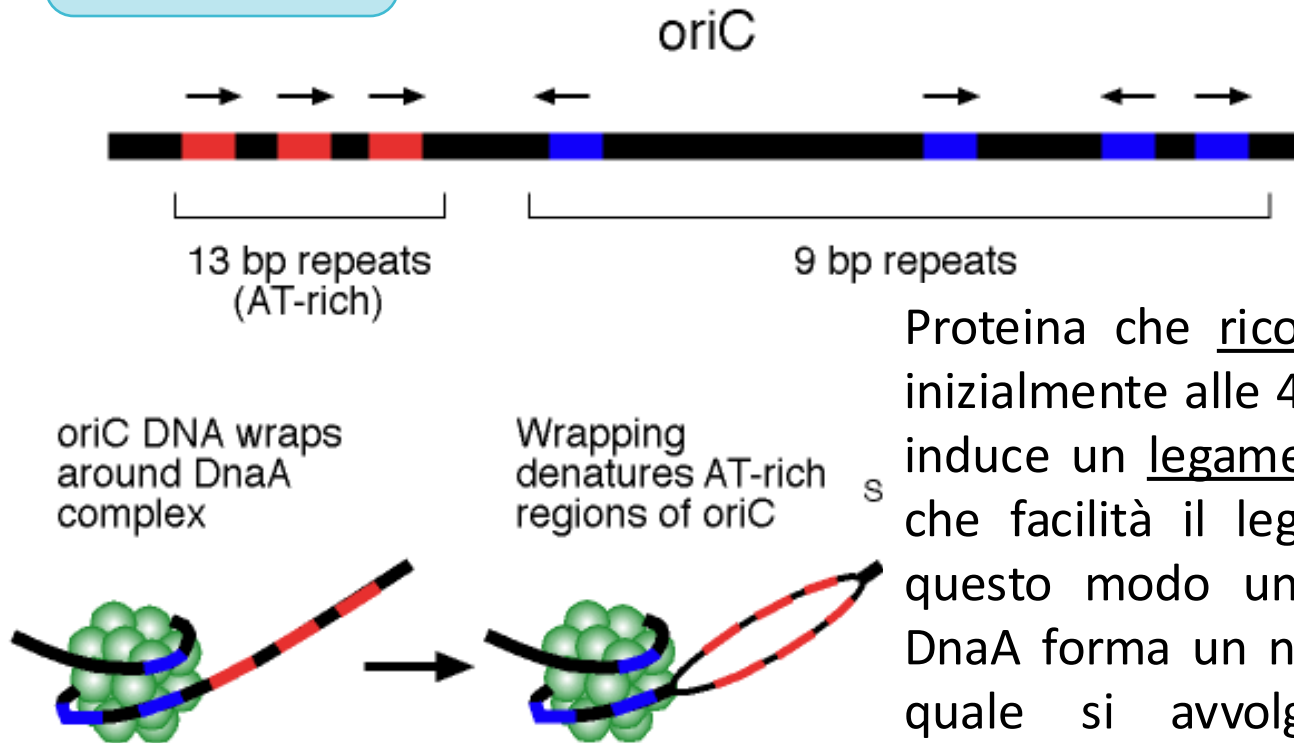
La terminologia DnaA, DnaB, DnaC ecc. è spesso usata per indicare le proteine codificate dai rispettivi geni. Le proteine sono alternativamente indicate in base alle loro funzioni biochimiche: DNA primasi, DNA polimerasi, SSB ecc.

Tabella 6.1

Procarioti:

Proteine identificate parte del Replisoma

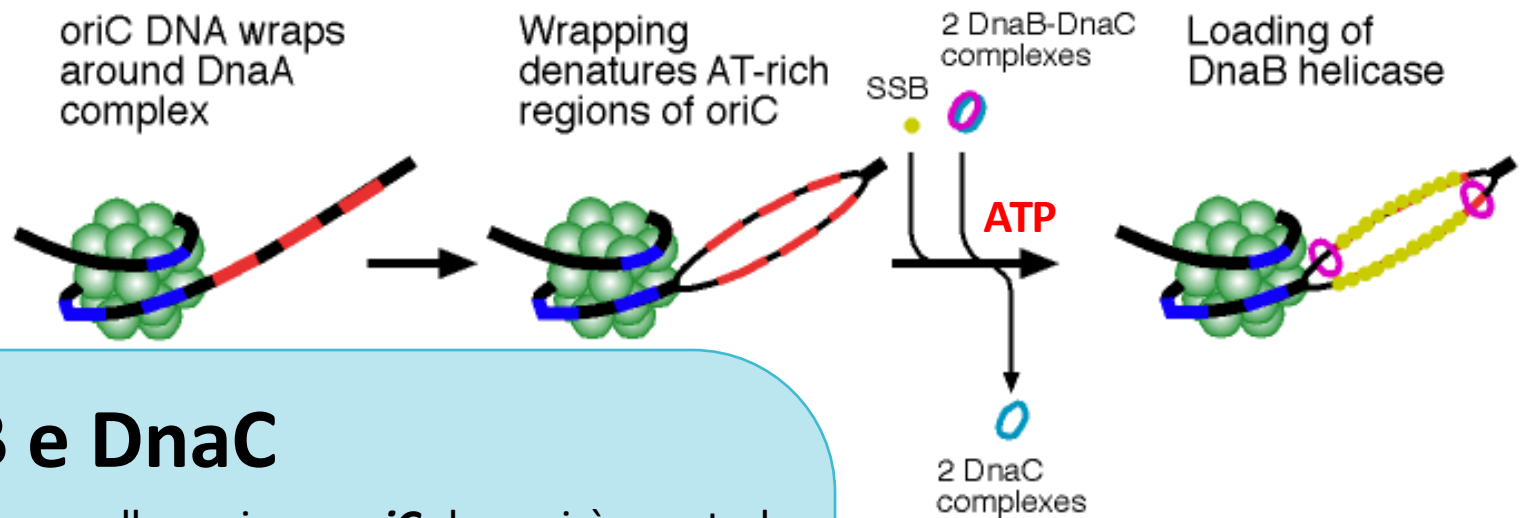
DnaA



Proteina che riconosce *oriC*, e si attacca inizialmente alle 4 ripetizioni di 9 pb. DnaA induce un legame cooperativo con il DNA che facilità il legame di altre DnaA . In questo modo un complesso di proteine DnaA forma un nucleo centrale intorno al quale si avvolge il DNA del *oriC*. Conseguenza dell'avvolgimento la regione con le 3 ripetizioni di 13pb si apre permettendo l'assemblaggio di altre proteine.

Procarioti:

Proteine identificate parte del Replisoma



DnaB e DnaC

Si incorporano alla regione **oriC** dove si è creata la «bolla» creando un complesso proteico chiamato **Complesso di pre-innesco** della sintesi di DNA.

DnaB forma un esamero stabilizzato da molecole di DnaC, che si posizionerà nelle forcelle di replicazione.

DnaB ha una funzione elicasi, separando i due filamenti in modo ATP dipendente.

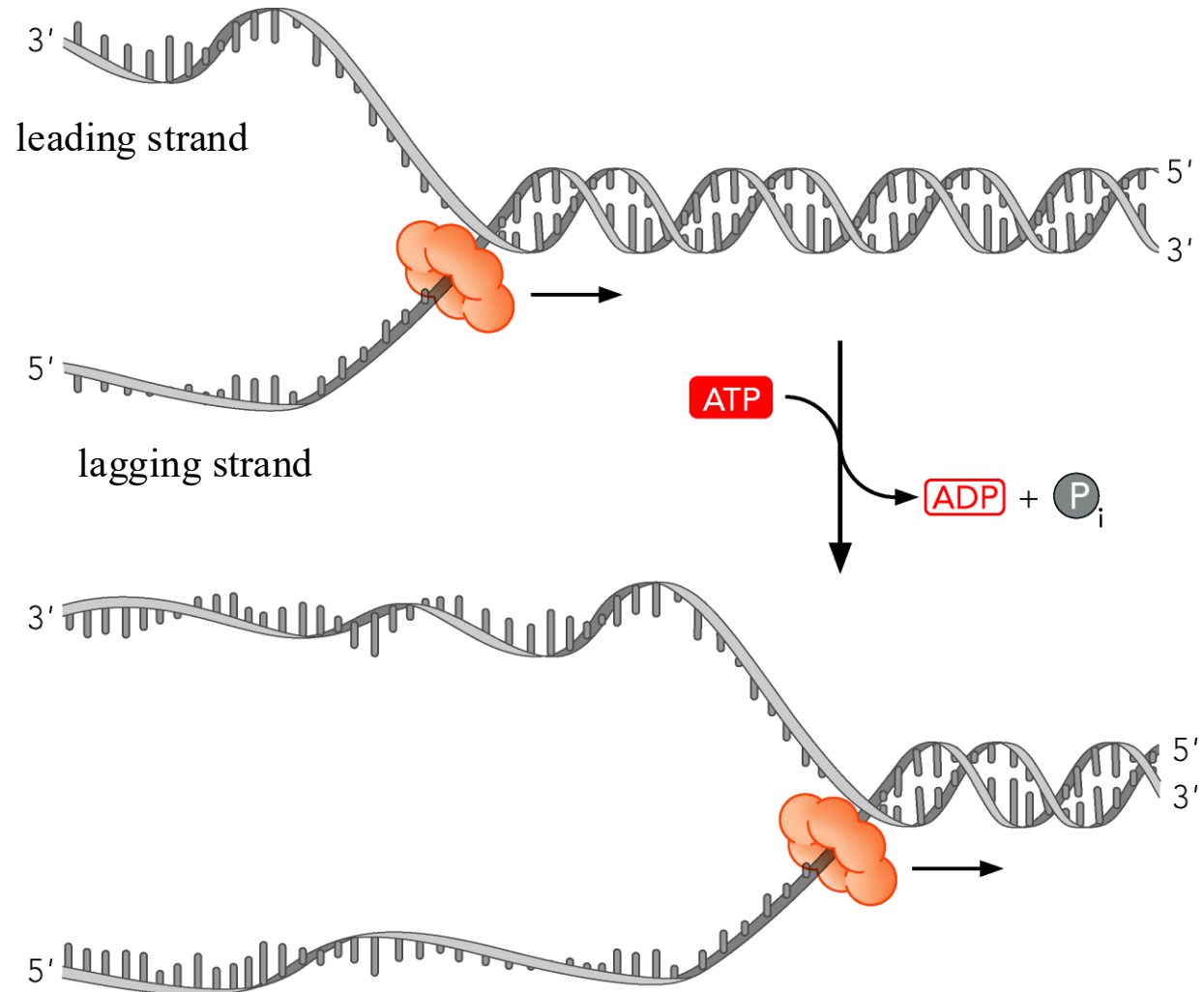
Come abbiamo già visto, la azione della elicasi porta ad alterazioni conformazionali del DNA che richiedono l'intervento delle topoisomerasi

SSB

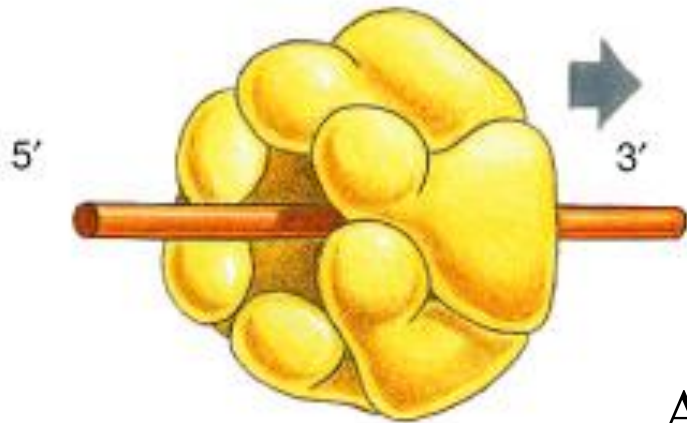
La bolla creata tende a renaturare e chiudersi. Per evitare questo, il singolo filamento all'interno della bolla si lega alla proteina SSB. Questo legame facilita il legame di un'altra molecola di SSB (Legame cooperativo)

La DNA elicasi apre la doppia elica davanti alla forza replicativa

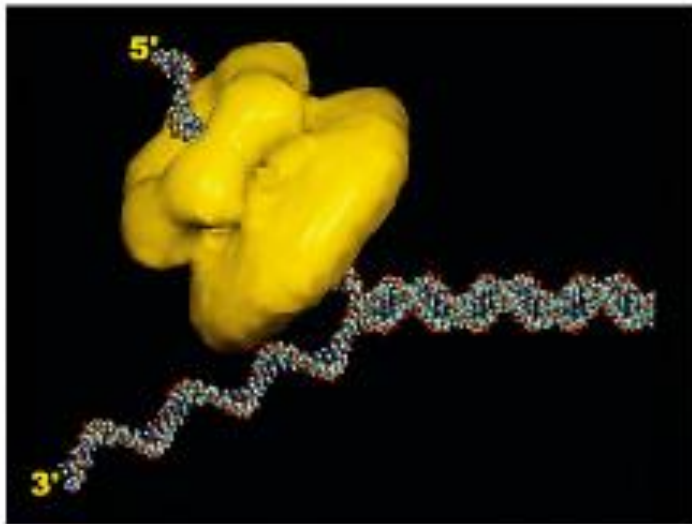
Catalizza l'idrolisi di
ATP $\rightarrow$ despiralizza il
DNA rompendo i
legami idrogeno tra le
coppie di basi



Le DNA elicasi procariotiche

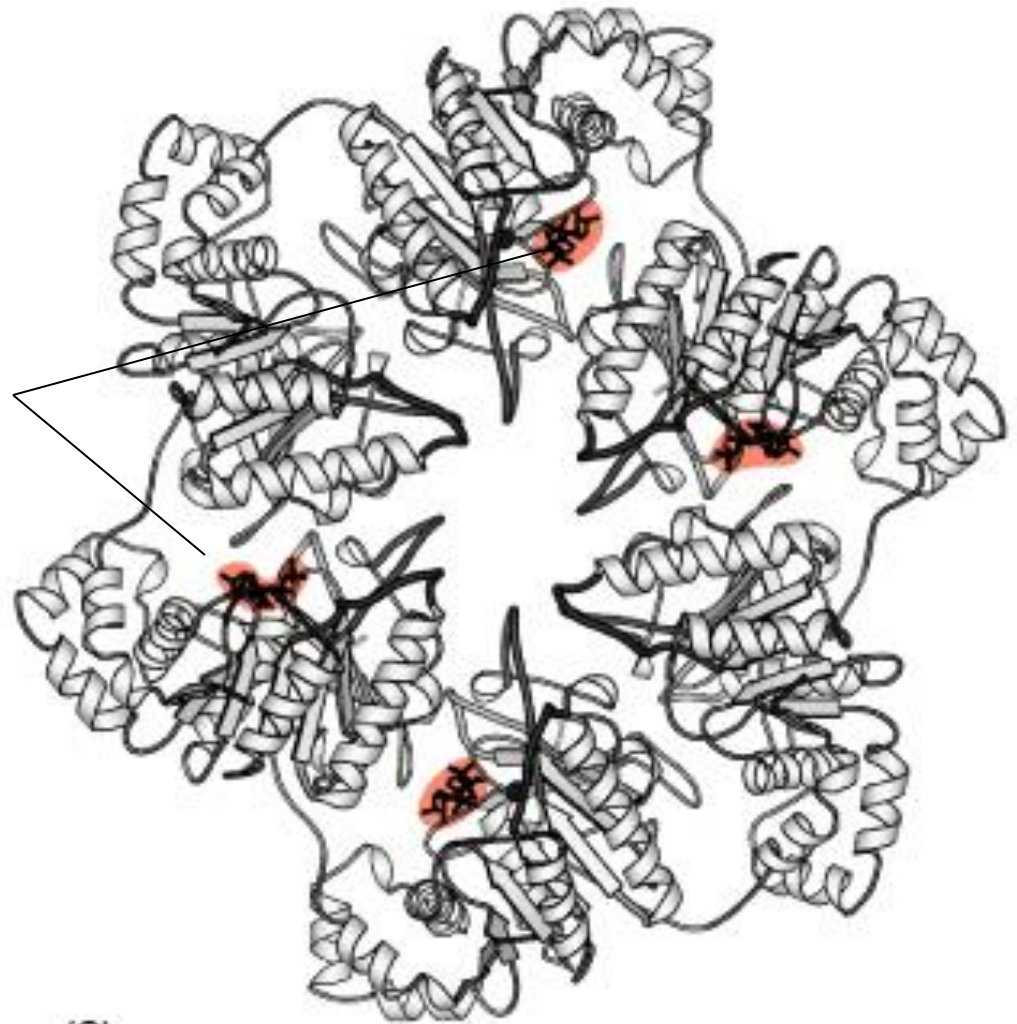


(A)



