

Corso di
**Metodologie diagnostiche di
Biochimica e di Biologia molecolare**
modulo di Biologia molecolare

A.A. 2012/2013

Michela A. Denti
denti@science.unitn.it

Lezione 3:
Replicazione, riparazione e ricombinazione del
DNA

Lezione 3

(4 ottobre 2012)

- La replicazione del DNA
- Il mantenimento dei telomeri.
- La mutabilità e la riparazione del DNA

Allison cap. 7

Alberts cap. 5

Watson cap. 8, 9,

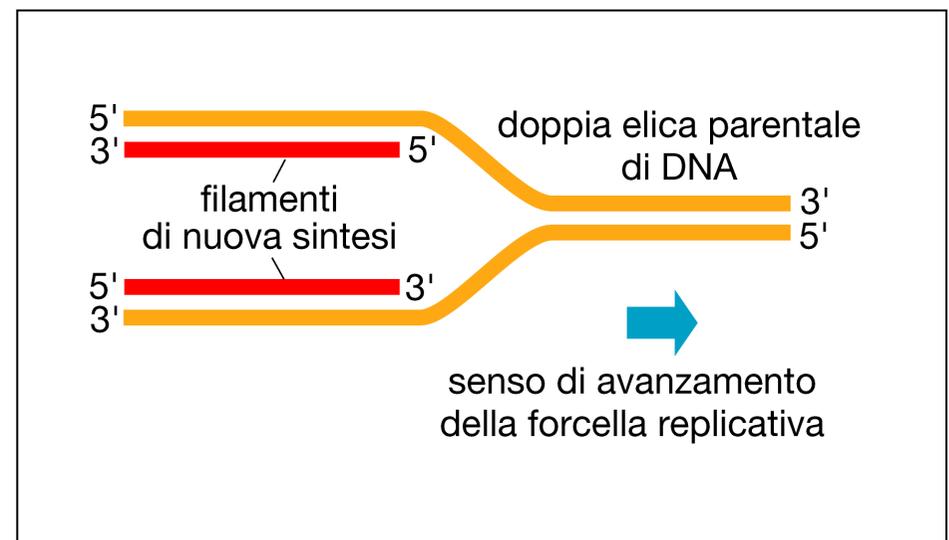
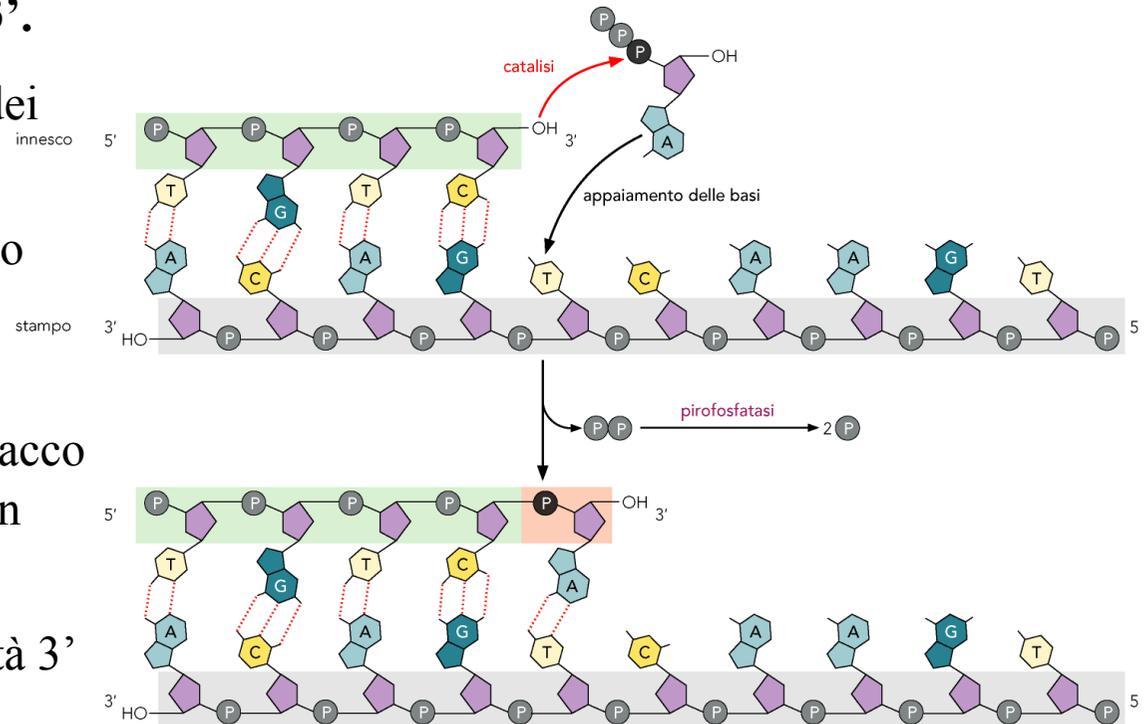
La sintesi di DNA avviene da 5' a 3'.

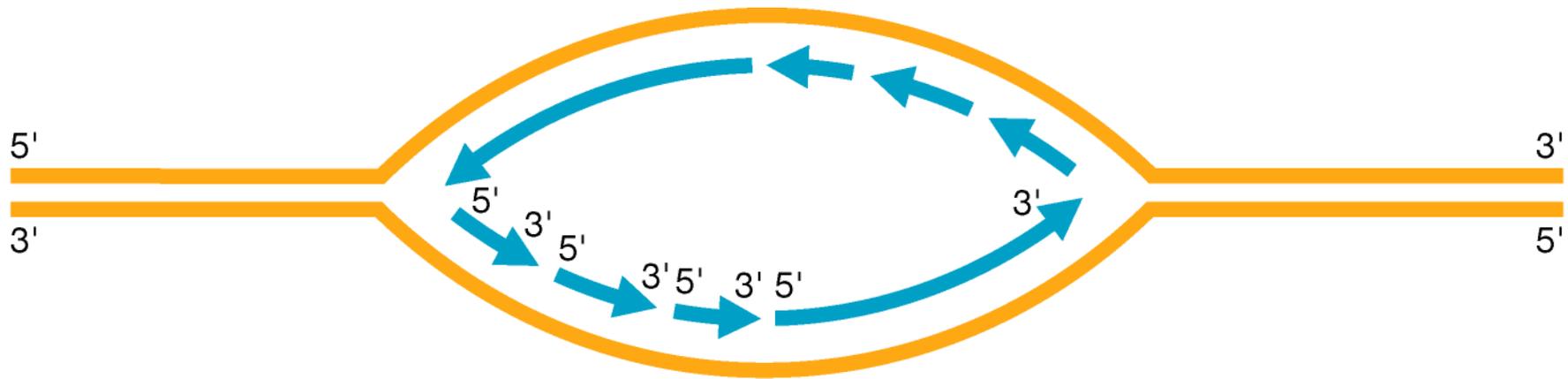
Il filamento stampo stabilisce quali dei quattro dNTP debba essere aggiunto.

Il dNTP che si appaia con il filamento stampo è altamente favorito per l'aggiunta al filamento in crescita.

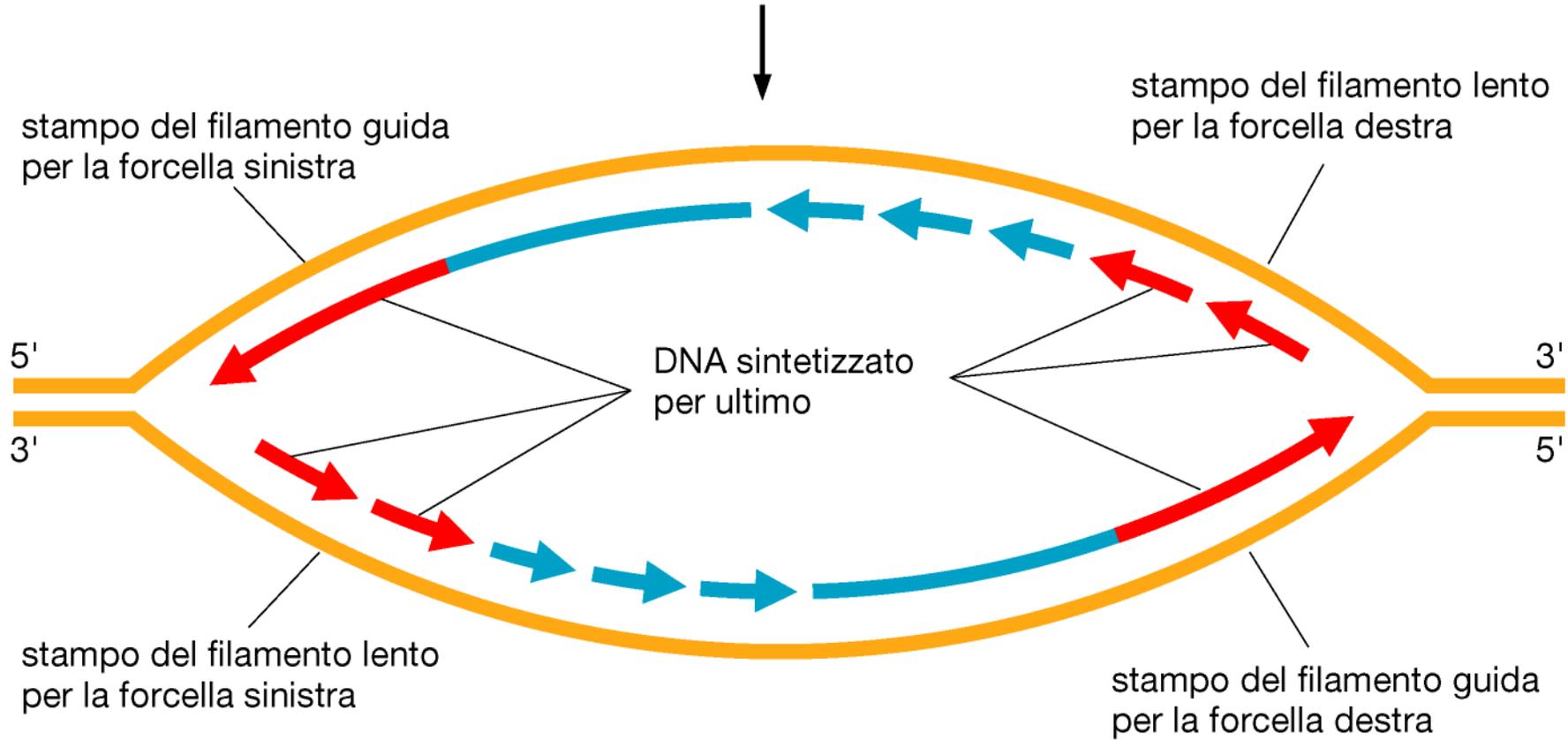
La sintesi del DNA è iniziata dall'attacco nucleofilo del fosfato α del dNTP in entrata.