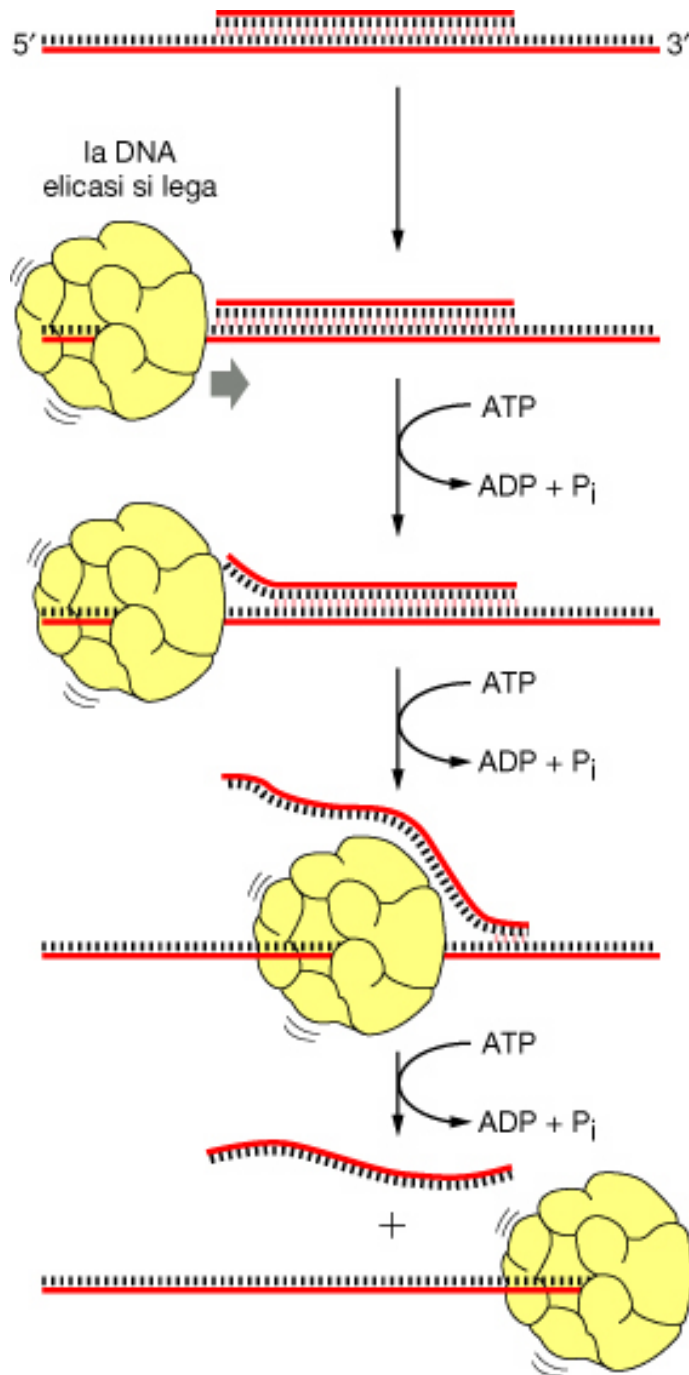
(B)

ATP



(C)

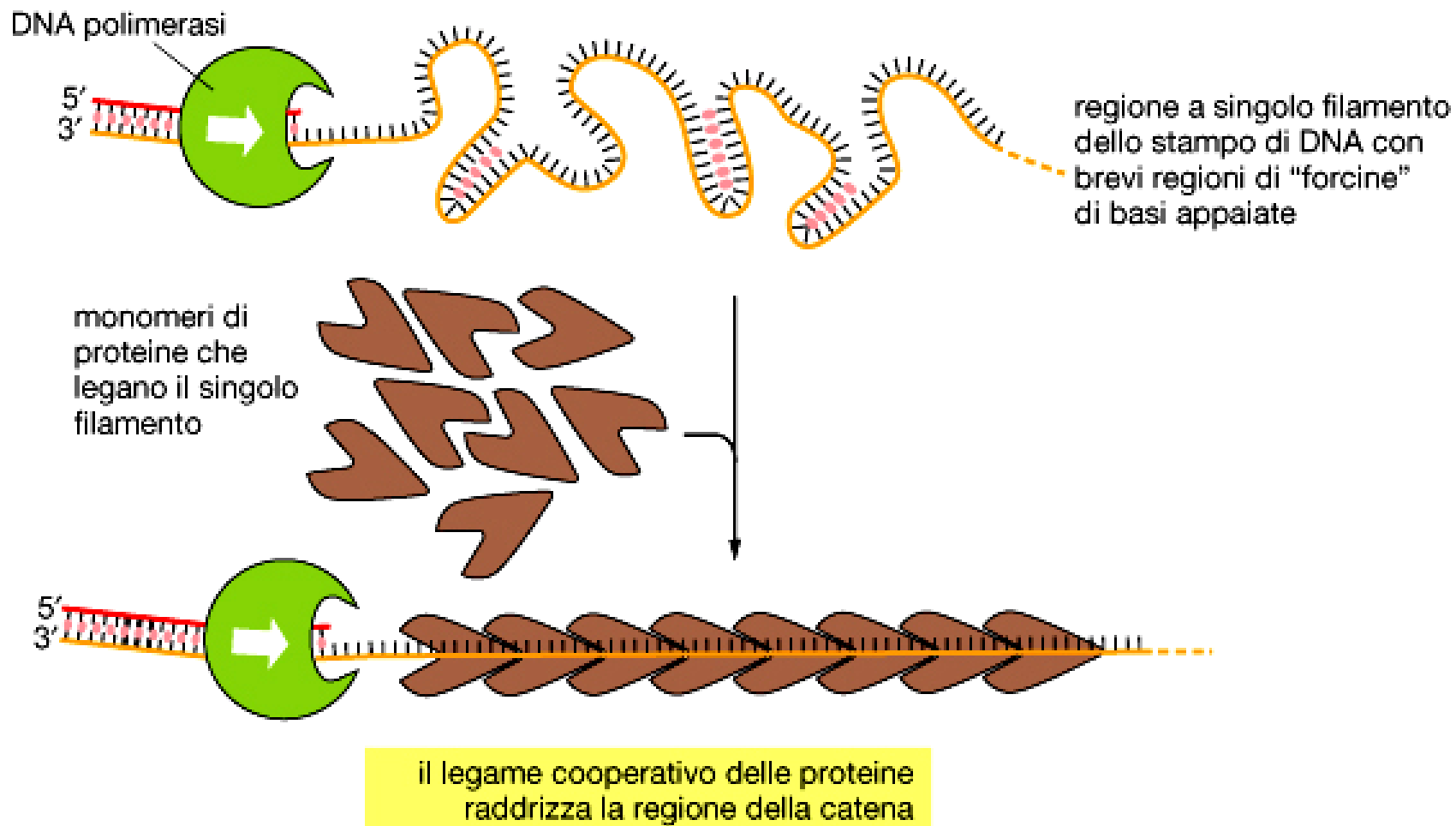
elicasi del batteriofago T7



DNA elicasi: enzimi processivi
che aprono la doppia elica
>1000 coppie di basi / sec)

Le SSB stabilizzano i singoli filamenti di DNA

SSB=single stranded binding protein



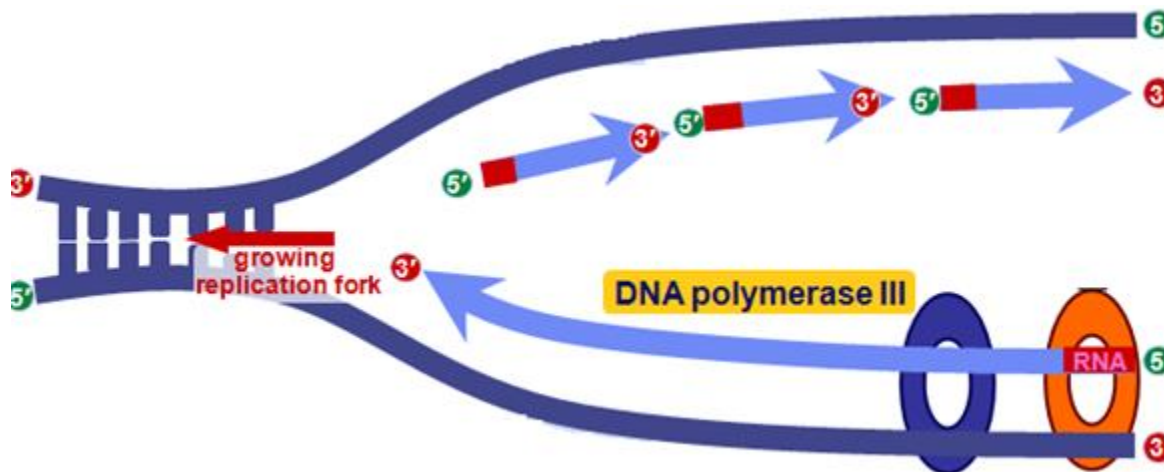
Procarioti:

Proteine identificate parte del Replisoma

DnaE (α), N(β) e Q(ϵ) subunità della Polimerasi III

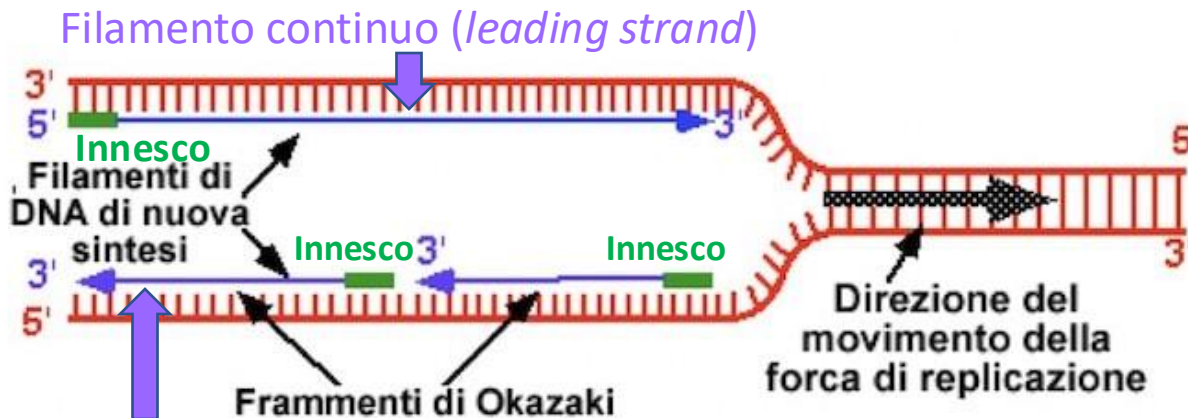
DnaG o Primasi

- La **Dna Polimerasi III** è responsabile della replicazione del DNA in E. coli.
- Questa reazione avviene in **direzione 5'-----> 3'** già che le DNA polimerasi hanno bisogno di un **3'OH**.
- Per iniziare la replicazione ha bisogno di una estremità 3'OH, complementare al filamento da replicare e sulla quale potere lavorare allungando la molecola: **innesco**. Questo sarà prodotto dalla **Primasi**.

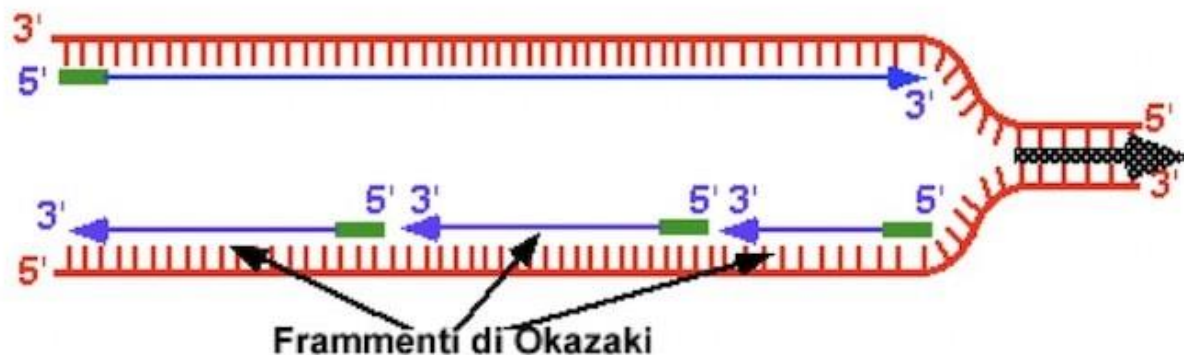


Meccanismo di Replicazione semiconservativa

- In una forcella di replicazione la **DNA pol III avanza in direzione 5'→3'**.
- Seguendo questa direzione solo un neofilamento può essere sintetizzato in modo continuo (**FILAMENTO CONTINUO o LEADING STRAND**)
- L'altro filamento deve essere sintetizzato in modo discontinuo man mano che si apre la forcella di replicazione (**FILAMENTO RITARDATO o LAGGING STRAND**)



Filamento ritardato (*lagging strand*)



- Ogni uno dei frammenti che si generano nel filamento ritardato si chiamano **FRAMMENTI DI OKAZAKI**.

In E.coli : 1000-2000 nt

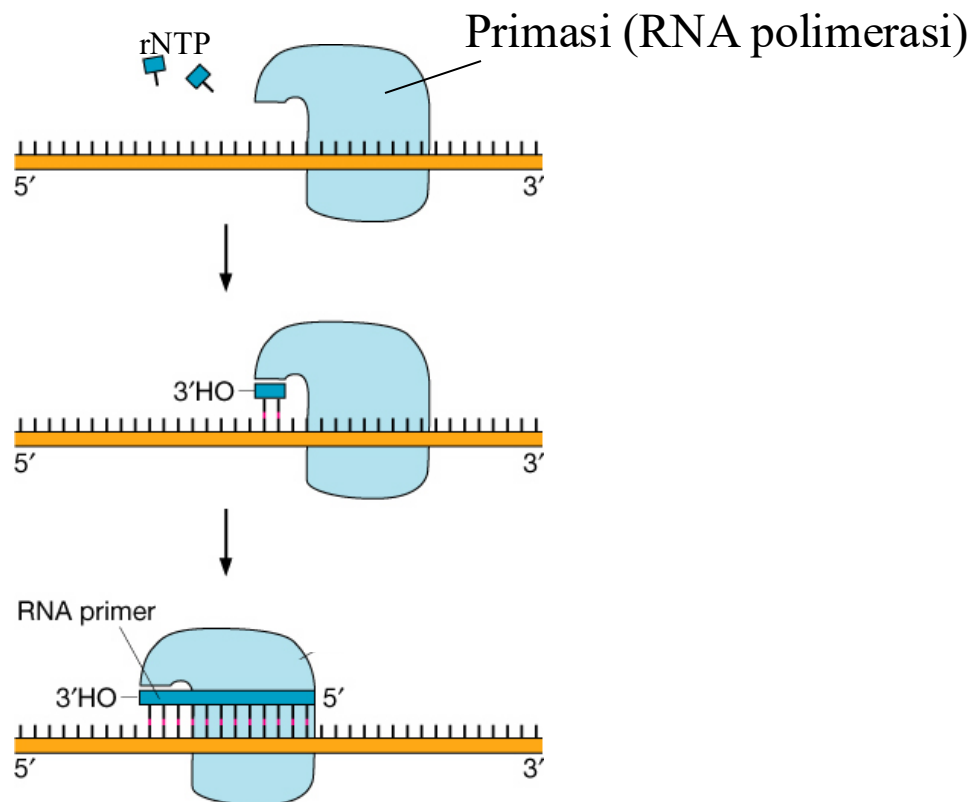
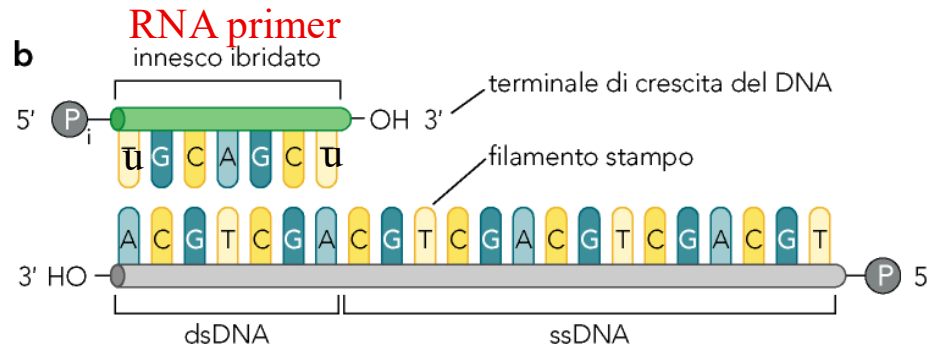
In eucarioti: 100-200 nt

- I frammenti di Okazaki saranno successivamente processati e saldati tra di loro in modo da creare un filamento unico

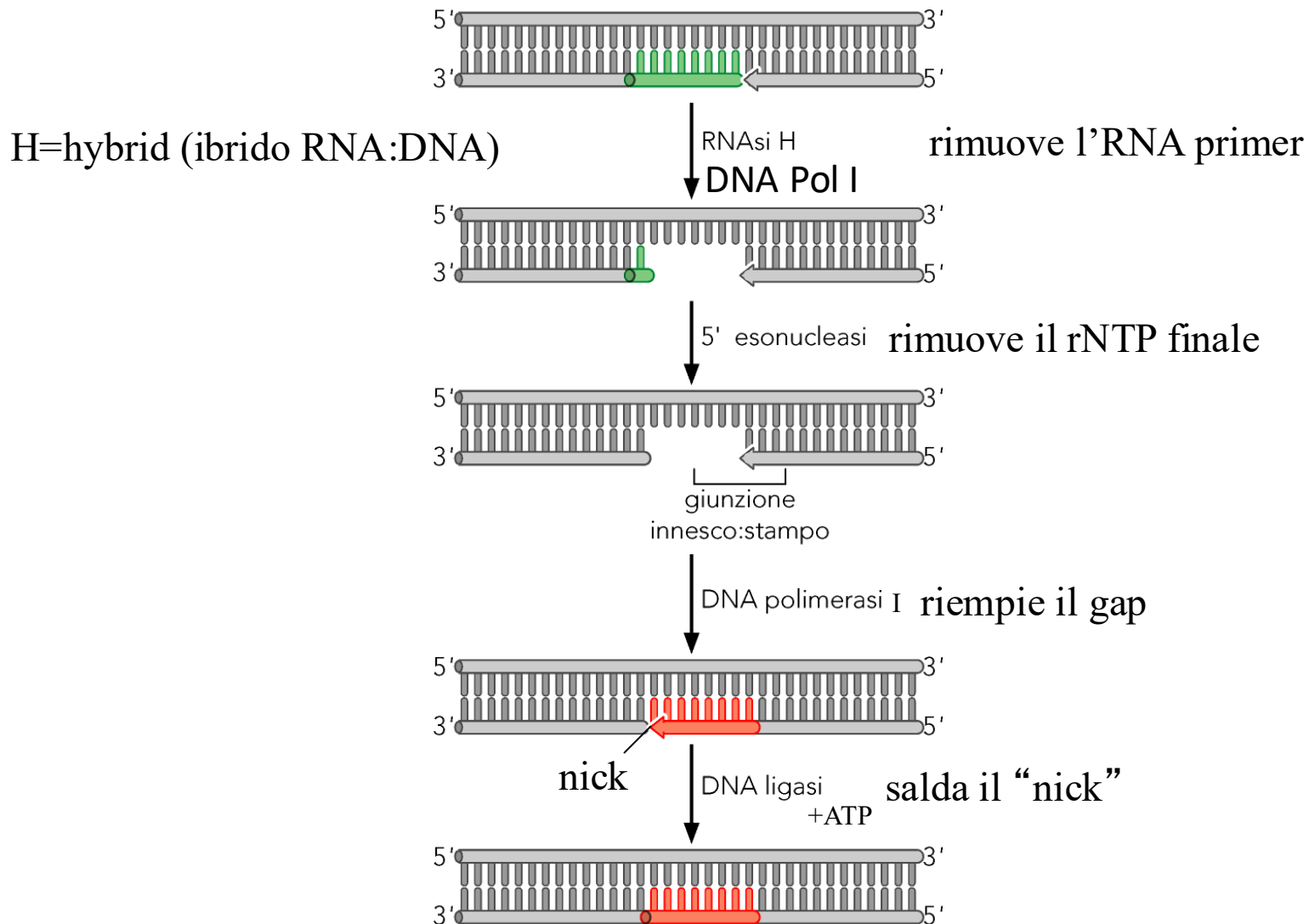
Meccanismo di Replicazione semiconservativa



- **L'innesco, iniziatore o primer** è una corta molecola di RNA (4-12 nt) complementare alla molecola stampo del DNA ed è sintetizzata dalla **DNA primasi**.
- La **sintesi** del innesco è necessaria sia nel **filamento continuo** (basta 1 primer) che in quello **ritardato** per ogni frammento di Okazaki (necessita numerosi primer)
- Alla fine della replicazione le sequenze primer di **RNA saranno eliminate e sostituite da DNA**. Questo avviene grazie alla azione della **Pol I** (*E. coli*) che possiede una attività esonucleasica 5'→3', e allo stesso tempo può riempire con dNTPs gli spazi generati con la sequenza di DNA complementare.
- I diversi frammenti di DNA del filamento ritardato saranno poi uniti insieme dalla **DNA LIGASI** che forma un legame fosfodiesterico



Rimozione dell'innesco dal DNA neosintetizzato



DNA Polimerasi

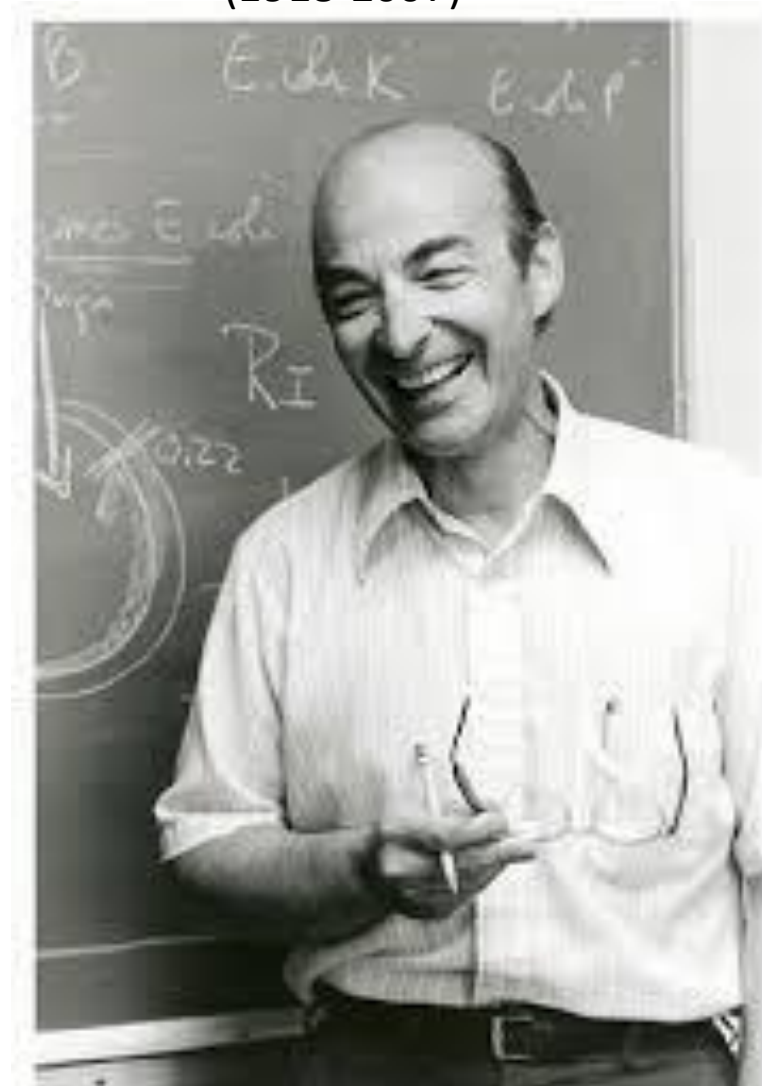
Arthur Kornberg
(1918-2007)

L'esistenza di un enzima in grado di polimerizzare nucleotidi in modo DNA stampo –dipendente fu suggerito dal modello della replicazione semiconservativa

Arthur Kornberg identificò la prima DNA polimerasi (DNA pol I) in cellule di *E. coli*, scoperta che fu riconosciuta con il **Premio Nobel nel 1959**.

Posteriormente si scoprì che la Pol I non era la principale responsabile della replicazione e fu lo stesso Kornberg ad **identificare la polimerasi replicativa (Pol III)**

E. Coli contiene numerose: Polimerasi I- II- III



DNA polimerasi di E.coli

Comparison of DNA polymerases of E. coli			
	Pol I	Pol II	Pol III
Gene	polA	polB	polC, dnaE, dnaN, dnaQ etc
Structure	Polypeptide	Polypeptide	Multimeric complex
Polymerization rate	16-20	40	250-1000 nt/second
Processivity	3-200	1500	>500000
5'→3' polymerase	Yes	Yes	Yes
3'→5' exonuclease	Yes	Yes	Yes
5'→3' exonuclease	Yes	No	No

Processività di un enzima: proprietà di aggiungere più subunità al polimero senza dissociarsi dal substrato

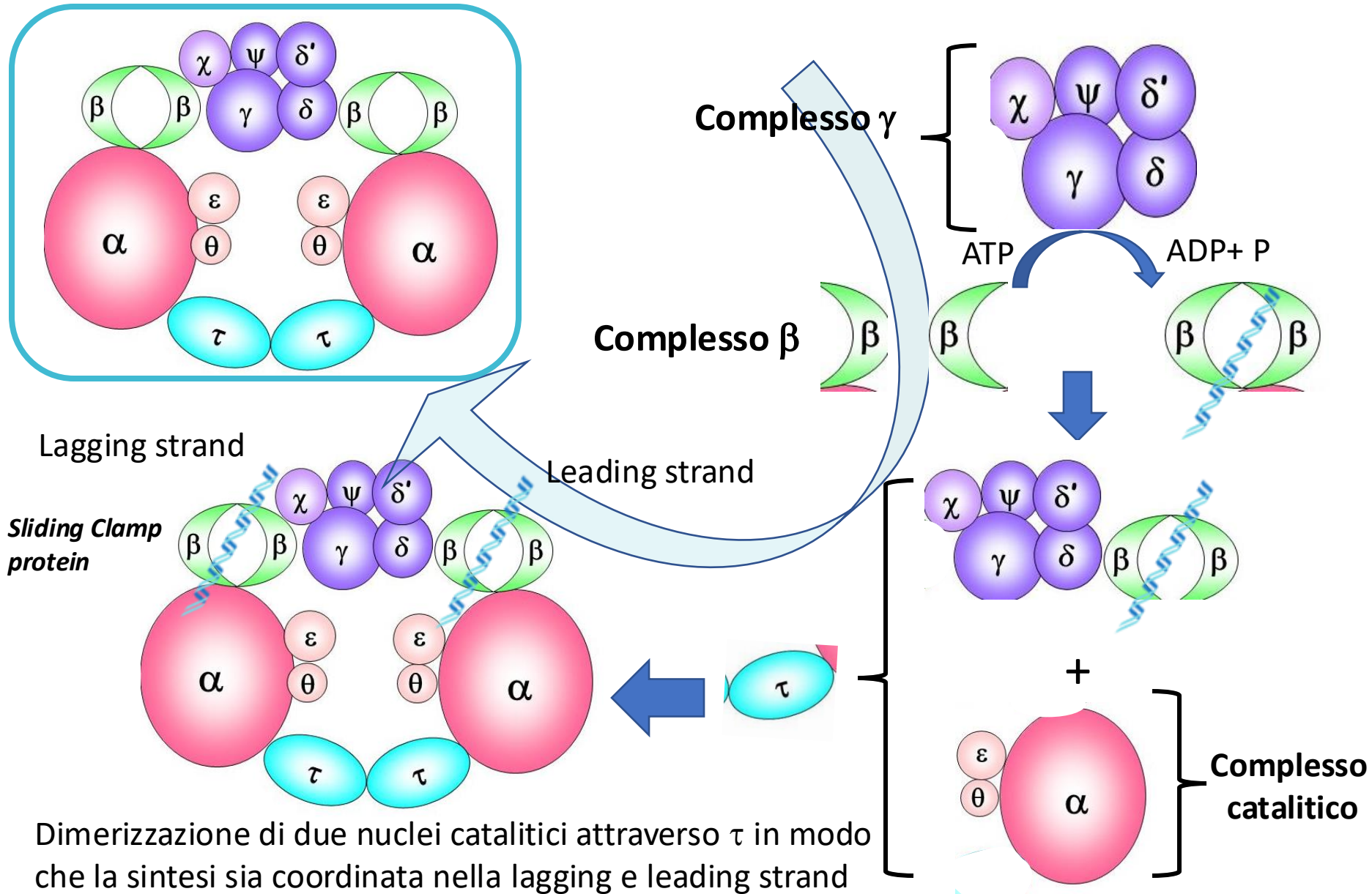
Esistono anche la DNA Pol IV e DNA Pol V