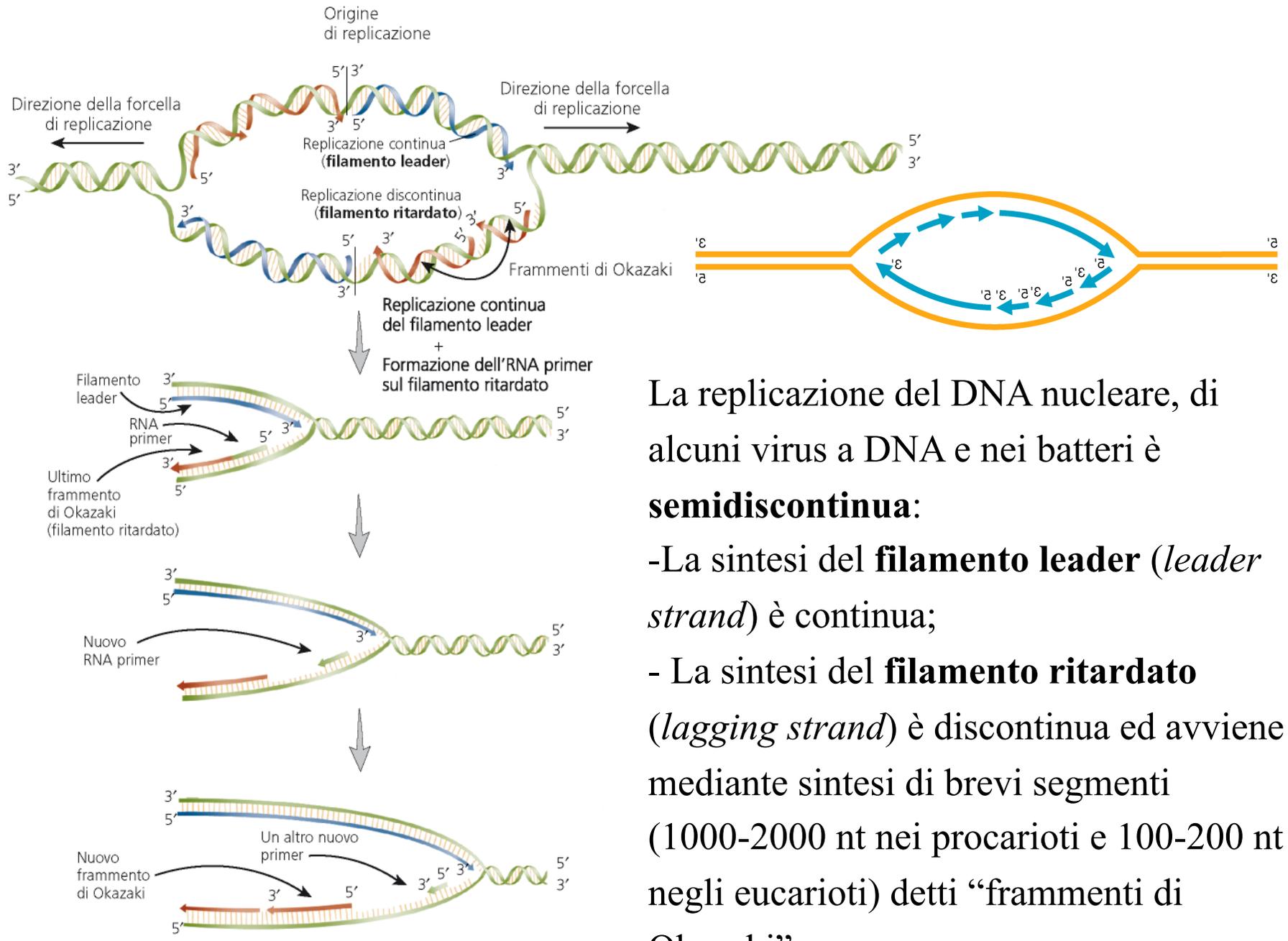
Ciò porta all'estensione dell'estremità 3' di un nucleotide e al rilascio di una molecola di pirofosfato. La **pirofosfatasi** idrolizza rapidamente il pirofosfato in due molecole di fosfato.





← direzione di spostamento della forcella replicativa →





La replicazione del DNA nucleare, di alcuni virus a DNA e nei batteri è **semidiscontinua**:

- La sintesi del **filamento leader** (*leader strand*) è continua;
- La sintesi del **filamento ritardato** (*lagging strand*) è discontinua ed avviene mediante sintesi di brevi segmenti (1000-2000 nt nei procarioti e 100-200 nt negli eucarioti) detti “frammenti di Okazaki”

Le DNA polimerasi sono gli enzimi che catalizzano la sintesi del DNA

DNA polimerasi procariotiche

- **DNA polimerasi I** (rimozione del primer, riempimento delle interruzioni fra i frammenti di Okazaki e nella via di riparazione per escissione dei nucleotidi)
- **DNA polimerasi III** (polimerasi replicativa principale, riparazione per escissione dei nucleotidi)
- **DNA polimerasi II, IV e V** (meccanismi di riparazione)

Le DNA polimerasi eucariotiche

Replicasi ad alta fedeltà

- **pol α** (innesco della sintesi del DNA durante la replicazione e la riparazione)
- **pol δ** (replicazione del DNA del filamento leader durante la replicazione e la riparazione)
- **pol ϵ** (replicazione del DNA del filamento ritardato durante la replicazione e la riparazione)
- **pol γ** (replicazione e riparazione del DNA mitocondriale)

Riparazione ad alta fedeltà

- **pol β e pol η**

Riparazione incline all'errore

- **pol ζ , pol θ , pol ι , pol κ , pol λ , pol μ , pol ν**

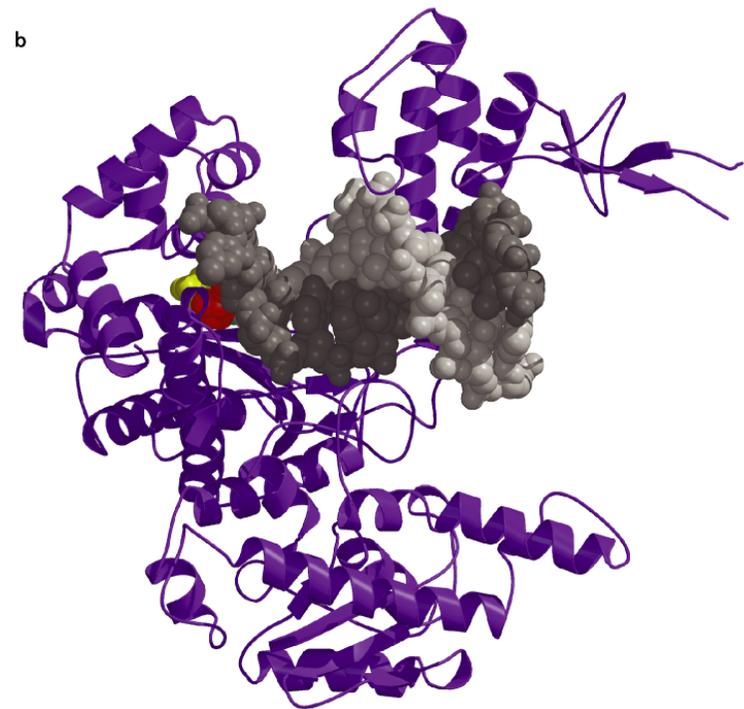
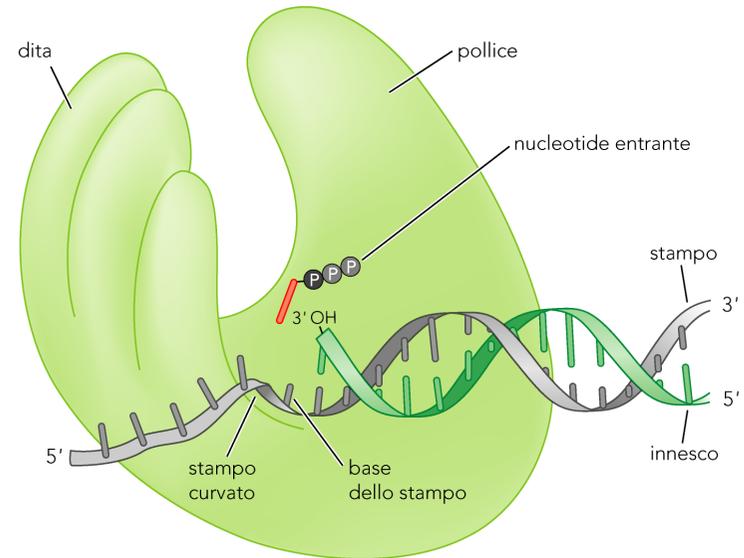
La struttura della DNA polimerasi fa pensare ad una mano destra.

Il DNA appena sintetizzato è associato con il palmo ed il sito catalitico è posizionato fra le dita ed il pollice.

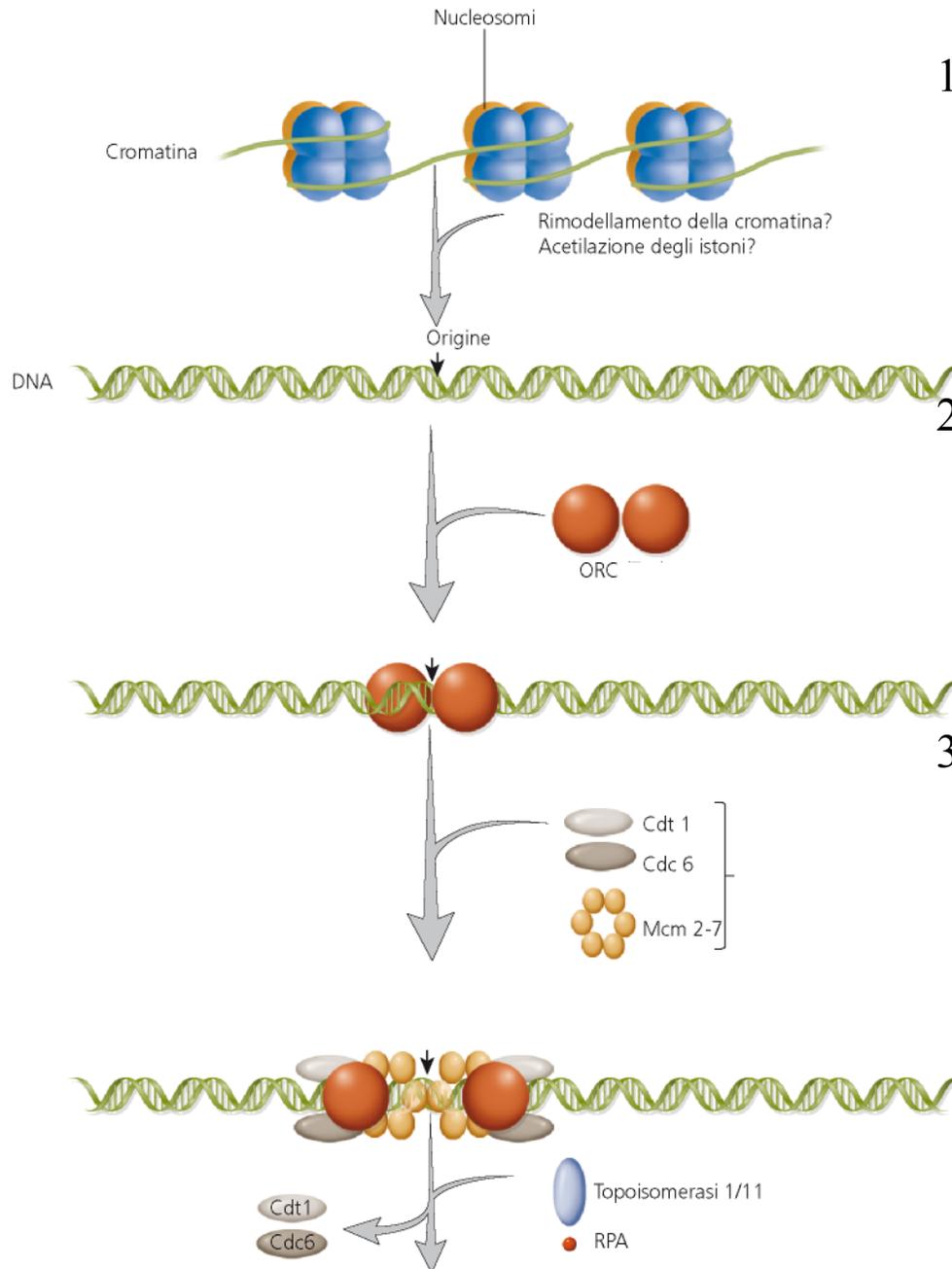
La parte di singolo filamento dello stampo è fortemente ripiegata e non riesce a passare fra il pollice e le dita.