DNA polimerasi replicativa (Pol III)

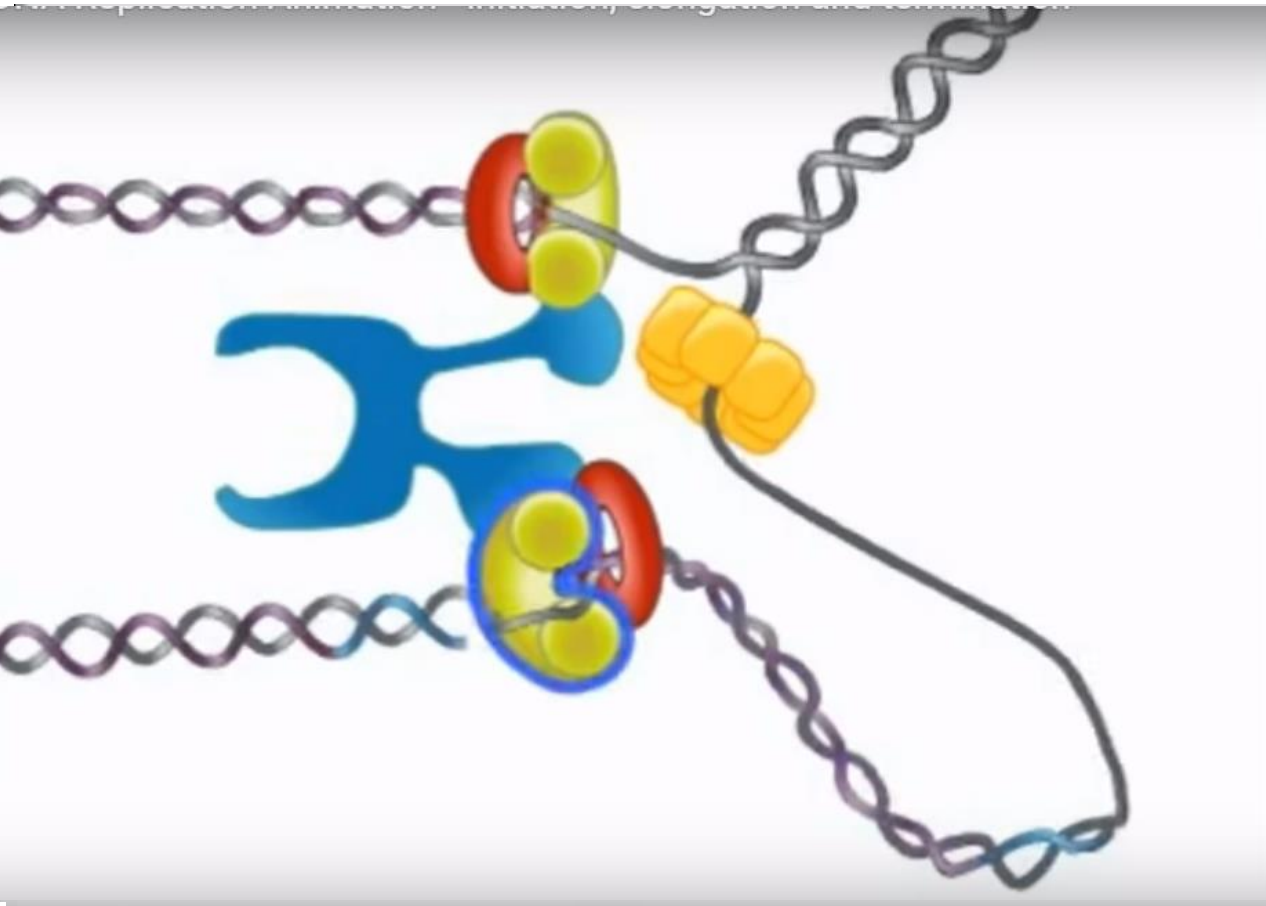
- E' un **complesso multimerico oloenzimatico** (10 subunità, 900kD)
- Le diverse subunità si **assemblano in modo sequenziale** fino a formare un **dimero catalitico**
- Attività di **polimerizzazione 5'→3'** e attività **esonucleasica 3'→5'**

Subunità		Funzione
Complesso catalitico	α	Sintetizza DNA (polimerizza)
	ϵ	Corregge errori di appaiamento in direzione 3' → 5' (<i>proofreading activity, attività esonucleolitica 3'→5'</i>)
	θ	Proteina che stimola l'attività di <i>proofreading</i>
	β	Permette lo scivolamento veloce della DNA polimerasi lungo il filamento senza staccarsi: « sliding Clamp protein »
	$\tau, \gamma, \delta, \delta', \psi$ and χ Complesso γ	Complesso che carica il complesso formato da β , mantenendo il legame con il DNA « Clamp loader » Necessario per assemblare la polimerasi sul DNA, usa ATP

DNA polimerasi replicativa (Pol III)

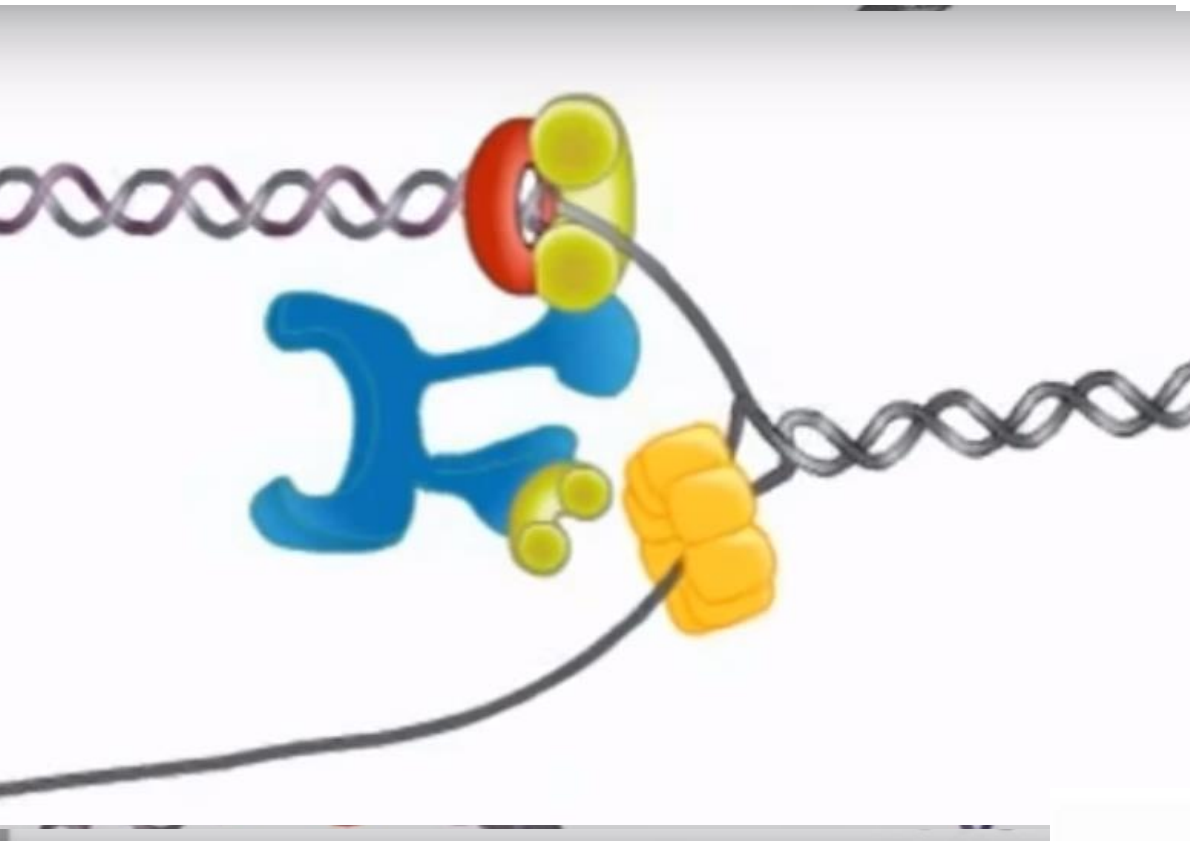


DNA polimerasi replicativa (Pol III)



La replicazione nella lagging strand continua finché non trova l'estremità 5' del primer successivo, provocando lo staccamento del complesso catalitico e b dal DNA

DNA polimerasi replicativa (Pol III)



Dopo che l'elicasi si è spostata di 1000 basi, un secondo primer si sintetizza alla forcella di replicazione del filamento lagging. Il complesso caricatore (clamp loader) carica un nuovo complesso b al primer seguita del complesso catalitico della polimerasi per la sintesi di un nuovo frammento di Okazaki.

Modello del

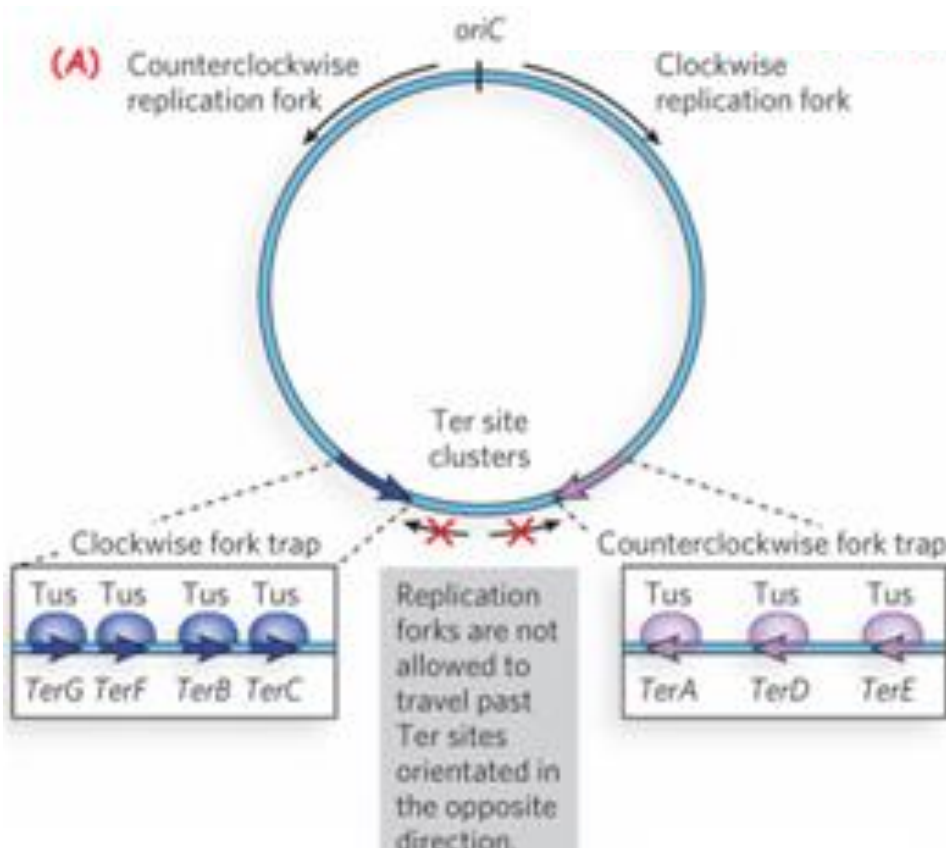


<https://www.youtube.com/watch?v=FBYeBb4C5Rc>

<https://www.dnalc.org/resources/3d/04-mechanism-of-replication-advanced.html>

Terminazione della Replicazione

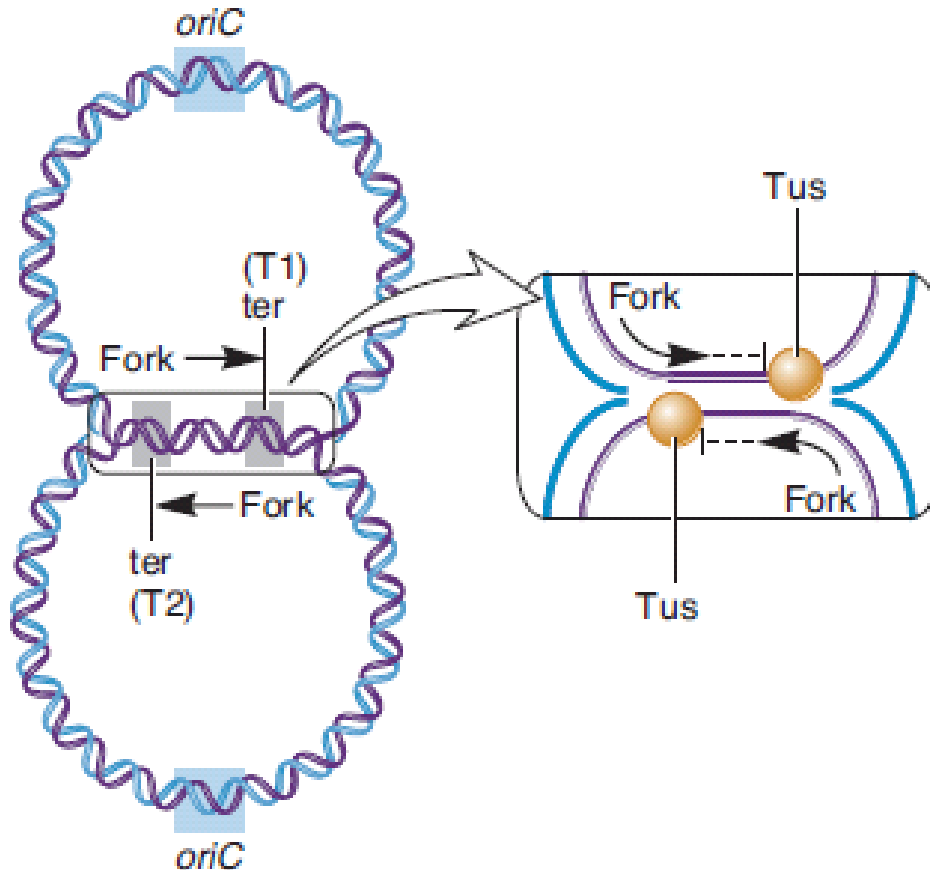
Come termina la replicazione quando le due forcelle di replicazione di E.coli (dsDNA circolare con un unico OriC) si incontrano?