Le dita ed il pollice sono composte di eliche α .

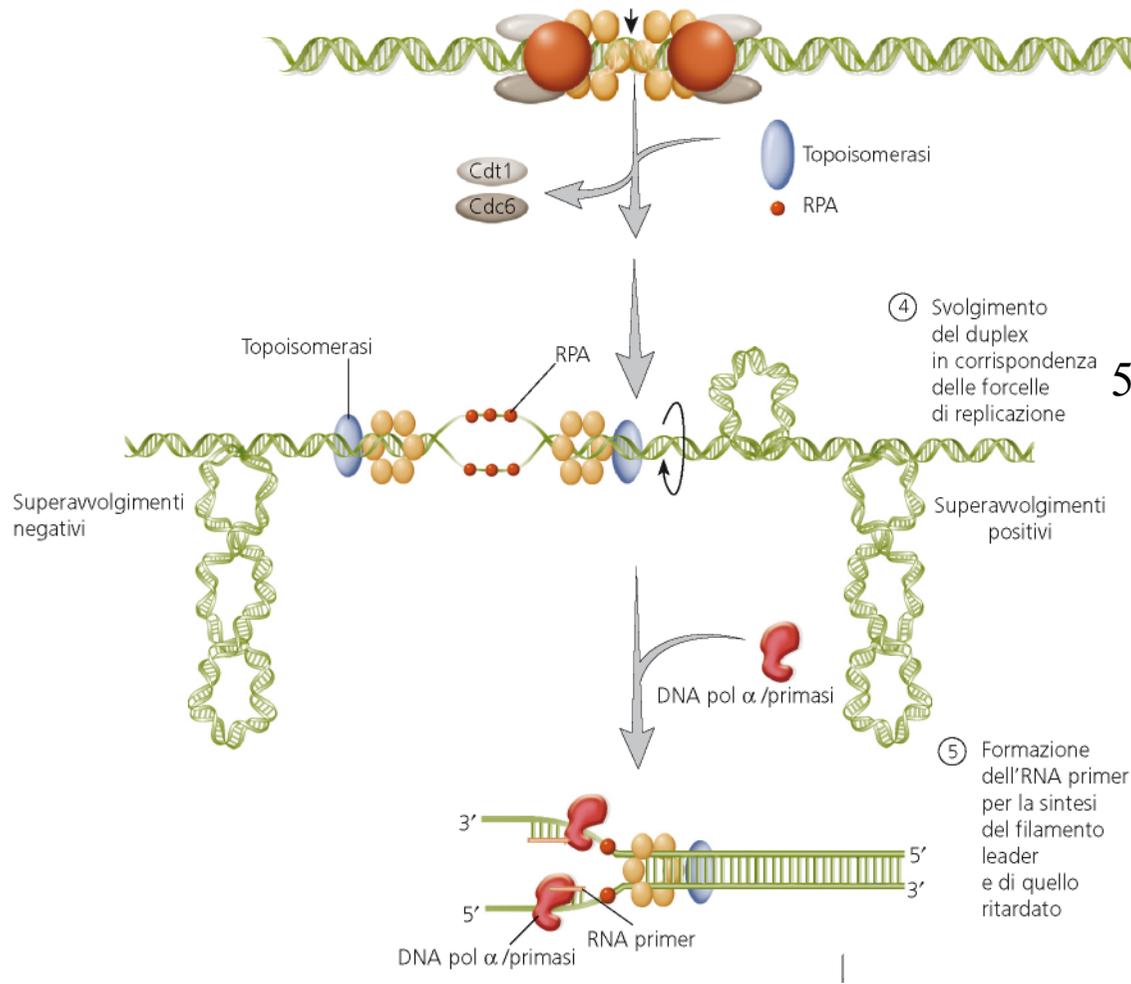
Il dNTP che deve essere incorporato è colorato in rosso (la base ed il desossiribosio) ed in giallo (il trifosfato). Il filamento stampo del DNA è mostrato in grigio scuro mentre l'innescio in grigio chiaro.



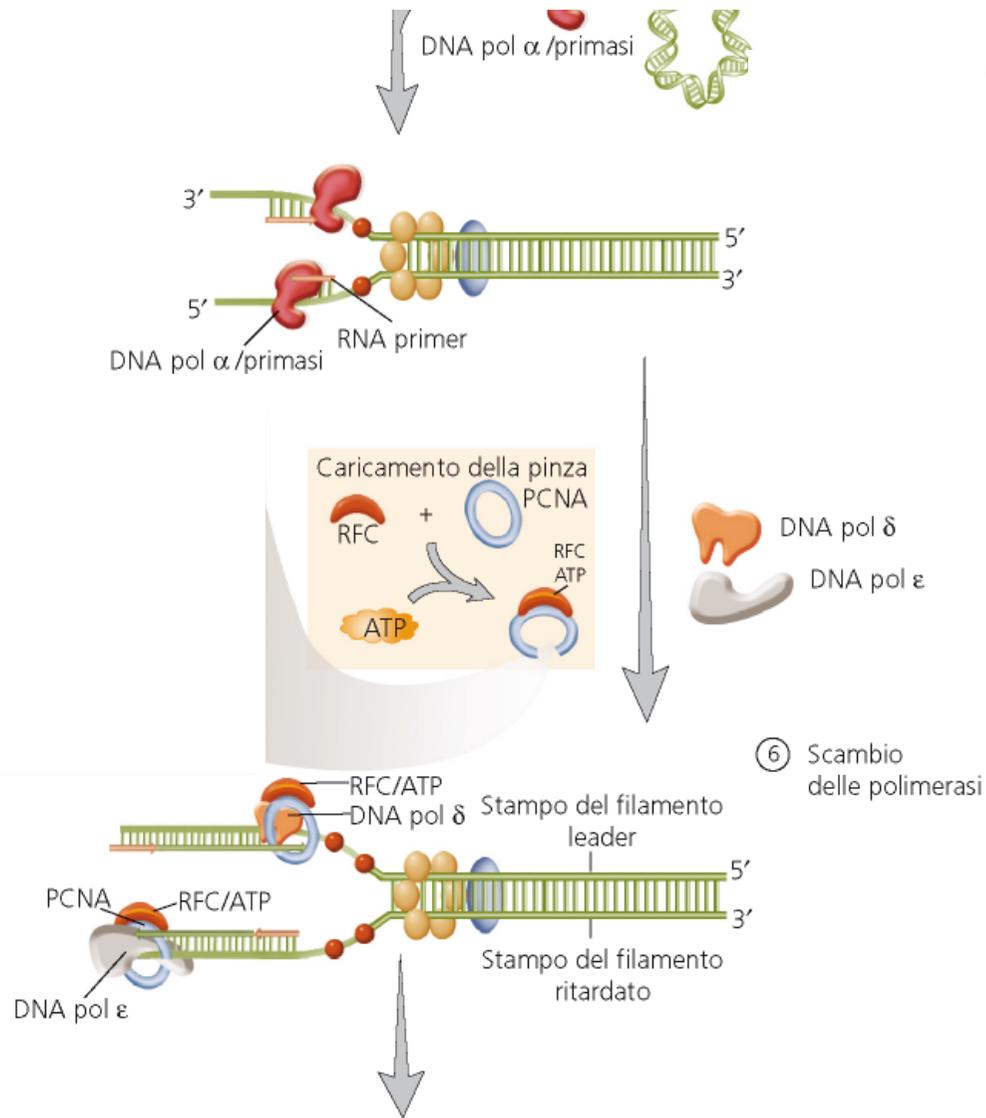
Il meccanismo di replicazione del DNA eucariotico



1. La **rimozione degli istoni** a livello delle origini di replicazione permette l'accesso del macchinario di replicazione al DNA stampo.
2. Formazione del **complesso di pre-replicazione** (pre-RC): associazione del complesso di riconoscimento dell'origine (**ORC**) all'origine.
3. Abilitazione alla replicazione: ORC recluta due altre proteine (**Cdc6** e **Cdt1**) e insieme reclutano il complesso elicastico **Mcm2-7**. Questo passaggio è regolato durante il ciclo cellulare, per assicurare che il DNA si replichi solo una volta durante il ciclo cellulare.

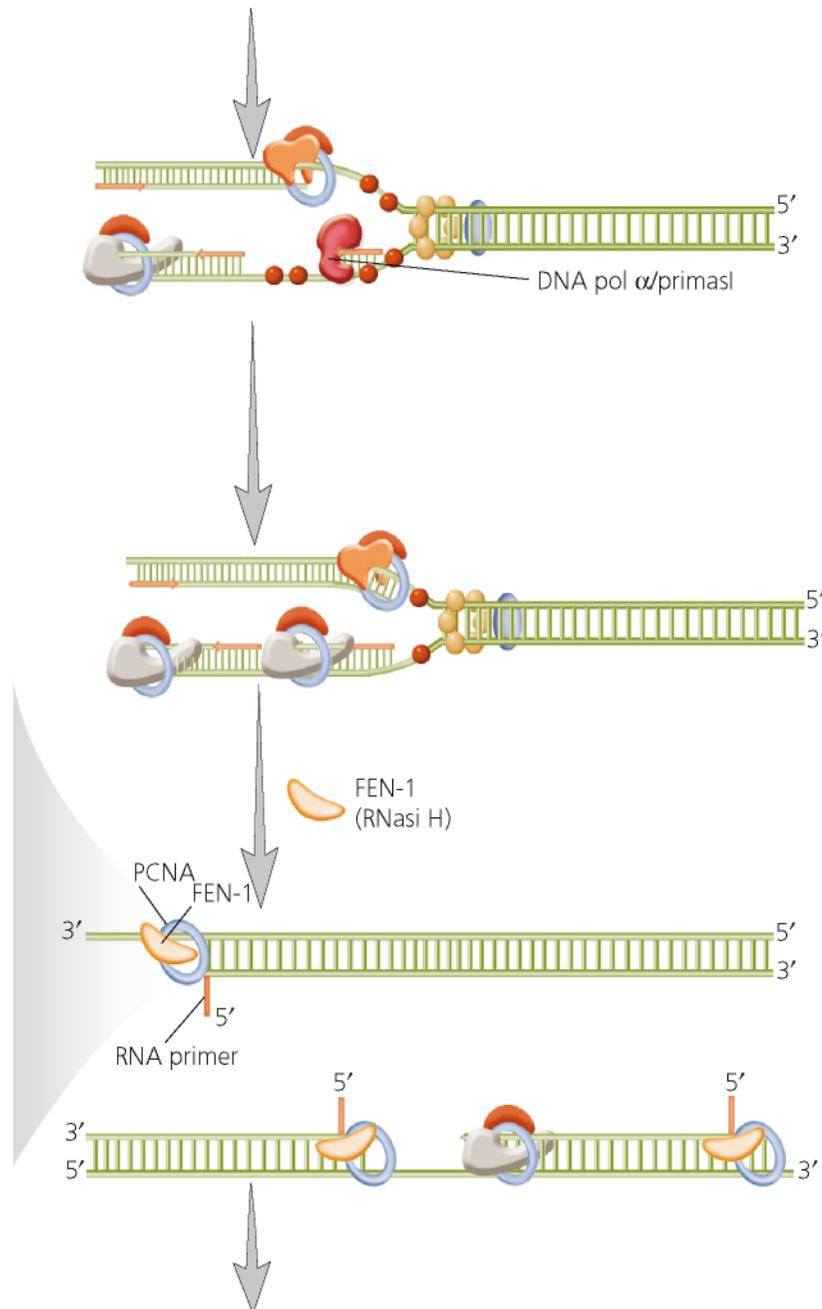


4. L'attività elicastica **svolge** il duplex. Le **topoisomerasi** risolvono i superavvolgimenti. Cdc6 e Cdt1 sono rilasciate, vengono reclutati altri fattori (es. la proteina di replicazione A (**RPA**)).
5. Viene reclutata la **DNA polimerasi α / primasi** che sintetizza un **primer di RNA** (10 nt) e lo estende brevemente (20-30 basi di DNA. DNA iniziatore = DN*A*_i).



⑥ Scambio delle polimerasi

6. Scambio delle polimerasi: La giunzione primer-stampo è riconosciuta dal fattore **RFC** che assembla una pinza scorrevole (**PCNA**) a livello di questi siti. La **DNA polimerasi δ** o la **DNA polimerasi ϵ** riconoscono questo primer e iniziano la sintesi rispettivamente del filamento leader e di quello ritardato.



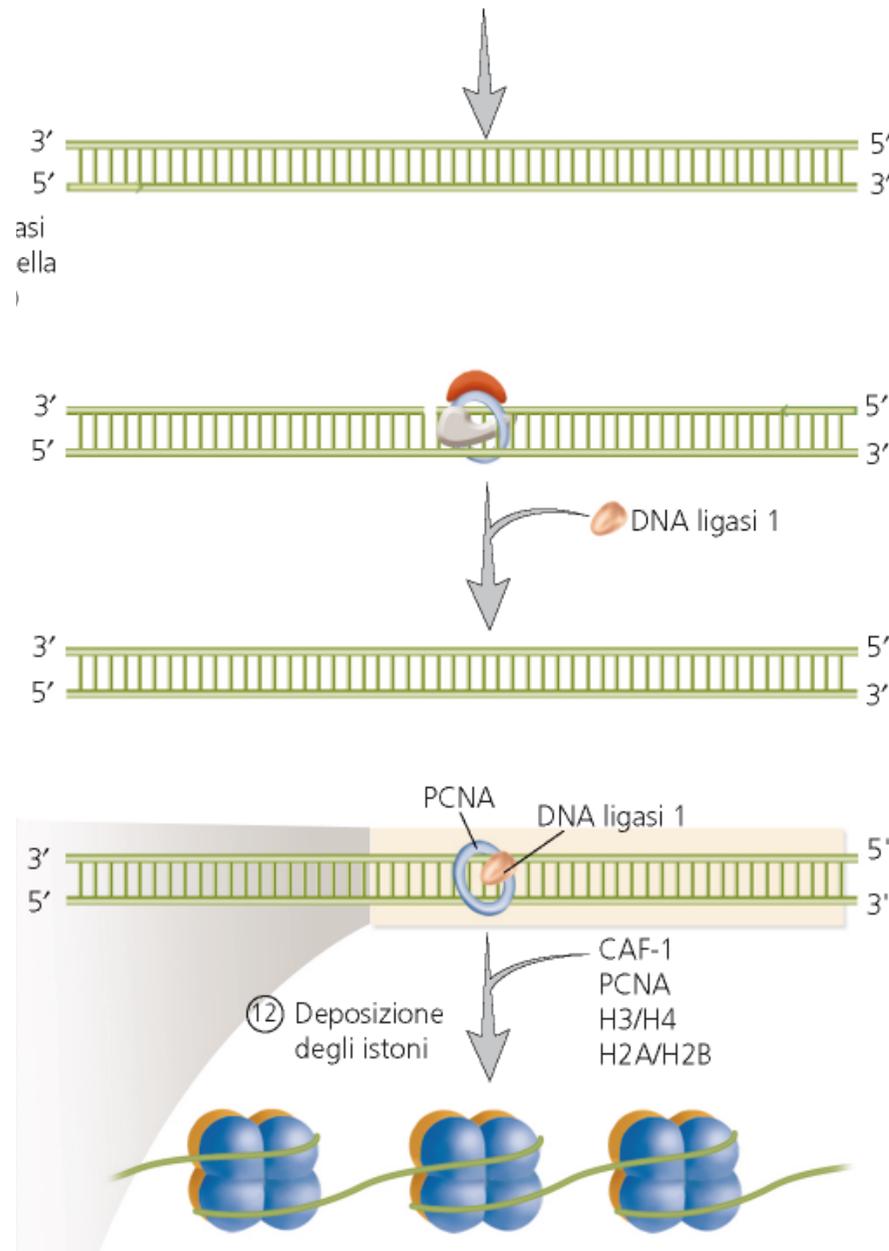
7. Allungamento del filamento leader e del filamento ritardato.

8. Sintesi continua del filamento leader (**pol δ**); scambio delle polimerasi sul filamento ritardato (**pol α** / **pol ϵ**).

9. Gli RNA primer sono degradati dall'attività endonucleasica di **FEN-1**

Endonucleasi= enzima che taglia il legame fosfodiesterico che unisce nucleotidi adiacenti in un sito interno della catena di DNA (DNasi) o RNA (RNasi).

Esonucleasi= enzima che rimuove i nucleotidi dall'estremità della catena di DNA o RNA, spezzando il legame fosfodiesterico finale.

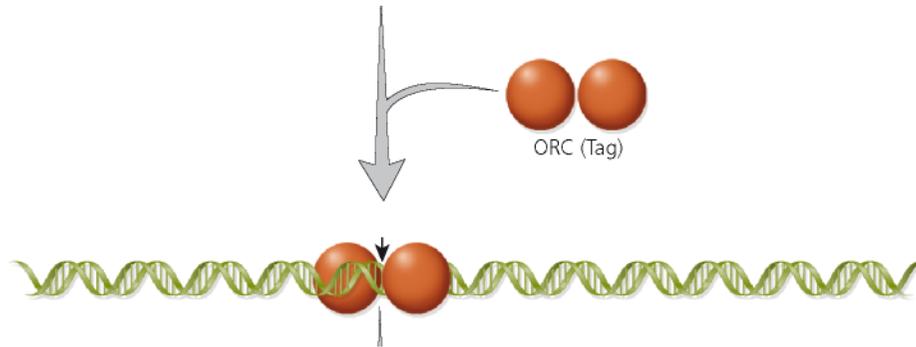


10. Riempimento delle interruzioni lasciate dalla rimozione del primer, mediata da **DNA pol ϵ** .

11. Formazione di un legame fosfodiesterico fra i frammenti di Okazaki adiacenti per azione della **DNA ligasi I** in associazione con PCNA.

12. Deposizione degli istoni. I nucleosomi si riasssemblano sul DNA nascente tramite interazioni con il fattore di assemblaggio della cromatina (CAF-1) e PCNA.

Le origini di replicazione



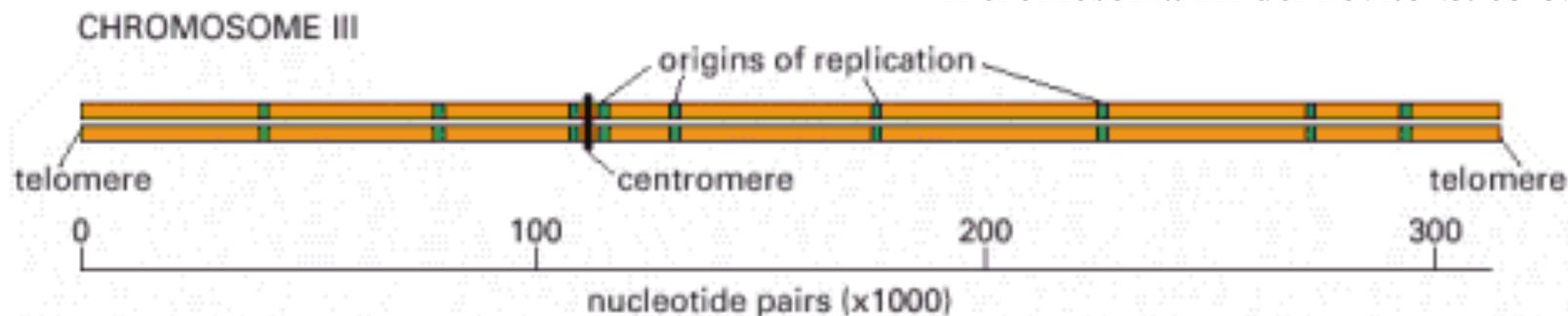
Associazione del complesso di riconoscimento dell'origine (**ORC**) all'origine.

La maggior parte dei **batteri** possiede una **singola origine** ben definita.

Negli **eucarioti** la replicazione inizia a livello di **molti siti** interni separati circa 50 kb. Il topo ha 25.000 origini, l'uomo 10.000-100.000 origini.

Le sequenze delle origini sono **ricche in AT** ed hanno **superavvolgimenti negativi** (si aprono più facilmente).

Il cromosoma III del lievito *S. cerevisiae*.



La **velocità** globale della replicazione è determinata dal **numero** delle origini usate e dalla **frequenza** con cui queste danno inizio a replicazione.

Durante lo sviluppo precoce i siti di origine sono attivati uniformemente, più tardi la divisione cellulare rallenta: alcune origini sono attivate selettivamente ed altre sono soppresse.

Le sequenze delle origini dei **mammiferi** sono prive di una sequenza consenso facilmente identificabile.

Nel **lievito** gemmante *Saccharomyces cerevisiae* si trovano invece origini di replicazione con **sequenza consenso** chiamata **ARS** (sequenza che si replica autonomamente) di 11 bp.