Nella posizione opposta al OriC esistono delle sequenze di terminazione di 23 pb ripetute che finiscono la replicazione di una o l'altra forcella di replicazione. Queste sequenze si chiamano **Ter**

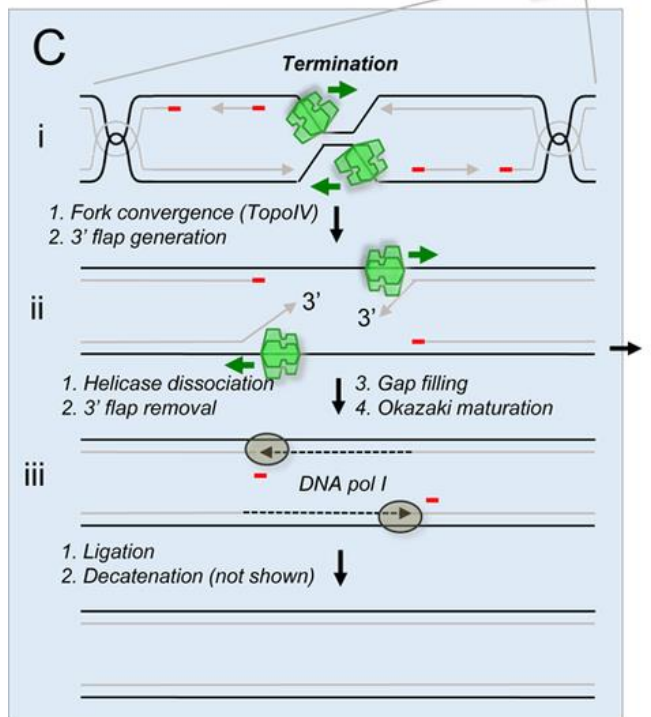
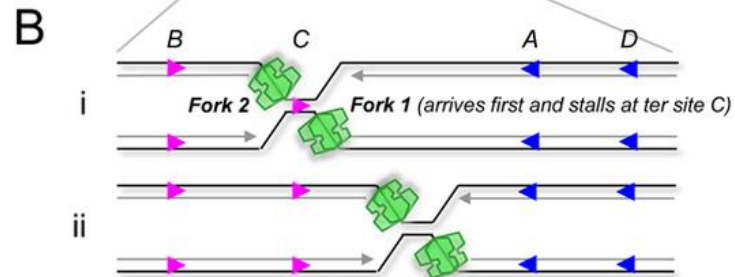
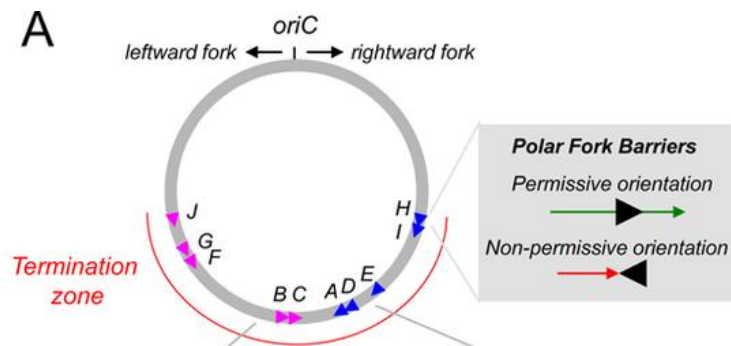
Queste sequenze sono posizionate seguendo direzioni opposte essendo chiamate «clockwise» o «counterclockwise». La prima bloccherà la replicazione del filamento sintetizzato nel senso orario, mentre il «counterclockwise» bloccherà il filamento sintetizzato in senso antiorario.

Terminazione della Replicazione

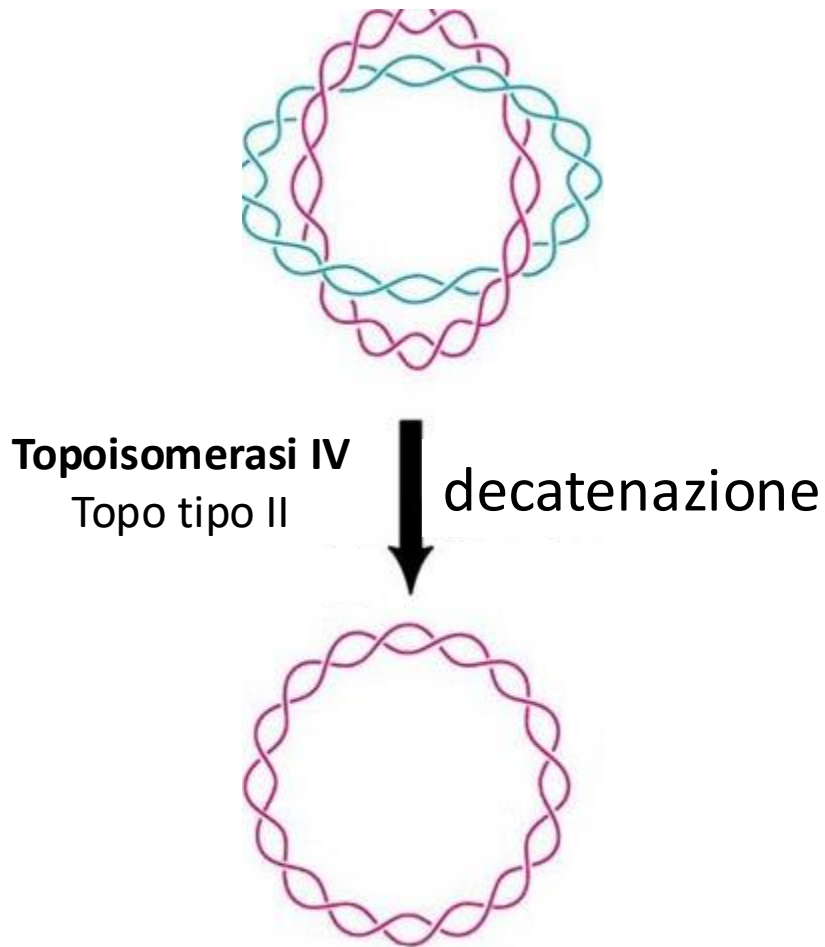


Sulle sequenze Ter si posizionano delle **proteine Tus** che permettono la replicazione del filamento che segue il senso di replicazione delle Ter sulle quali sono posizionate ma bloccano la replicazione del filamento che arriva in senso opposto.

Le proteine Tus interagiscono con la elicasi impedendo che continuino ad aprire la doppia elica. Come risultato le forcelle si bloccano in una regione contenente 2 Tus opposte (orientamento) e le molecole sono catenate.



Terminazione della Replicazione



Alla fine della replicazione le 2 molecole a doppia elica devono essere tagliate e riunite grazie alla azione della Topo IV.

Fasi delle Replicazione

Fase di inizio:

DnaA si lega in modo cooperativo alle regioni ripetute di 9pb, inducendo l'apertura della doppia elica nelle regioni ripetute di 13 pb. Su questa regione si posiziona l'elicasi che aprirà la forcella di replicazione, la primasi che sintetizzerà l'innescò di RNA e le SSB (single strand binding proteins) che con affinità per il ssDNA stabiliscono un legame cooperativo.

Fase di allungamento:

La DNA pol III inizia la replicazione bidirezionale nelle forcelle aggiungendo nucleotidi complementari alla catena stampo nella estremità 3'OH del primer di RNA in direzione 5'→3'. Nella leading strand la replicazione avviene in modo continuo mentre nella lagging in modo discontinuo formando i chiamati frammenti di Okazaki. I primer saranno poi digeriti dalla Pol I grazie alla sua funzione esonucleasica 5'→3', aggiungendo poi i nucleotidi che riempiranno il «gap» con la sua funzione polimerasi 5'→3'. La DNA ligasi formerà i legami fosfodiesterici.

L'avanzamento della forcella superavvolge il DNA e richiede l'azione delle topoisomerasi

Fase di terminazione:

La polimerizzazione delle nuove catene si blocca quando trova le proteine Tus nelle sequenze Ter in senso opposto alla propria sintesi. In seguito l'azione della Topo IV induce la decatenazione delle molecole ottenendo 2 molecole a doppia elica circolari chiuse (madre+figlia)

Reazione di Replicazione

Gli elementi necessari perché la replicazione avvenga in vitro o in vivo sono:

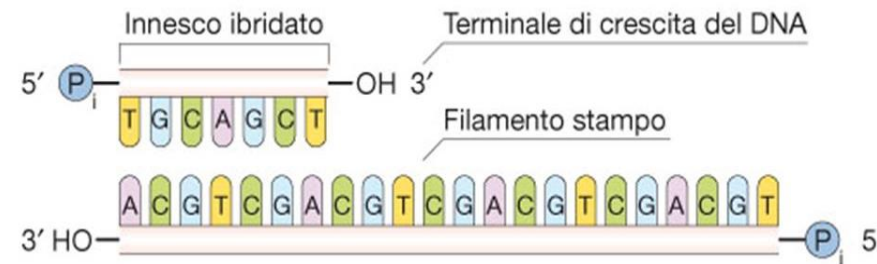
1. **Desossiribonucleotidi trifosfato (dNTPs):** dATP, dCTP, dGTP, dTTP



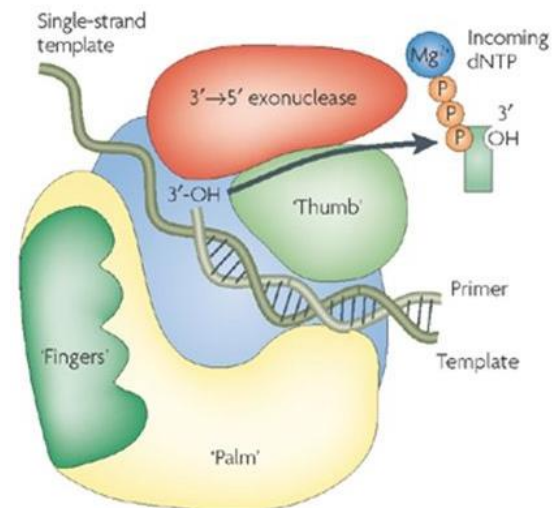
dATP dGTP
dCTP dTTP

©

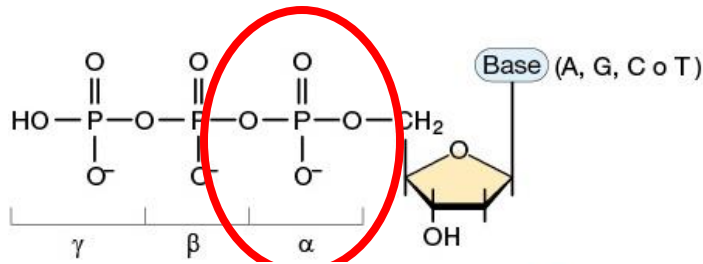
2. **Complesso innesco-stampo:** stampo rappresentato da un tratto di DNA ed un innesco che può essere un tratto di DNA (in vitro) o RNA (in vivo), complementare a una regione del filamento stampo, che porti una estremità 3'OH sulla quale la DNA polimerasi può aggiungere un nucleotide ad ogni reazione



3. **La DNA polimerasi** catalizza la formazione di un legame fosfodiesterico rispettando la complementarità del filamento stampo



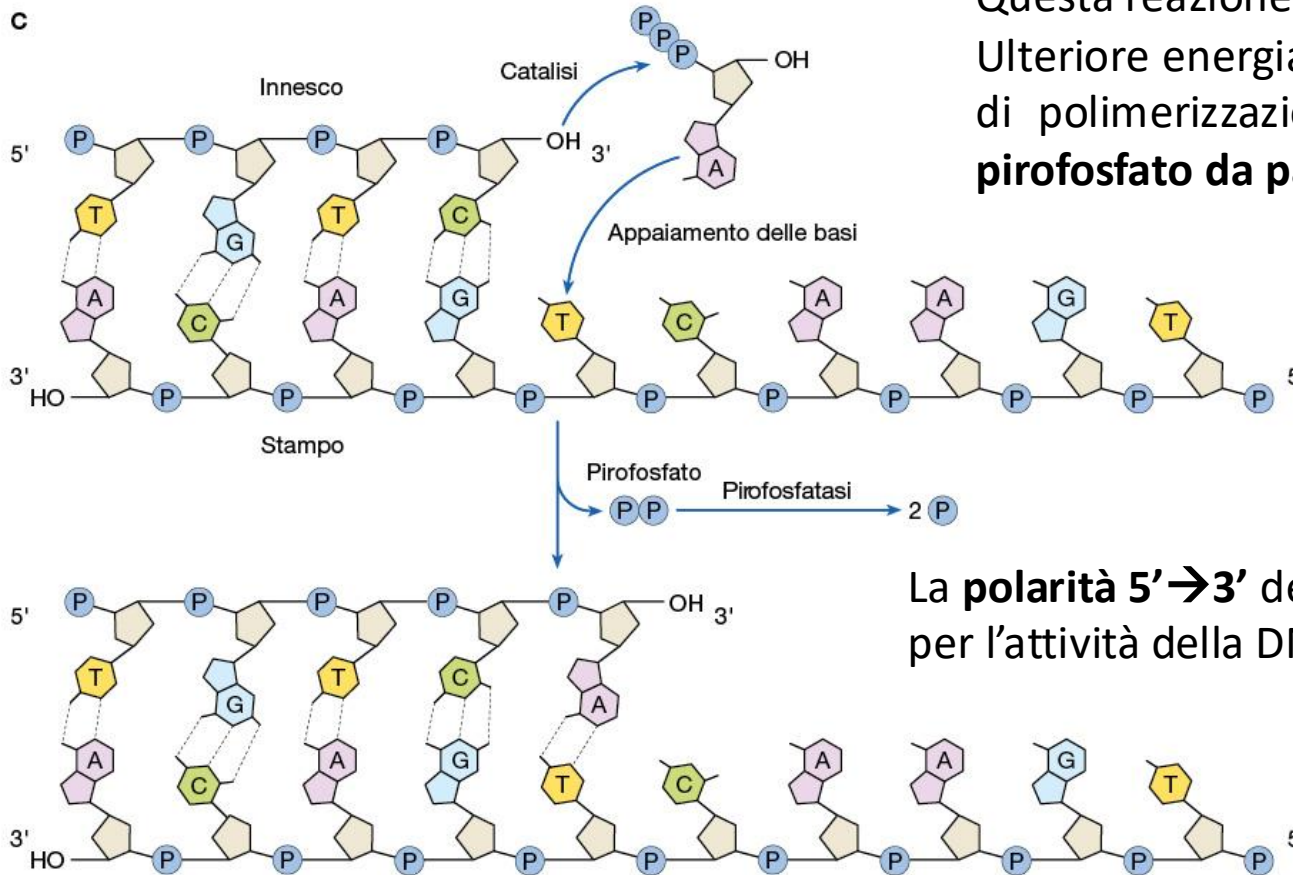
Reazione e meccanismo di Replicazione



La formazione del **legame fosfodiesterico** include la reazione del fosfato in posizione α del dNTP con l'estremo 3'OH dell'innesco.