5'- T/A T T T A Y R T T T T/A -3'

(dove Y è la pirimidina (pYrimidine)
e R è la purina (puRine)).

Sequenza consenso (o sequenza canonica)

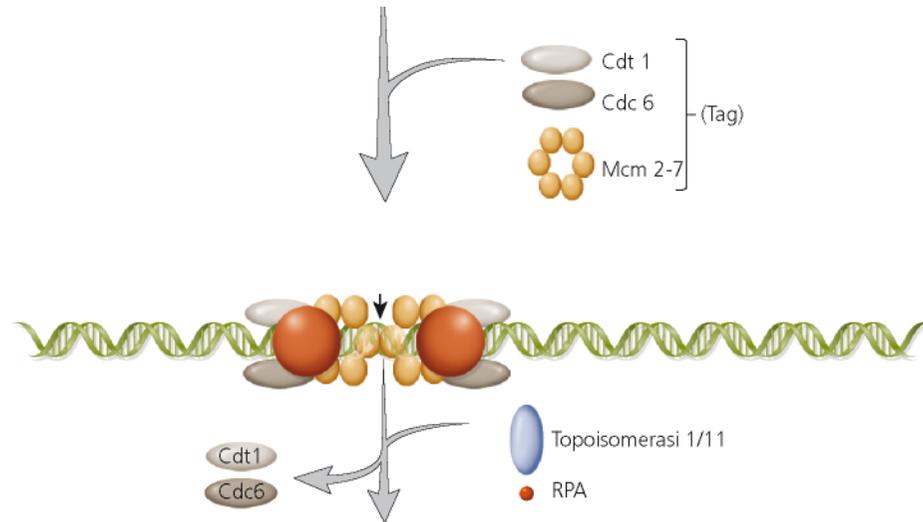
è la forma “ideale” di una sequenza di DNA presente in forme leggermente diverse in regioni del genoma od organismi differenti, ma che si ritiene abbiano la stessa funzione.

La sequenza consenso contiene in ciascuna posizione il nucleotide presente più spesso.



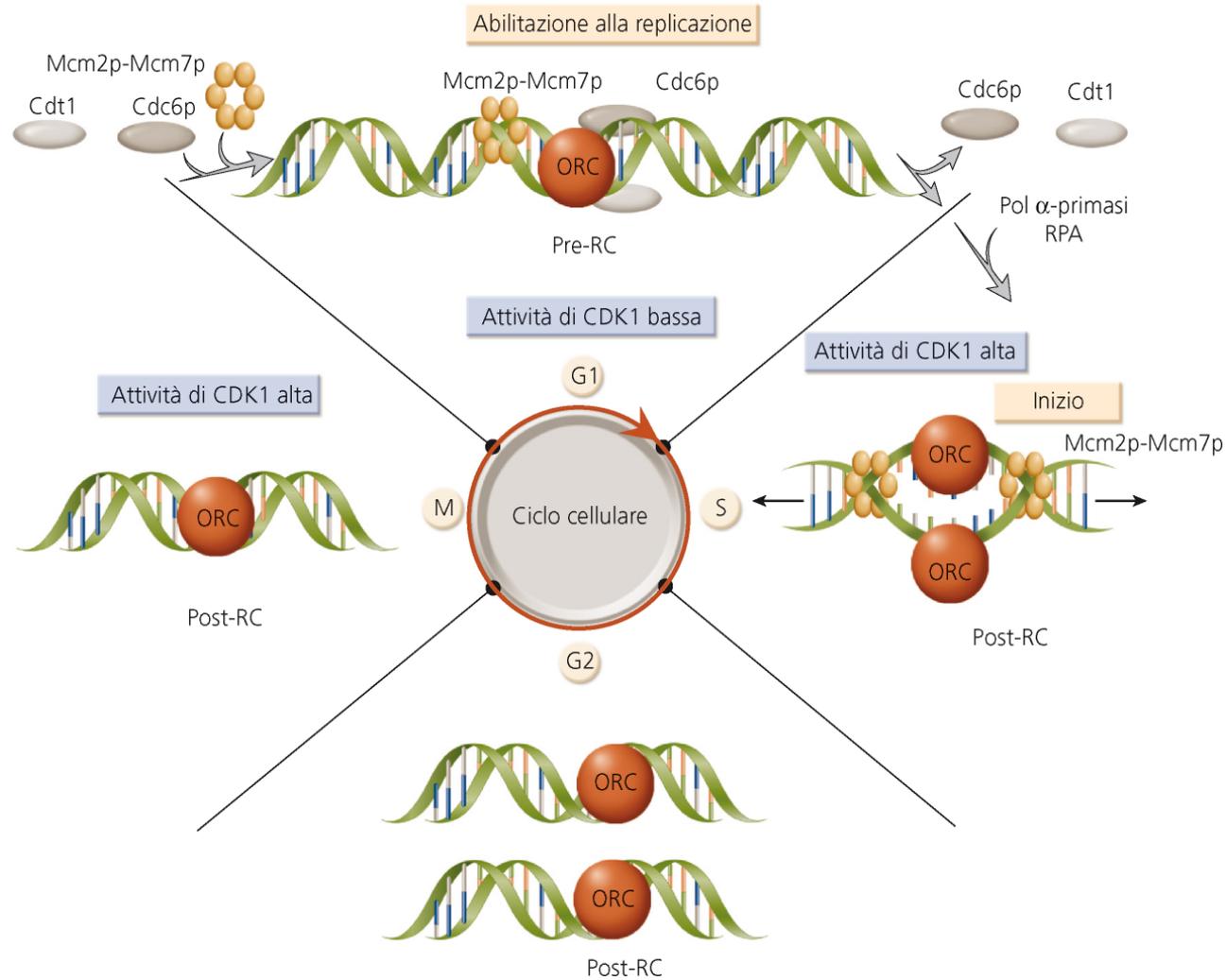
A **sequence logo** showing the most conserved bases around the [initiation codon](#) from all human [mRNAs](#)

Abilitazione alla replicazione

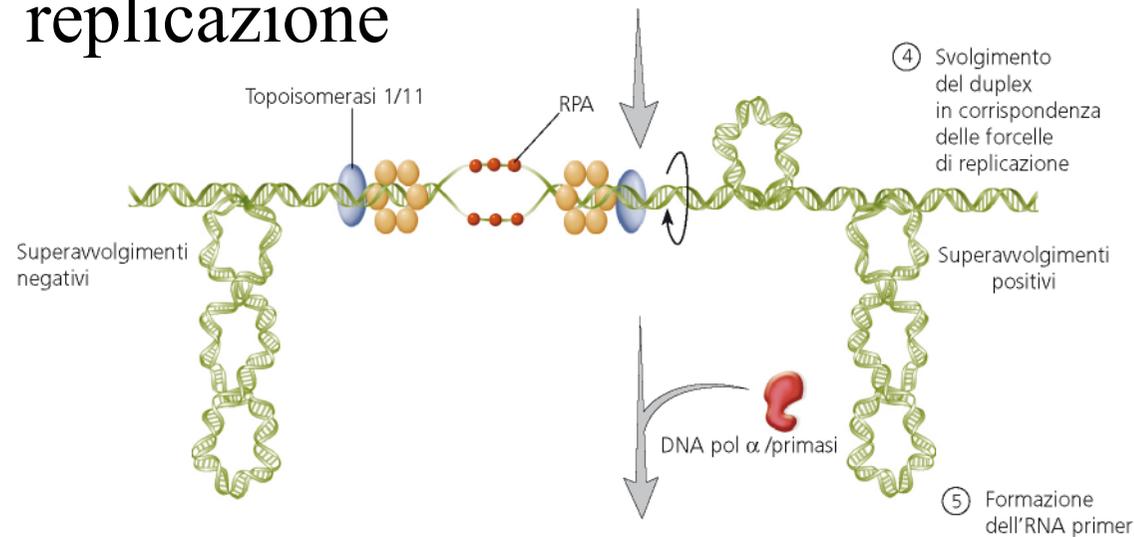


Un sistema di abilitazione alla replicazione assicura negli eucarioti che il DNA si **replichi una volta soltanto per ciclo cellulare**, tramite una stretta regolazione della formazione e dell'attivazione dei complessi di pre-replicazione da parte di **chinasi dipendenti da cicline (CDK)**.

CDK fosforila le proteine di abilitazione nel passaggio alla fase S e ne inibisce l'attività. Questo blocca la formazione dei complessi di pre-replicazione e assicura la replicazione soltanto una volta per ciclo cellulare.



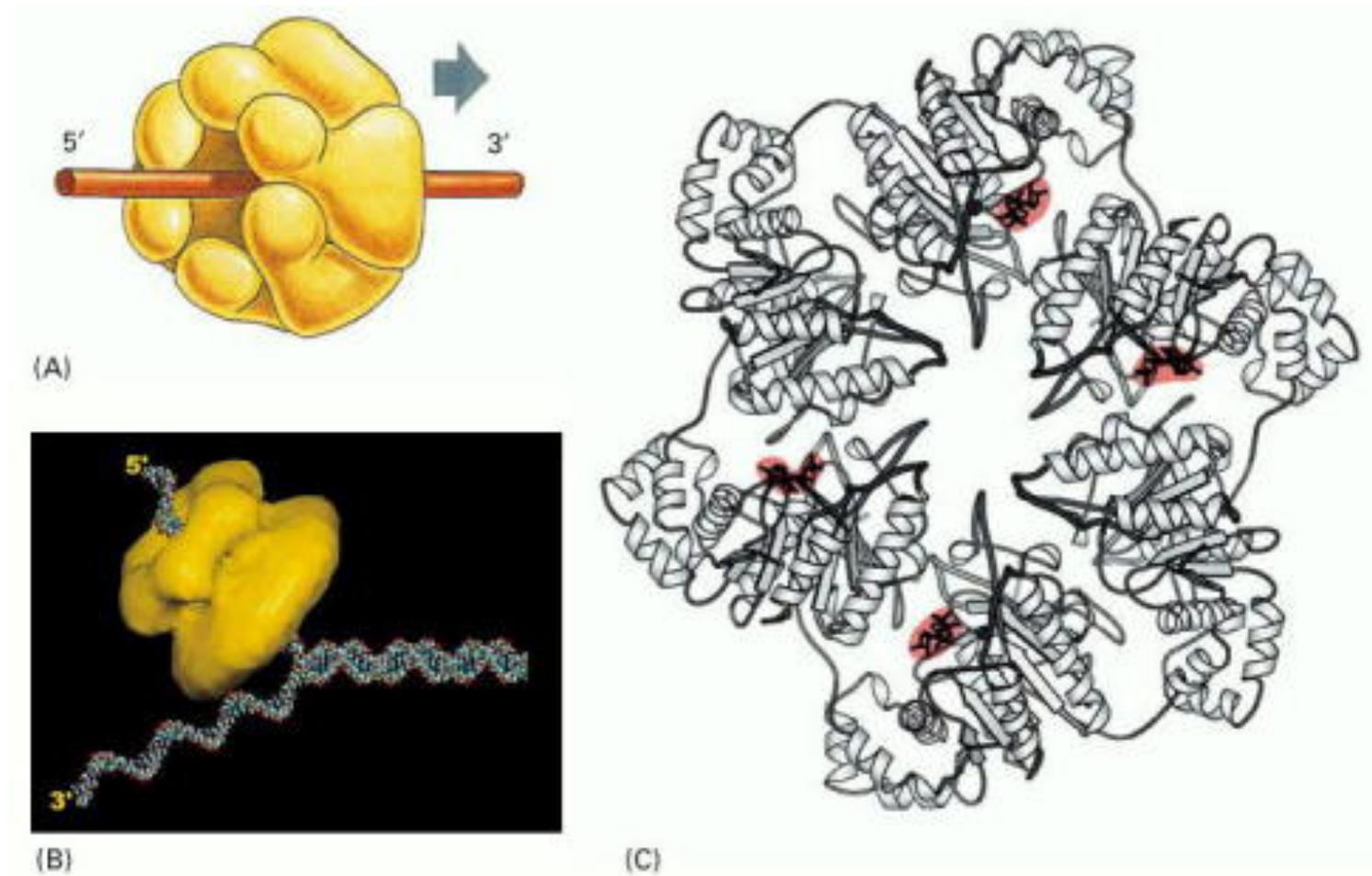
Svolgimento del duplex a livello delle forcelle di replicazione



Le **DNA elicasi** sono enzimi che utilizzano l'energia dell'**ATP** per separare i due filamenti della doppia elica del DNA e catalizzano progressivamente la transizione da DNA a doppio filamento a DNA a singolo filamento nella direzione del movimento della forcella di replicazione.