Questa reazione porta $\Delta G = -3.5 \text{ kcal/mole}$
Ulteriore energia necessaria per la reazione di polimerizzazione viene **dall'idrolisi del pirofosfato da parte della pirofosfatasi**

$$\Delta G = -8 \text{ kcal/mole}$$



La **polarità 5'→3'** della catena è necessaria per l'attività della DNA polimerasi

Figura 6.13C

Fedeltà della Replicazione

Fedeltà della replicazione: 1 errore ogni 10^9 - 10^{10} nt

Pol III: 1 errore ogni 10^5 , che dipende in parte dalla presenza delle forme tautomeriche delle basi azotate

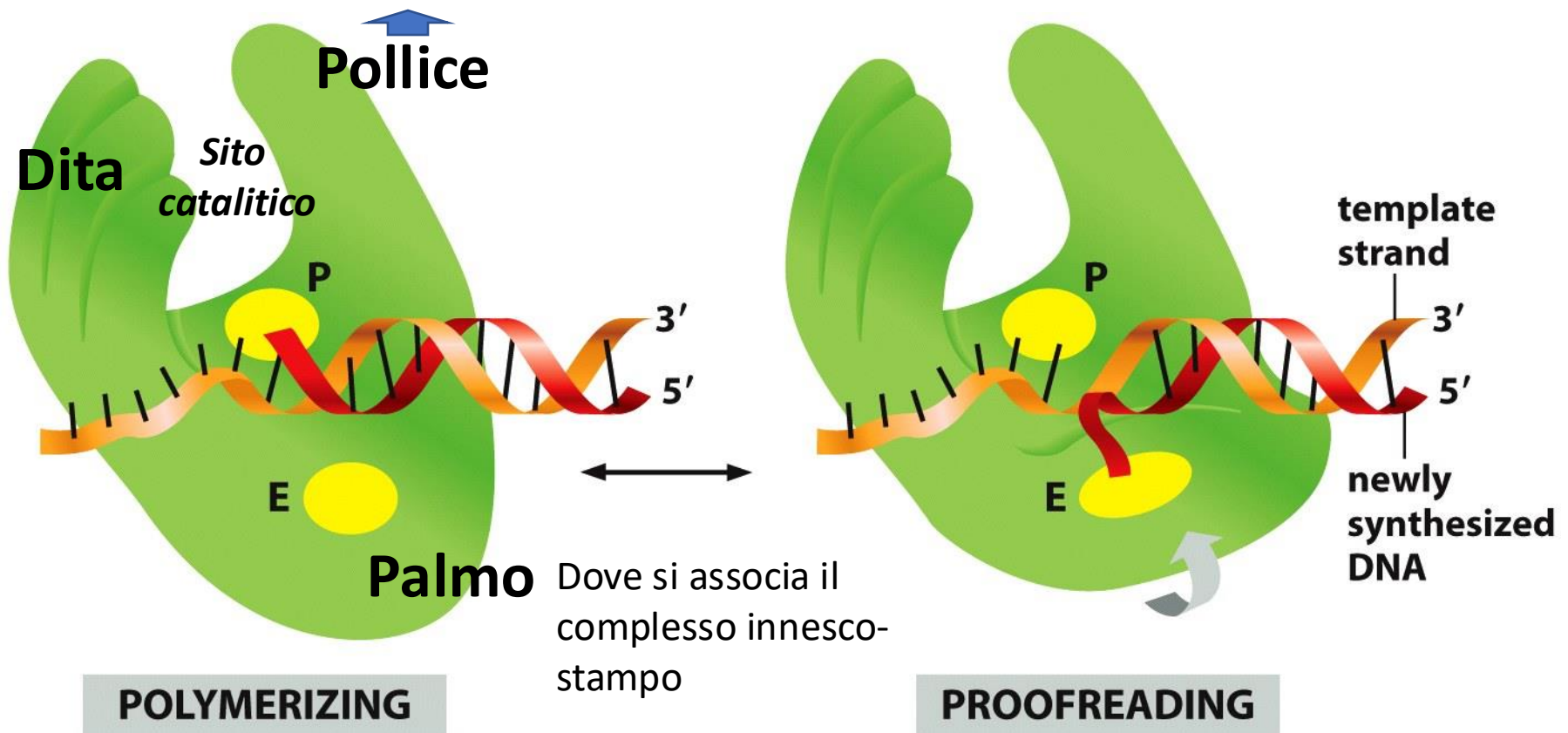


In parte riparato dalla propria attività esonucleasica $3' \rightarrow 5'$ che la permette aggiungere poi il nucleotide corretto: ***Attività Proofreading***

DNA polimerasi replicativa: Struttura - Funzione

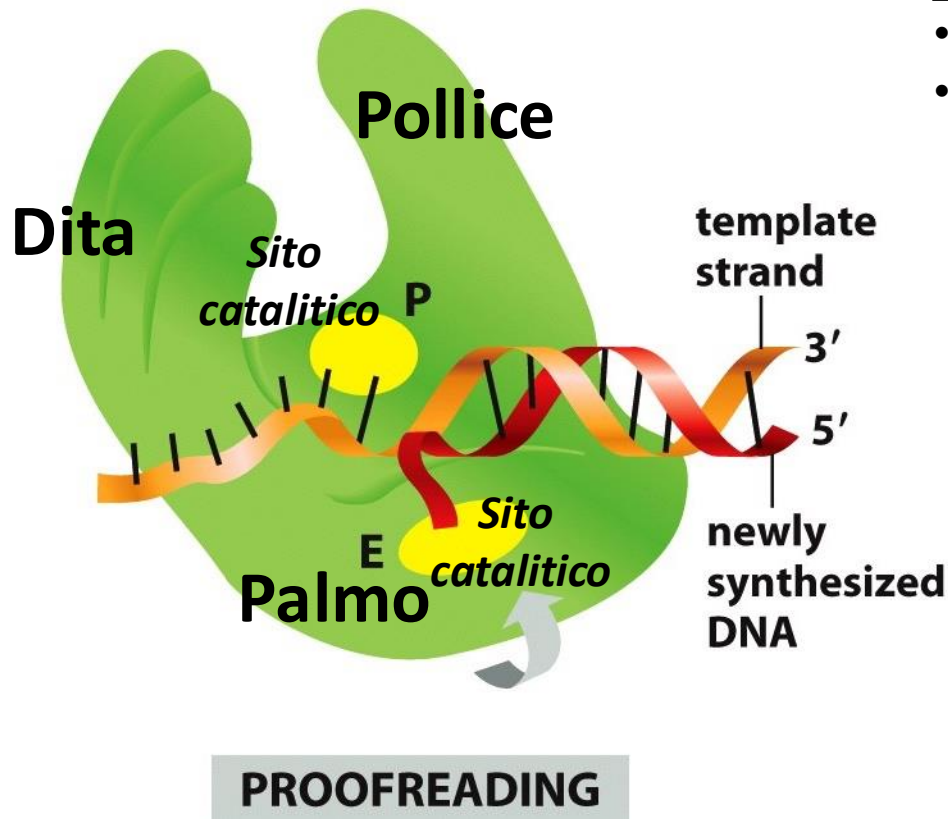
Il complesso catalitico delle polimerasi può essere rappresentato come
« mano destra parzialmente chiusa »

Interagisce con lo stampo stabilizzando il
complesso innesco-stampo-enzima
favorendo l'azione dell'enzima



DNA polimerasi replicativa: Struttura - Funzione

Il complesso catalitico delle polimerasi può essere rappresentato come «
mano destra parzialmente chiusa»



Se non viene rispettata la complementarità tra i filamenti:

- si abbassa la velocità di replicazione
- e il complesso innesco-stampo è più facilmente rilasciato dal sito attivo di polimerizzazione ed entra in contatto con il sito esonucleasico del enzima che controlla la fedeltà del processo replicativo.

In questo modo la correzione e la posteriore ripresa della polimerizzazione nello stesso punto avviene senza staccare la molecola dal enzima.

Fedeltà della Replicazione

Fedeltà della replicazione: 1 errore ogni 10^9 - 10^{10}

Pol III: 1 errore ogni 10^5 , che dipende in parte dalla presenza delle forme tautomeriche delle basi azotate

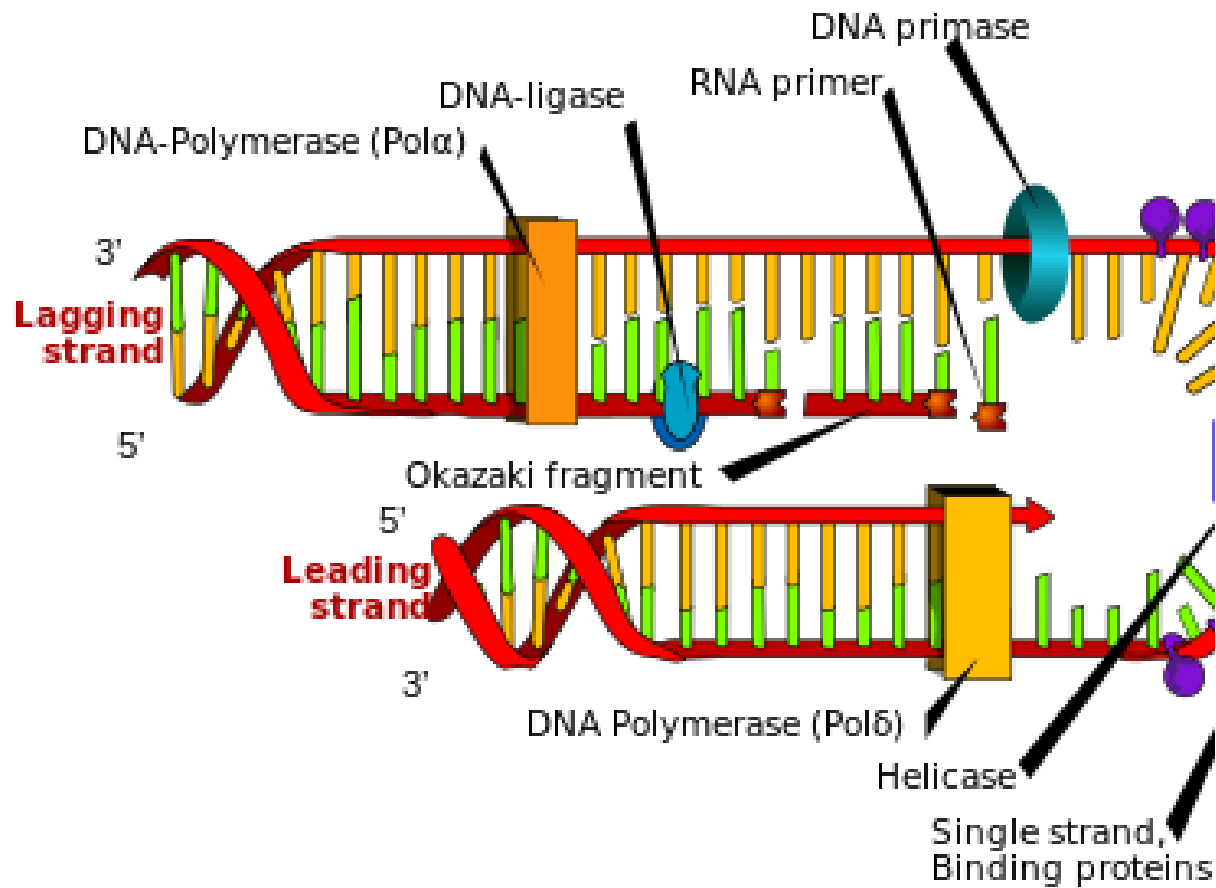


In parte riparato dalla propria attività esonucleasica $3' \rightarrow 5'$ che la permette aggiungere poi il nucleotide corretto: **Attività Proofreading**

Arriva a frequenza di errori 10^7



Si raggiunge la frequenza di 10^9 dopo ulteriori meccanismi di riparazione



Replicazione negli Eucarioti

Replicazione negli eucarioti

Il meccanismo di replicazione in eucarioti rimane **molto simile** a quello appena descritto nei procarioti.

Procede con la sintesi di una **leading e una lagging strand** che hanno bisogno di uno o più inneschi rispettivamente.

I **frammenti di Okazaki sono più corti** in eucarioti (100-200 nt) e la velocità di **replicazione è più lenta**.

In eucarioti esistono **diverse polimerasi replicative**

Non essendo una molecola circolare chiusa esiste il problema di come completare la replicazione nella **regione telomerica**

In eucarioti il **numero di proteine** coinvolte nel processo di replicazione **è maggiore**.

Proteine con funzioni simili in eucarioti e procarioti sono strutturalmente uguali anche se la sequenza appare diversa.

La replicazione è regolata dal **ciclo cellulare e della conformazione della cromatina**

Proteine del Replisoma :

Procarioti vs. Eucarioti

E. coli	Eucarioti	Struttura e funzione della proteina negli eucarioti
DnaA	ORC (T-Ag in SV-40)	Riconoscimento dell'origine; è costituita da 6 subunità
DnaB-DnaC	MCM 2-7 (T-Ag in SV-40)	DNA elicasi; è costituita da 6 subunità
DnaG (primasi)	DNA polimerasi α -primasi	La polimerasi che sintetizza gli RNA primer e corte catene di DNA sul filamento ritardato; è composta da 4 subunità
Subunità α di Pol III	DNA polimerasi δ e DNA polimerasi ϵ	Le due polimerasi replicative; ciascuna è composta da 4 subunità
Subunità β di Pol III	PCNA	La proteina che forma la "clamp" che avvolge e scivola sul DNA; è un omotrimerico
Complesso- γ di Pol III	RFC	Il complesso che carica la "clamp" sul DNA; è composto da 5 subunità
SSB	RPA	La proteina che stabilizza il DNA a singolo filamento (ssDNA); è composta da 3 subunità
Pol I	FEN1, RNasi H	Nucleasi che eliminano gli RNA primer dai frammenti di Okazaki
Lig 1	DNA ligasi I	La DNA ligasi che salda i frammenti di Okazaki

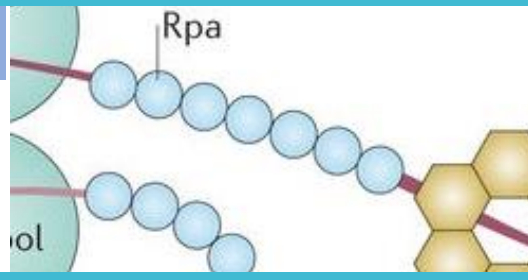
MCM: mini-chromosome maintenance **ORC:** origin recognition complex **RPA:** Replication Protein A
PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen **RFC:** Replication Factor C **FEN:** Flap endonuclease 1

ORC: *origin recognition complex*

Complesso che riconosce l'origine

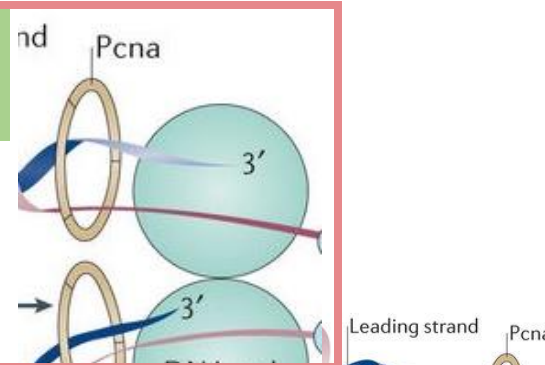
RPA: *Replication Protein A*

Stabilizza il ssDNA (SSB)



PCNA: *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

E' un trimero che agisce come *clamp protein* formando una ciambella in torno al DNA



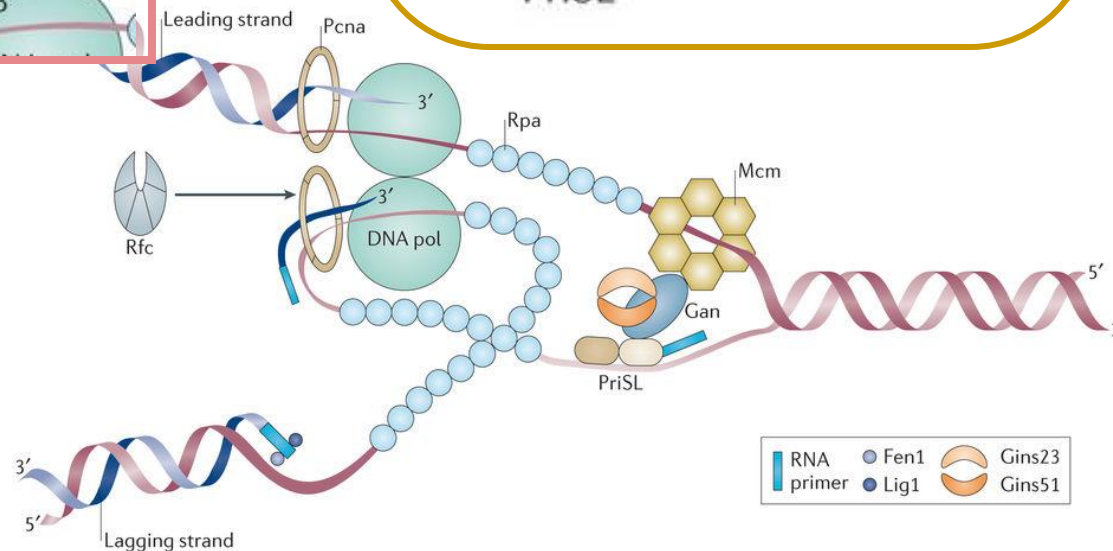
RFC: *Replication Factor C*

Clamp loader (complesso γ)

FEN1: *Flap endonuclease 1*

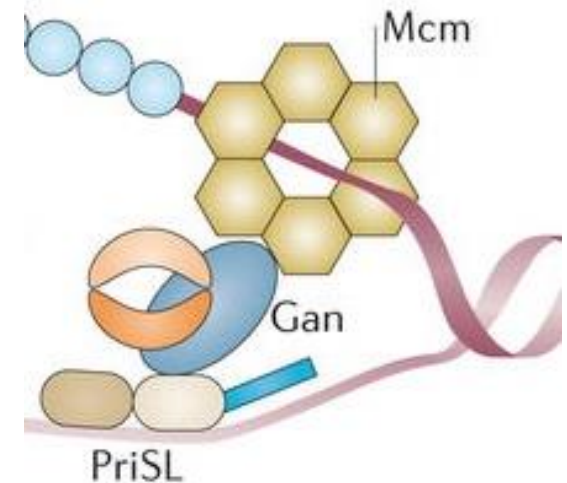
Elimina i primer di RNA

DNA ligasi I:



MCM: *mini-chromosome maintenance*

Esamero proteico con funzione elicasi. Per caricarlo sul DNA si richiede l'azione delle proteine Cdc45 e il complesso GINS



DNA polimerasi Eucarioti

Polimerasi α primasi : sintetizza il primer di RNA (8-12 nt) e lo allunga da alcune decine. Dopo si stacca e non interagisce con la proteina clamp PCNA. Nella lagging strand torna indietro per sintetizzare un nuovo primer. Non possiede attività esonucleasica 3'-5' di proofreading

Polimerasi δ – ϵ : sono le pol replicative che allungano le corte sequenze create dalla pol α . Non è chiaro come avvenga lo scambio di polimerasi. Aumentano velocità di sintesi e fedeltà del processo

Nome	Funzione
Pol α (alfa)	Sintesi degli RNA primer e dei primi 20-30 nucleotidi di DNA nei frammenti di Okazaki
Pol δ (delta)	Allungamento dei frammenti di Okazaki Riparazione del DNA (NER, MMR, DSB)
Pol ϵ (epsilon)	Sintesi del filamento leading Riparazione del DNA (NER, DSB)
Pol γ (gamma)	Replicazione DNA mitocondriale
Pol β (beta)	Riparazione del DNA (BER)
Pol η (eta)	Sintesi di DNA translesione (TLS)
Pol ζ (zeta)	Sintesi di DNA translesione (TLS)
Pol θ (teta)	Riparazione degli ICL
Pol ι (iota)	Sintesi di DNA translesione (meiosi)
Pol κ (kappa)	Sintesi di DNA translesione; DSB
Pol λ (lambda)	Sintesi di DNA translesione
Pol μ (mu)	DSB
Pol ν (nu)	Riparazione degli ICL (?)
Rev1	Riparazione dei siti abasici
TdT	Transferasi terminale: unica DNA polimerasi che sintetizza DNA senza copiare uno stampo Ricombinazione V(D)J

Molte di queste polimerasi sono coinvolte nei processi di **riparazione e sintesi del DNA traslesione** (meccanismo per il quale la sintesi del DNA procede superando una lesione del filamento mediante l'azione di pol meno specifiche e creando degli errori e mutazioni)

Tabella 6.3

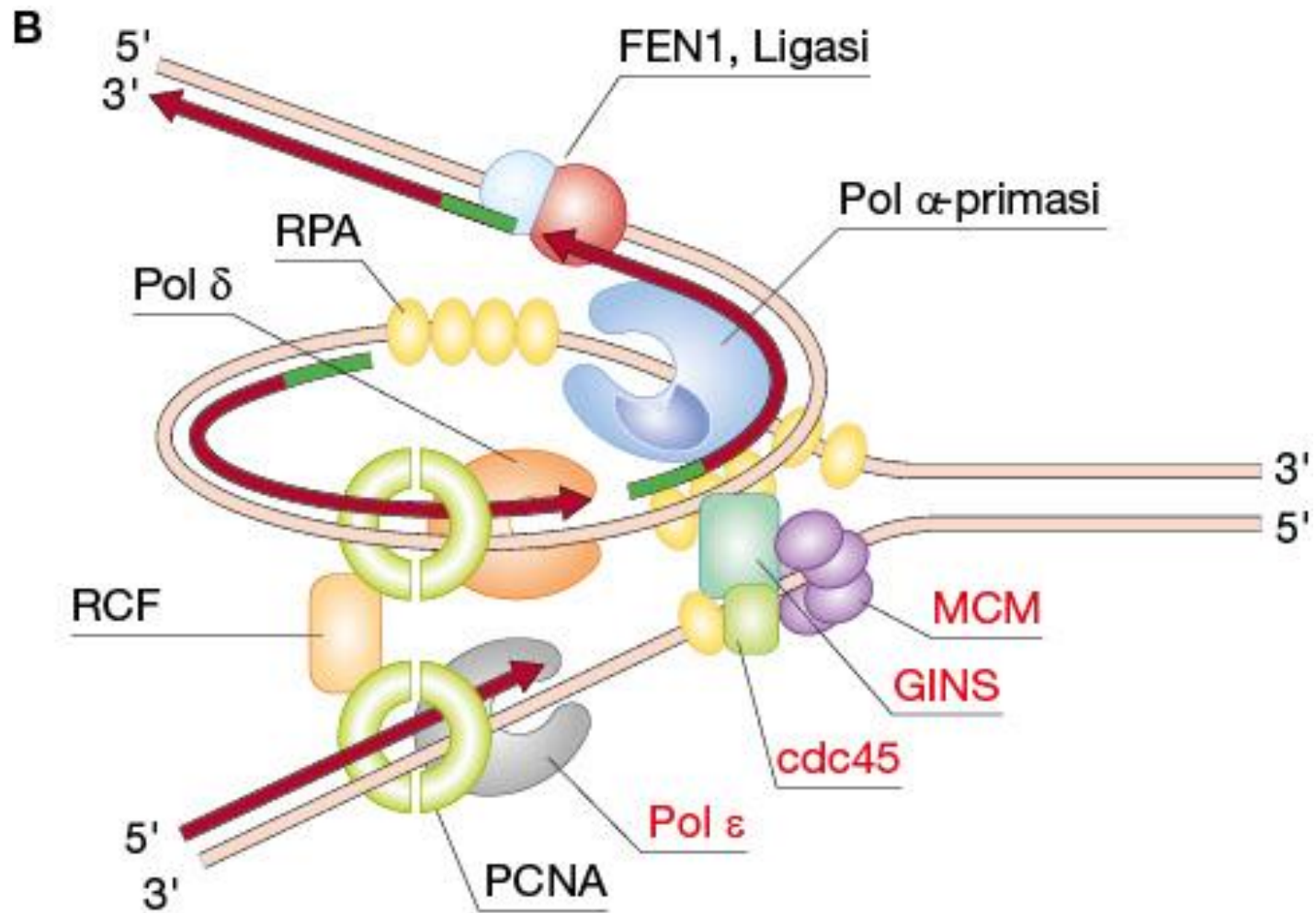


Fig.6.22 B

Replicazione nei Telomeri

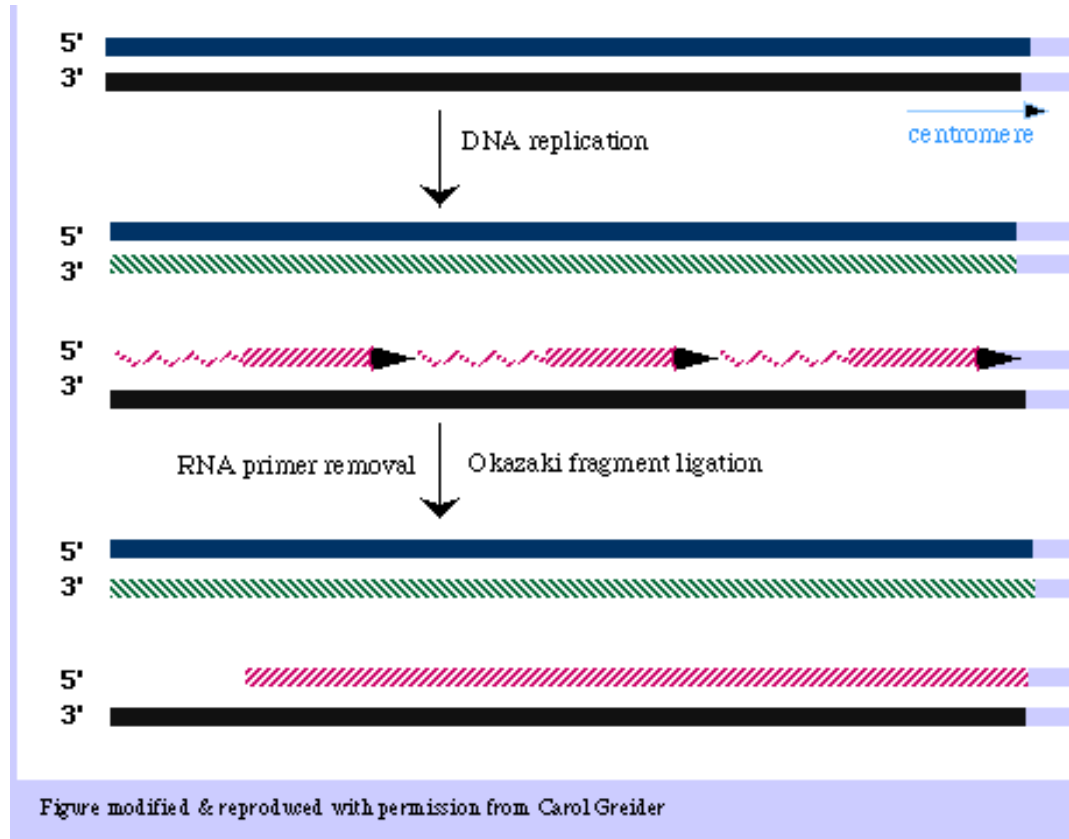
I telomeri si caratterizzano di brevi sequenze ripetute in tandem

Problema: Come procede la replicazione alla estremità del filamento ritardato ?

Alla fine nel filamento ritardato rimane un gap 5'→3' nella estremità che dovrebbe essere rimpiazzato con dNTPs dove prima c'era il primer di RNA.

Non esiste una polimerasi con attività che possa polimerizzare partendo dalla estremità 5'

Una continua perdita di questo corto frammento ad ogni ciclo di replicazione porterebbe alla perdita d'informazione genetica (50-150pb ad ogni ciclo)



Replicazione nei Telomeri

Telomerasi

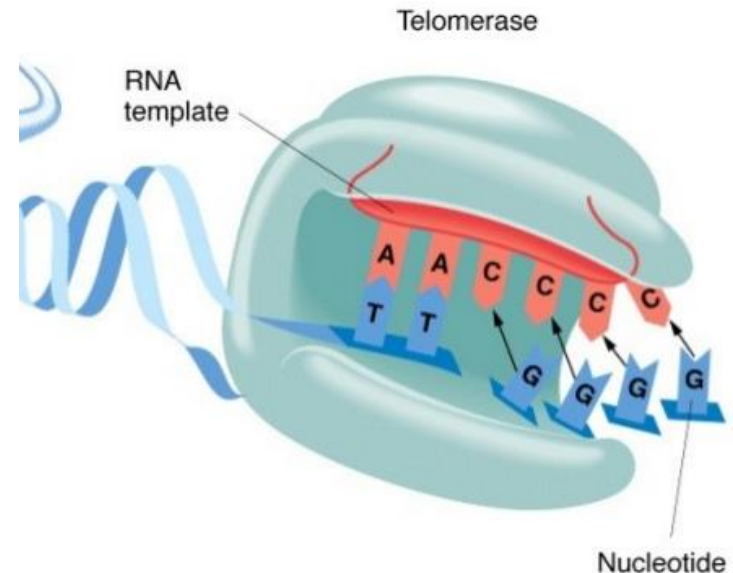


I telomeri si caratterizzano di brevi sequenze ripetute in tandem che **lasciano una estremità 3' sporgente** con la sequenza **5'-TTAGGG-3'** (in umano), che abbiamo già visto si stabilizza in modo da essere protetta da degradazione.