Mcm2-7 si lega allo stampo del filamento leader e si sposta in direzione $3' \rightarrow 5'$

L'elicasi **DnaB** di *E. coli* si sposta in direzione $5' \rightarrow 3'$ e si lega allo stampo del filamento ritardato.

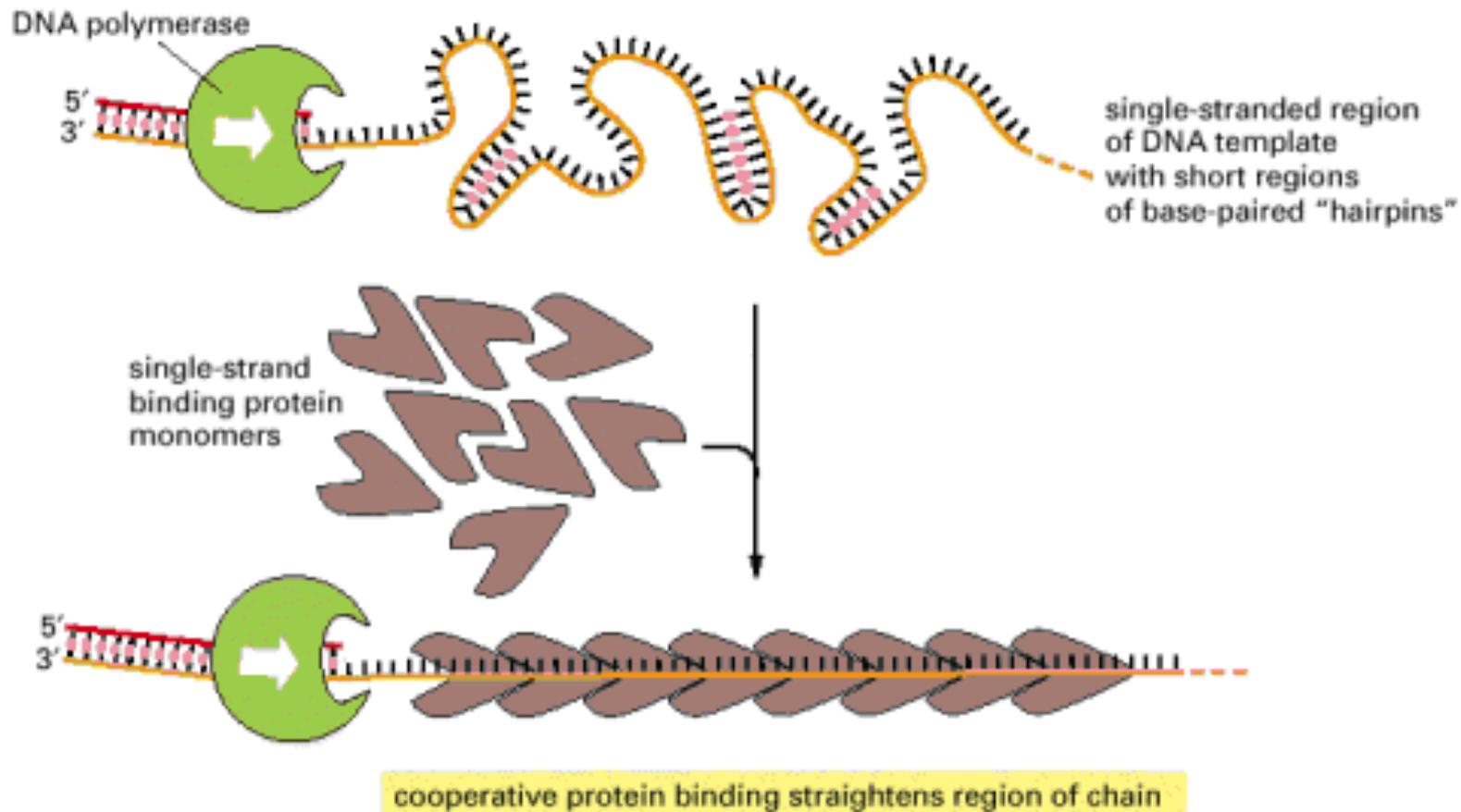


La struttura di una DNA elicasi.

(A) Diagramma schematico della proteina come anello esamerico.

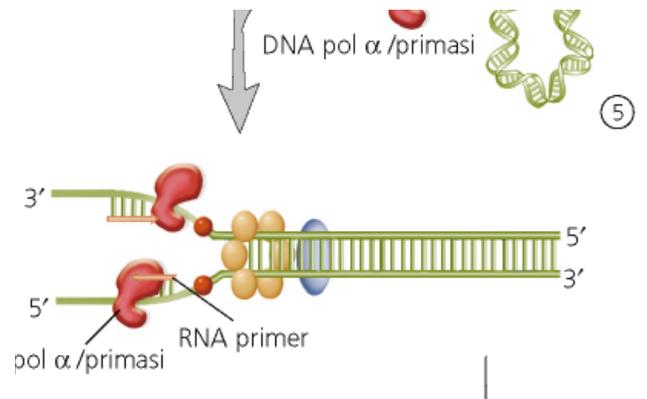
(B) Diagramma schematico che mostra una forcella di replicazione e l'elicasi **in scala**.

(C) Le sei subunità identiche legano ed idrolizzano l'ATP in maniera ordinata per far scorrere questa molecola lungo il filamento di DNA, che passa attraverso il foro centrale. In rosso le molecole di **ATP**.



Le RPA sono proteine associate al filamento singolo (SSB proteins = single-strand DNA-binding proteins) destabilizzano l'elica e mantengono separate le due catene, in modo che la polimerasi possano accedervi. Esse legano con legame cooperativo: ogni proteina "preferisce" legarsi vicino ad un'altra.

Formazione dell'RNA primer

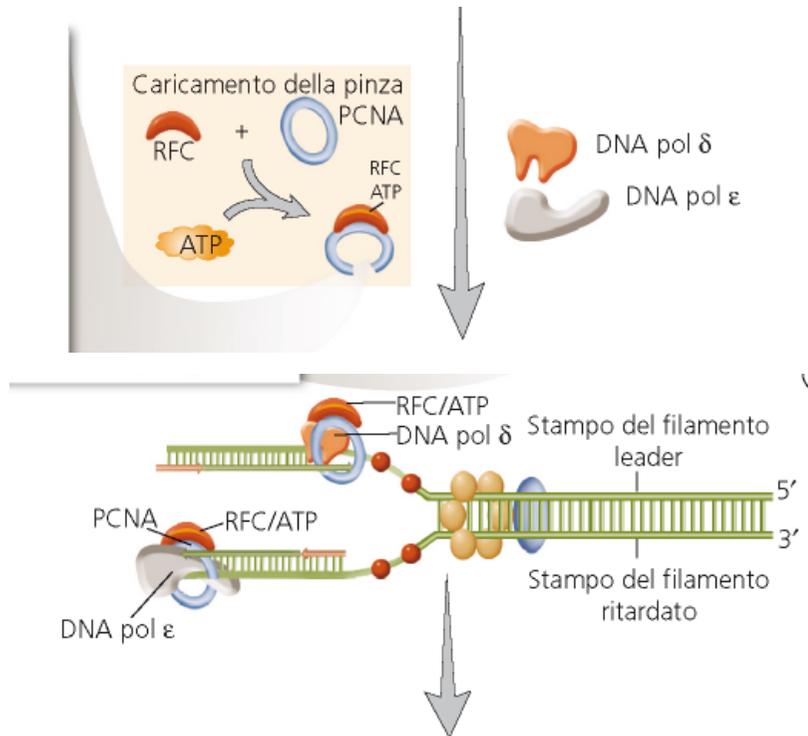


Le DNA polimerasi hanno bisogno di un innesco: un RNA primer creato *de novo*.

In *E. coli* un enzima chiamato **primasi** (una RNA polimerasi) sintetizza l'RNA primer (è in grado di iniziare una nuova catena polinucleotidica unendo due nucleotidi trifosfati).

Negli **eucarioti**, l'RNA primer è sintetizzato dalla DNA polimerasi α e dalla sua attività primasica associata (**pol α /primasi**): **10 nt di RNA** seguiti poi da **20-30 basi di DNA**.

Scambio delle polimerasi



In presenza di ATP, RFC (il “caricatore della pinza”) apre l’anello del PCNA, passa il DNA dentro l’anello e lo richiude.

Sul **filamento leader** è reclutata la DNA polimerasi δ e la sintesi è continua.

Sul **filamento ritardato** è reclutata la DNA polimerasi ϵ . Sono richiesti **cicli ripetuti** di passaggi dalla DNA polimerasi α alla DNA polimerasi ϵ ogni volta che si inizia un filamento di Okazaki.

Lo scambio delle polimerasi è regolato **dall’antigene nucleare delle cellule proliferanti (PCNA)**, dal fattore di replicazione (RFC) e dalla RPA.

Il PCNA agisce da “**pinza scorrevole**” per fare aumentare la processività delle DNA polimerasi.

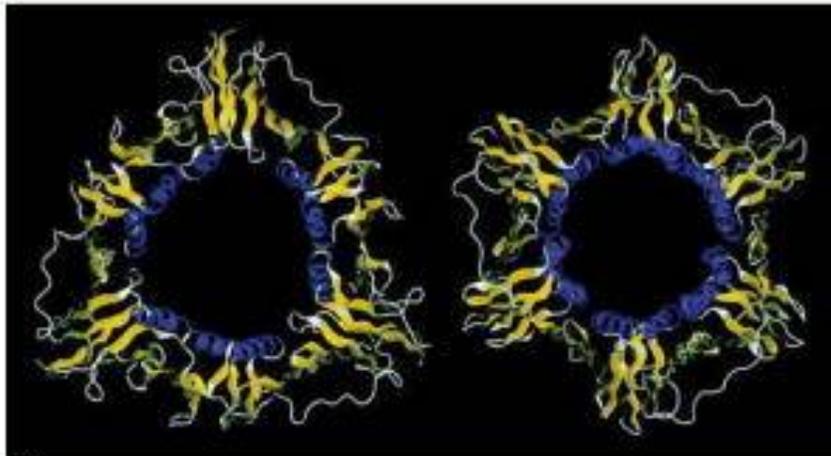
La pinza scorrevole che mantiene la DNA polimerasi sul DNA.