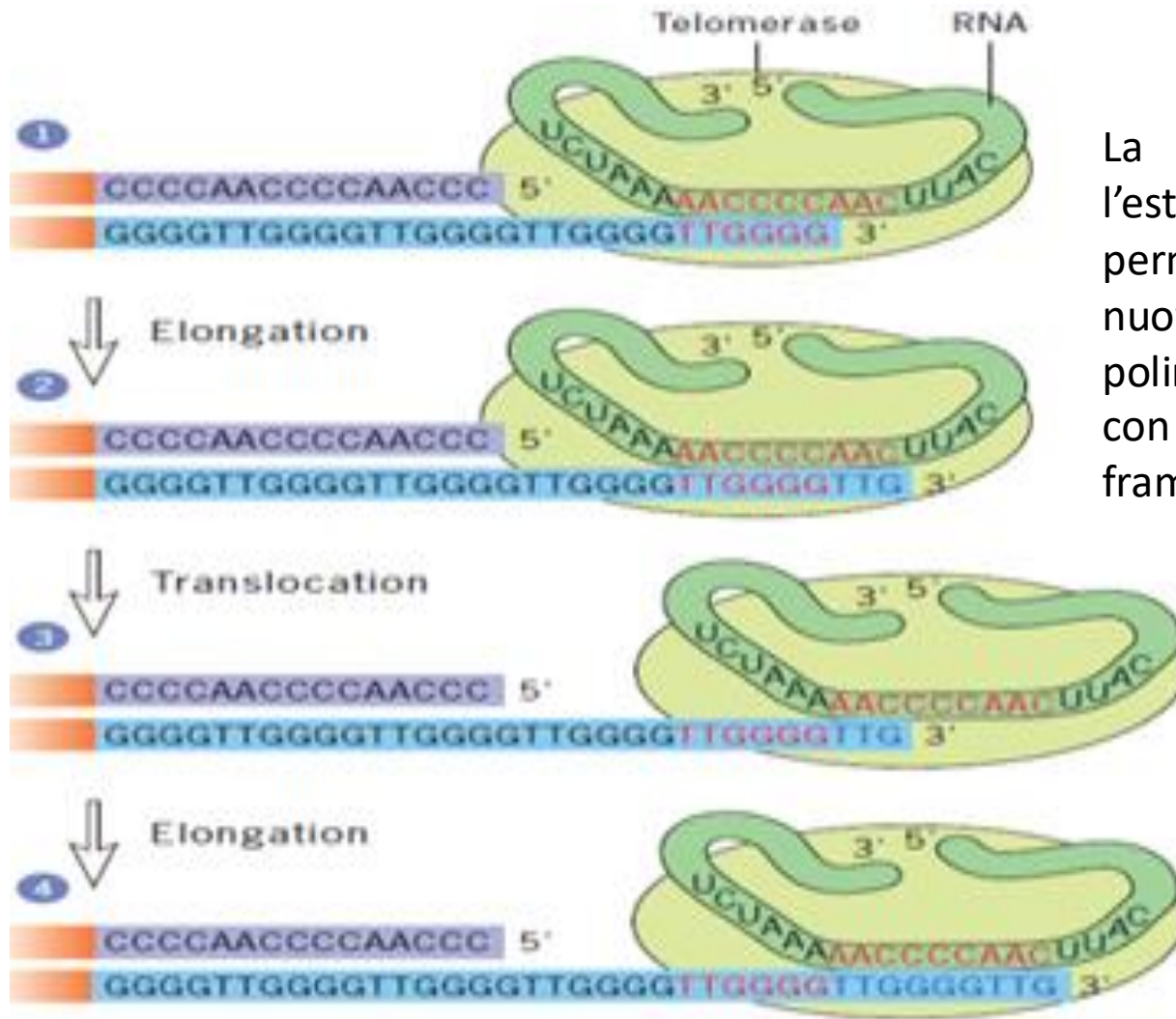
Parte dei processi che contribuiscono al mantenimento dei telomeri ricadono in un continuo equilibrio di allungamento e degradazione, processo nel quale ha un ruolo fondamentale la **TELOMERASI**.

La telomerasi è una **ribonucleoproteina** formata da 2 componenti principali:

1. Proteina **TERT (Telomerase Reverse Transcriptase)**. Agisce come trascrittasi inversa sintetizzando DNA copiando uno stampo di RNA
2. Molecola di RNA stampo o **TERC (Telomerase RNA component)**, che ha la sequenza complementare alla sequenza telomerica ripetuta di DNA



Replicazione nei Telomeri

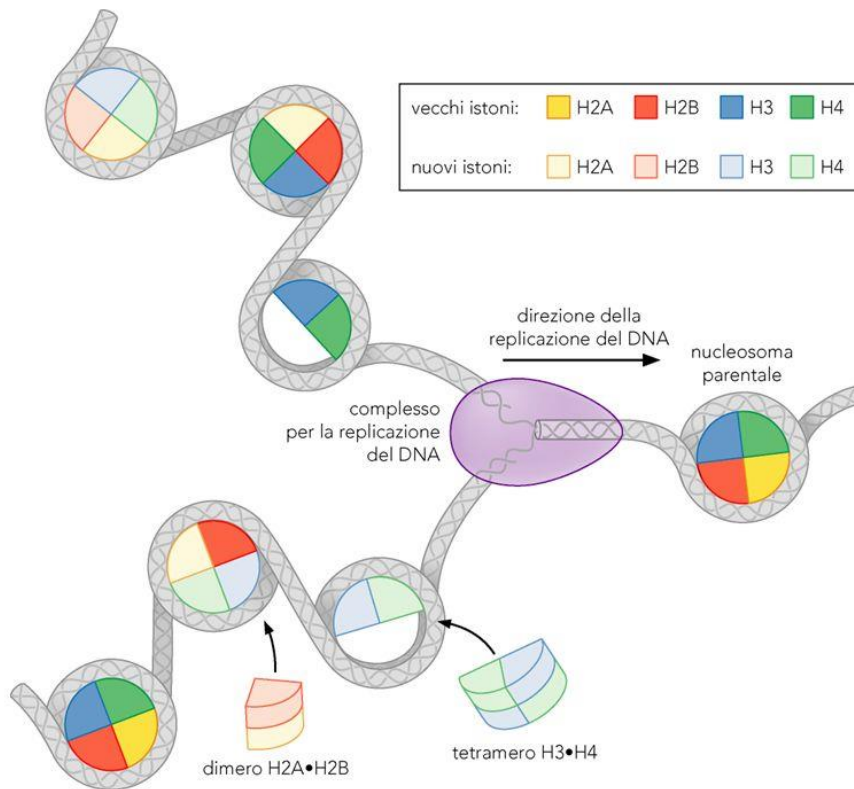


La telomerasi estende l'estremità sporgente 3' permettendo la sintesi di un nuovo primer da parte della polimerasi α (primasi) che finirà con la sintesi di un nuovo frammento di Okazaki

Replicazione del DNA nucleosomico

Il rimodellamento della cromatina influenza fortemente la replicazione.

Un aspetto importante è come l'ottamero di istoni influenzino e/o regolino la replicazione.



Watson et al., BIOLOGIA MOLECOLARE DEL GENE, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2005

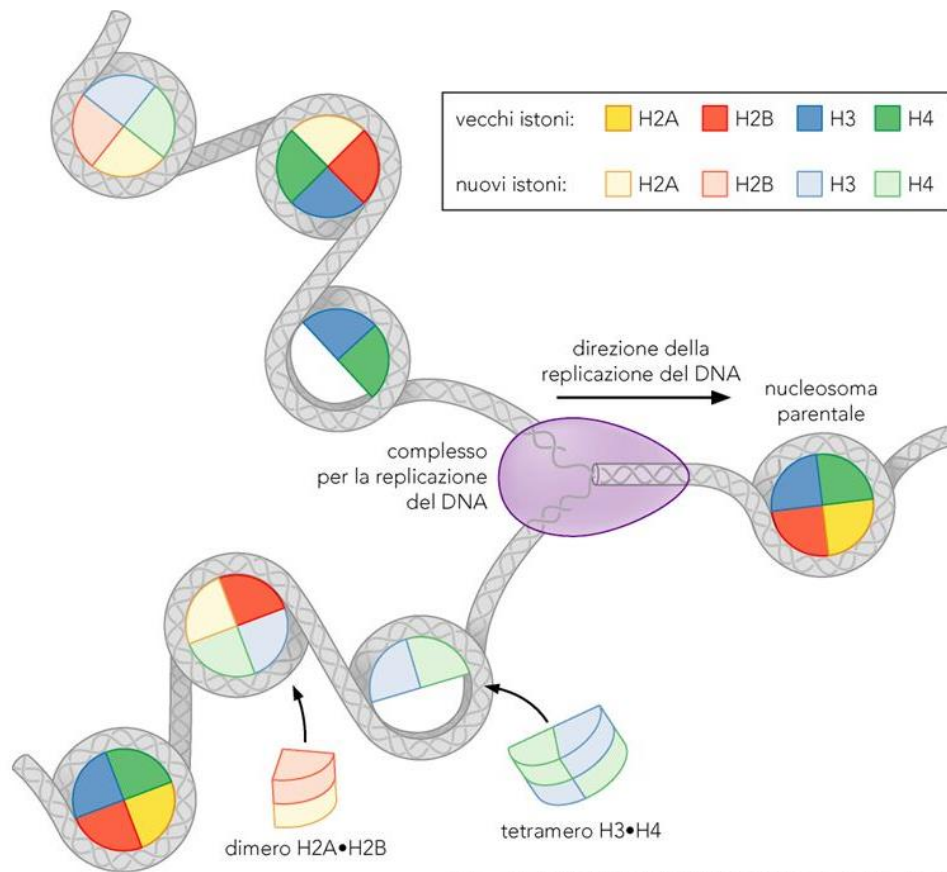
Durante la replicazione l'ottamero istonico si disassembla man mano che la DNA pol III avanza.

Il disassemblaggio e ri-assemblaggio dell'ottamero è mediato da «**histone chaperones**» che in alcuni casi sono associate alla DNA pol.

I due dimeri H2A-H2B si mescolano con gli istoni di nuova sintesi.

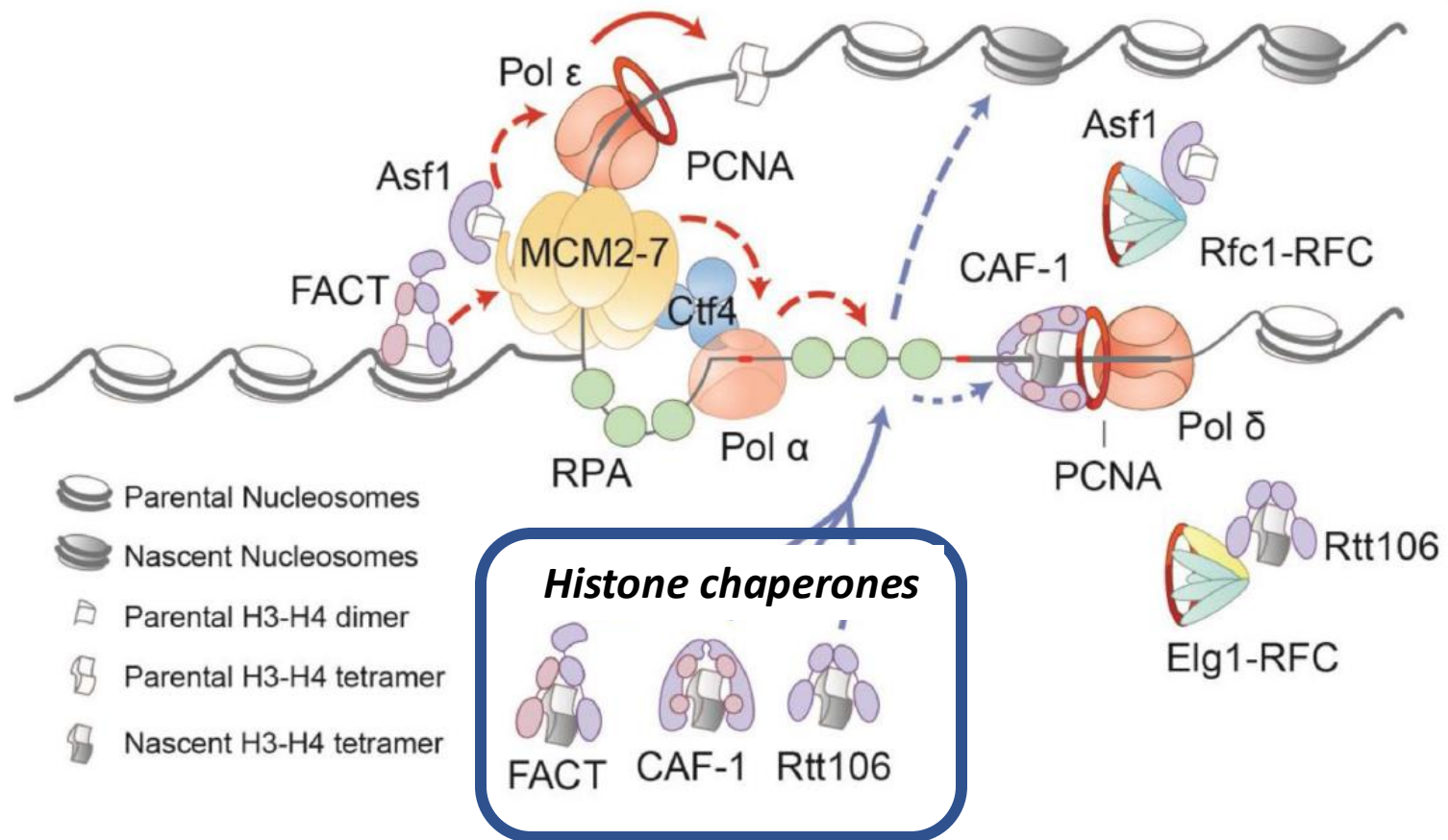
Il tetramero H3-H4 , che resta assemblato, si riassocia al DNA (parentale o neosintetizzato)

Replicazione del DNA nucleosomico



Watson et al., BIOLOGIA MOLECOLARE DEL GENE, Zanichelli editore S.p.A.

- La sintesi è assicurata dei **geni codificanti gli istoni** che sono ripetuti una ventina di volte nel genoma dei vertebrati, i quali sono **trascritti** specificamente durante la **fase S** del ciclo cellulare. Il mRNA sarà anche velocemente degradato alla fine della fase S
- L'eredità dei tetrameri H3-H4 parentali** in posizioni specifiche permette la **trasmissione delle modificazioni delle code istoniche** tramite il reclutamento di enzimi specifici. In questo modo anche **lo stato della cromatina è trasmesso** dalla molecola madre alla molecola figlia
- L'assemblaggio avviene appena c'è lo spazio sul DNA per ricostruire il nucleosoma completo. Questo processo necessita di «histone chaperones» come CAF1



La maggior parte degli **istoni** che erano nella molecola parentale vengono **distribuiti tra molecole madre e figlie**, ma bisogna supplire anche dei **nuovi istoni** per completare i nucleosomi.

Le proteine istoniche vecchie o neosintetizzate si assembleranno nelle molecole figlie o madre nello stesso punto dove erano ma **la distribuzione dei vecchi istoni tra molecole madre o figlia sarà casuale**

Replicazione del DNA nucleosomico: Istoni ed eredità epigenetica

Le **code istoniche dei vecchi istoni conservano le modificazioni chimiche** che avevano nel DNA parentale prima della distribuzione nelle cellule figlie. Ora però, alcuni di essi sono presenti sul filamento vecchio, ma anche su quello nuovo (si **ridistribuiscono in modo “casuale” tra filamento vecchio e nuovo**).

Gli **istoni nuovi acquisiscono le modifiche delle code istoniche che trovano nel DNA complementare**. In questo modo entrambe le cellule figlie avranno non solo lo stesso DNA, ma anche le **stesse modifiche epigenetiche** della molecola madre. Il DNA serve non solo come stampo per il nuovo DNA, ma anche per indicare quali modifiche istoniche attuare.

*Si intende per **Epigenetica**, tutte quelle modifiche che possono alterare l'espressione genica **senza alterare la sequenza genomica stessa**. E questa modifiche sono ereditabili e reversibili*

Quindi per **eredità epigenetica** noi intendiamo quelle modifiche epigenetiche che le cellule figlie hanno ereditato dalla cellula madre, come le modifiche istoniche che regolano la organizzazione cromatinica e la espressione genica.