(A)

(A) Struttura della pinza di *E. coli*, determinata per cristallografia ai raggi X con una doppia elica di DNA aggiunta per mostrare come la proteina avvolge il DNA.

(B) Una proteina simile è presente negli eucarioti, come mostrato dal confronto tra la pinza di *E. coli* (*sinistra*) con il PCNA umano (*destra*).



(B)

Senza PCNA, la considerevole forza di torsione generata dalla produzione di DNA a doppia elica farebbe staccare la polimerasi dalla forcella di replicazione.

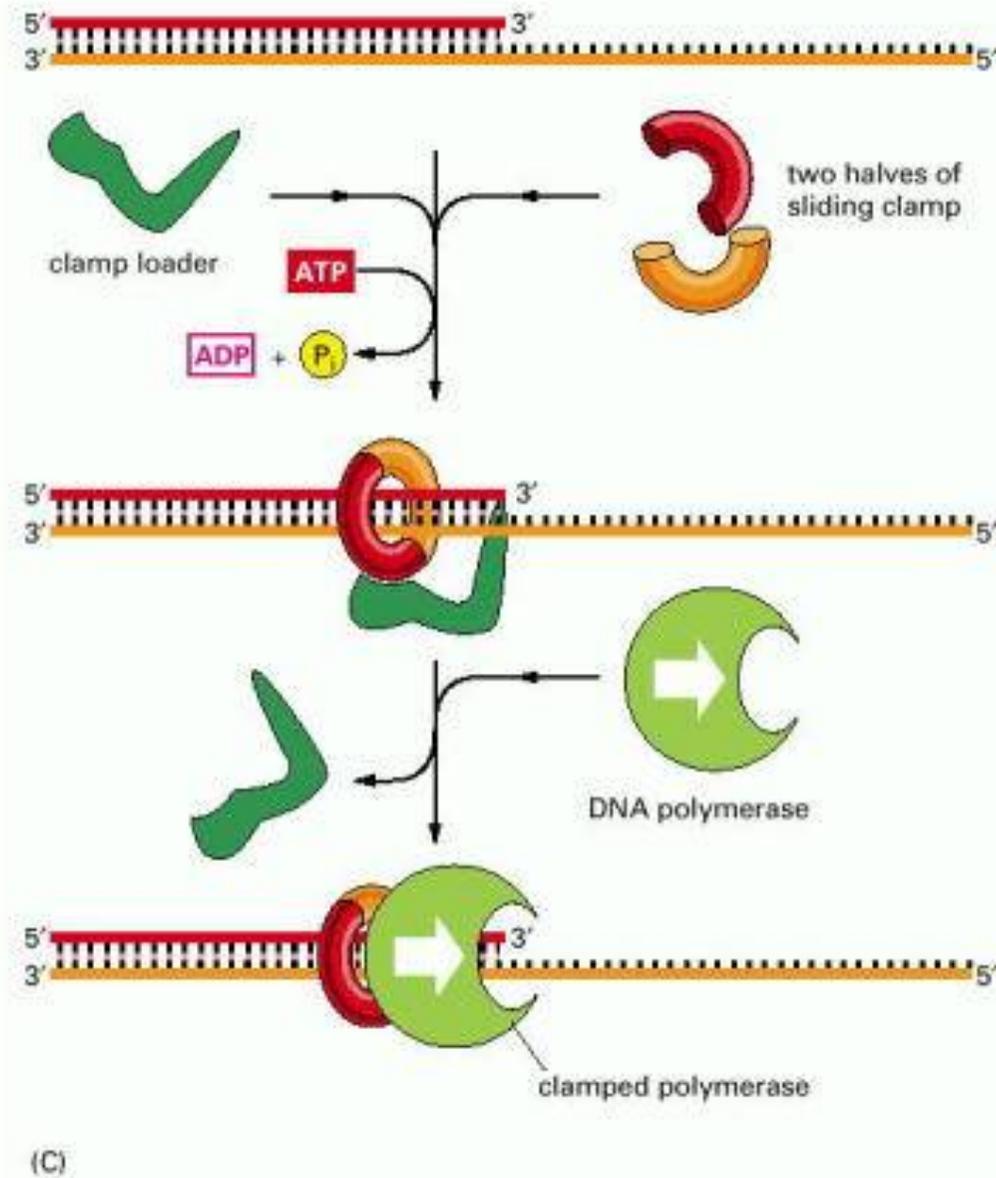
Il PCNA permette alla polimerasi di lasciare e riprendere la presa, impedendone il distacco.

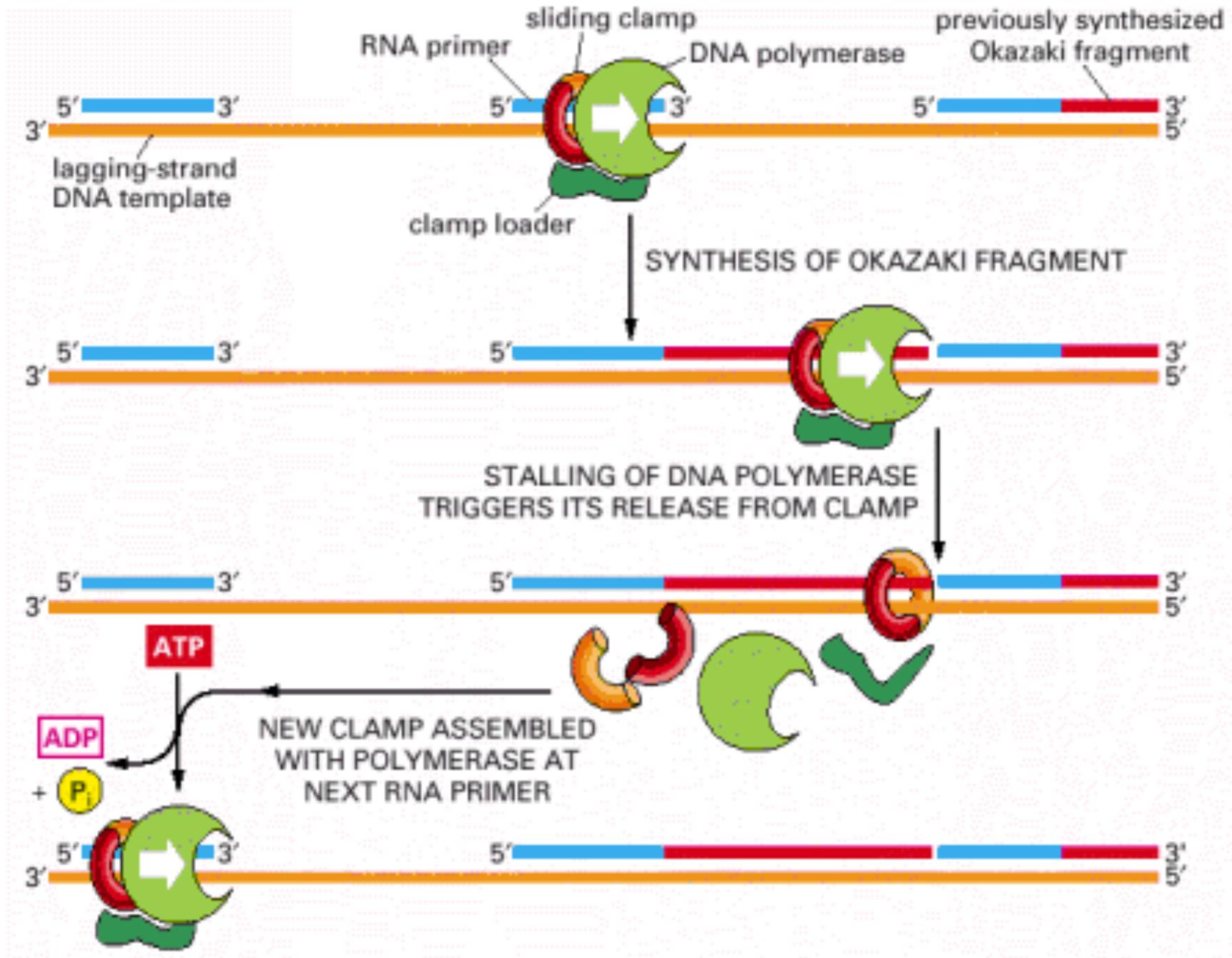
Sul filamento ritardato il PCNA posiziona rapidamente la polimerasi ad ogni nuovo filamento di Okazaki.

(C) Schema di come la pinza è
assemblata per collegare al DNA la
DNA polimerasi che si muove

Il caricatore della pinza si dissocia
in soluzione una volta che la pinza
è stata assemblata.

In una forcella di replicazione, il
caricatore della pinza rimane
vicino alla polimerasi sul filamento
ritardato, pronto ad assemblare una
nuova pinza all'inizio di ogni
nuovo filamento di Okazaki





A cycle of loading and unloading of DNA polymerase and the clamp protein on the lagging strand

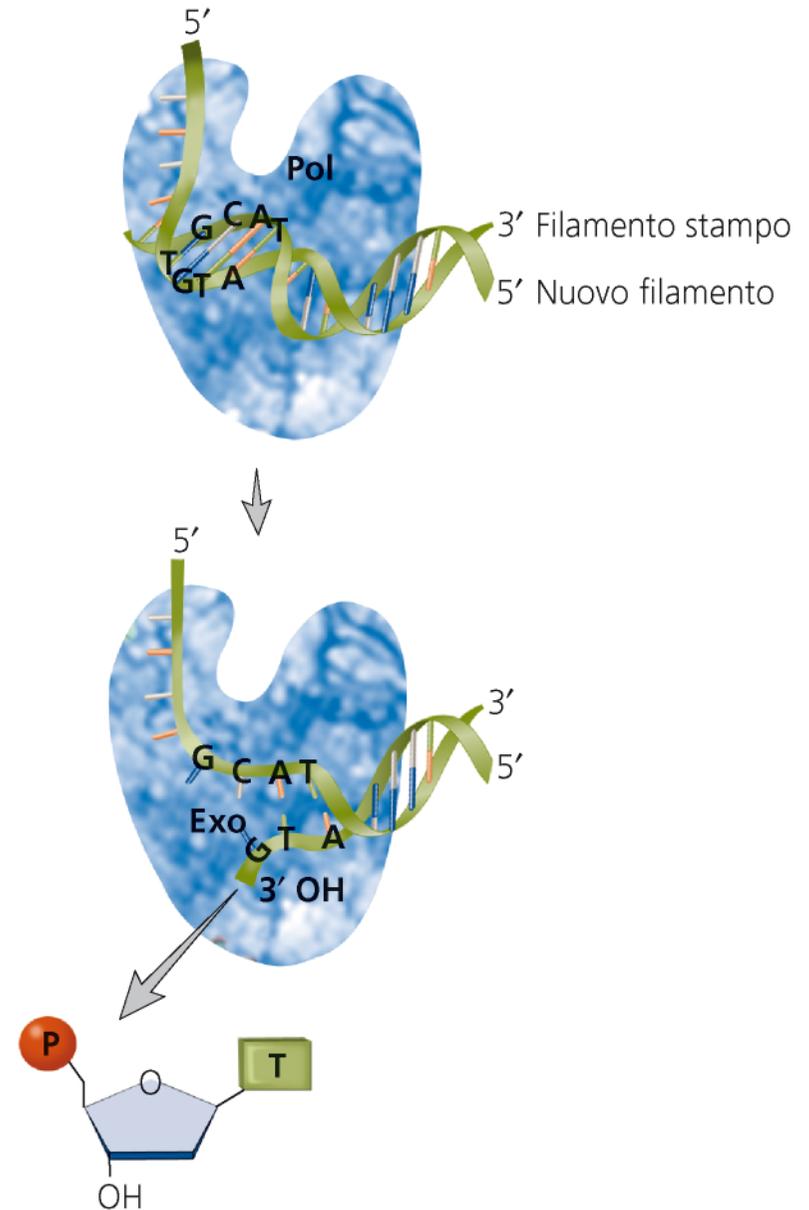
Correzione delle bozze (*editing*)

Le DNA polimerasi fanno un'errore ogni **10.000 - 100.000 bp**.

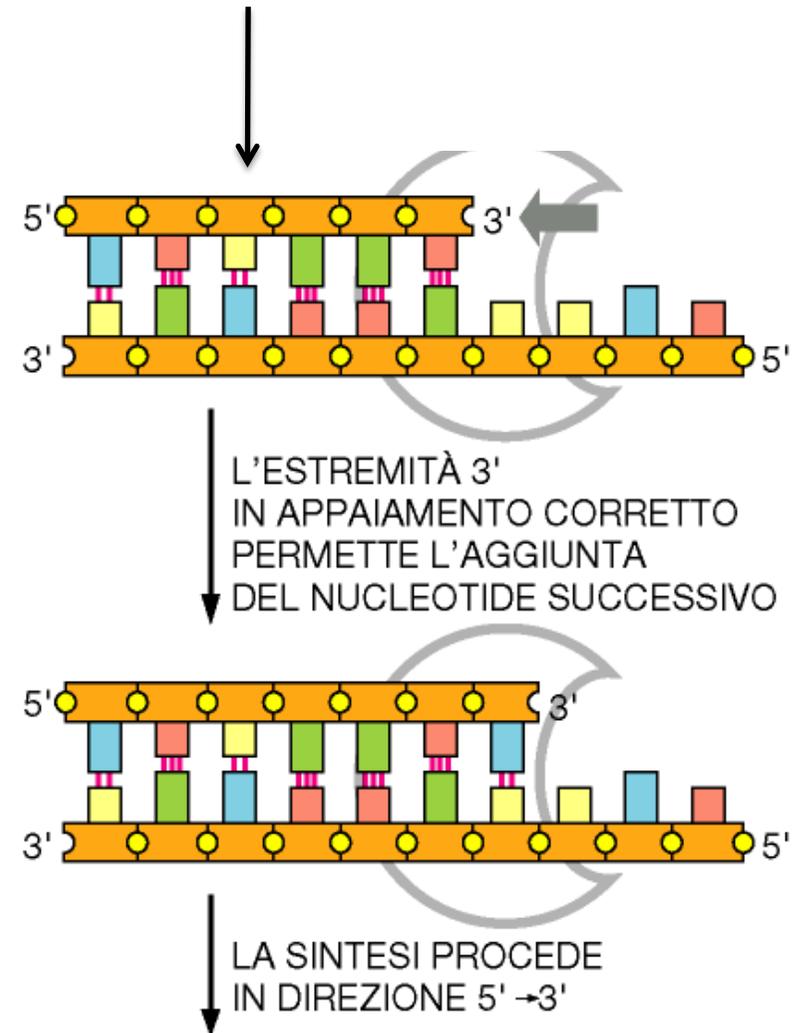
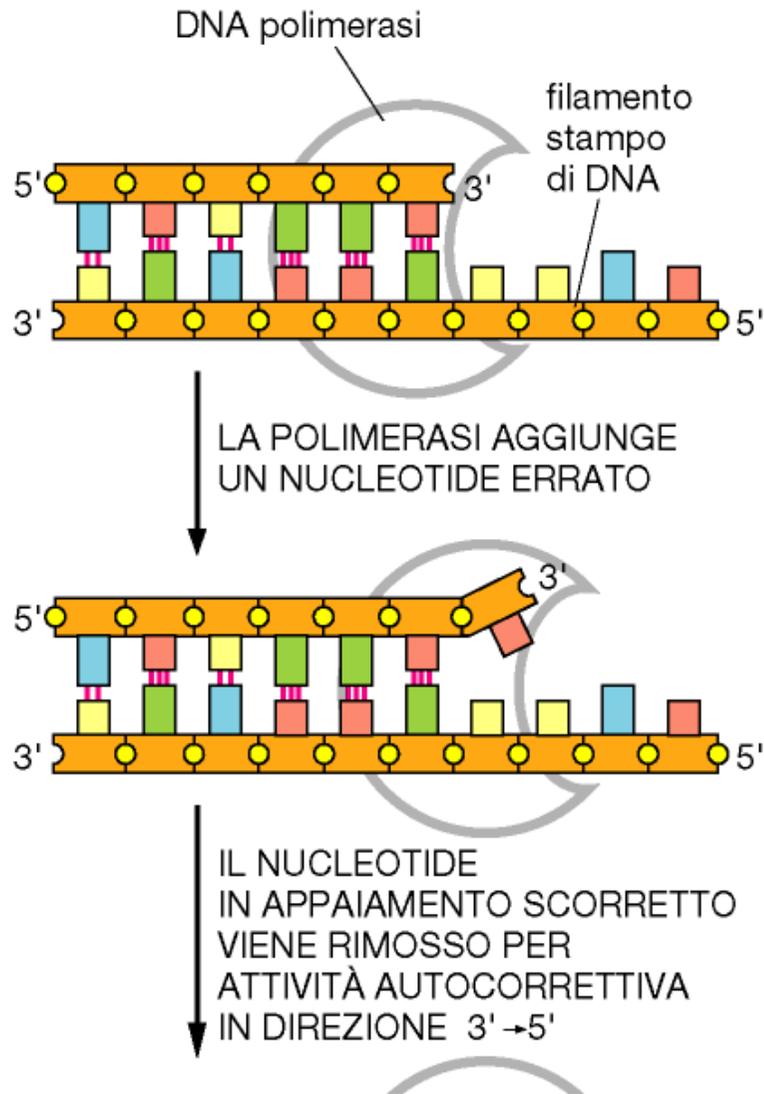
Le DNA polimerasi replicative hanno associata un'attività endonucleasica di **correzione delle bozze** che riduce la frequenza spontanea di errore a **10^{-7} - 10^{-8}** . La **pol α non ha** attività di correzione di bozze.

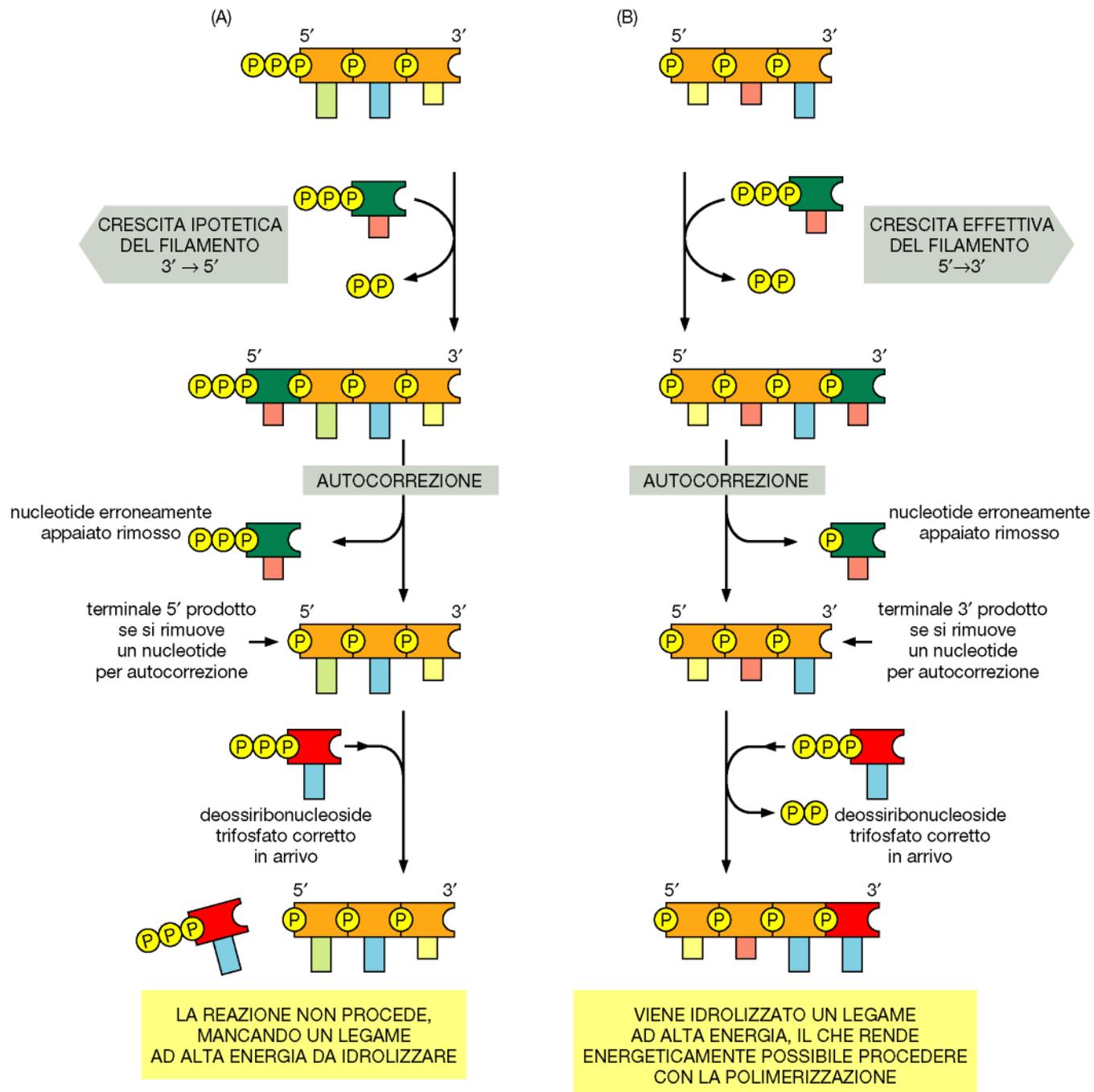
Fino a che vengono aggiunti nucleotidi corretti all'estremità 3' del nuovo filamento, l'estremità 3' resta nel sito attivo della polimerasi.

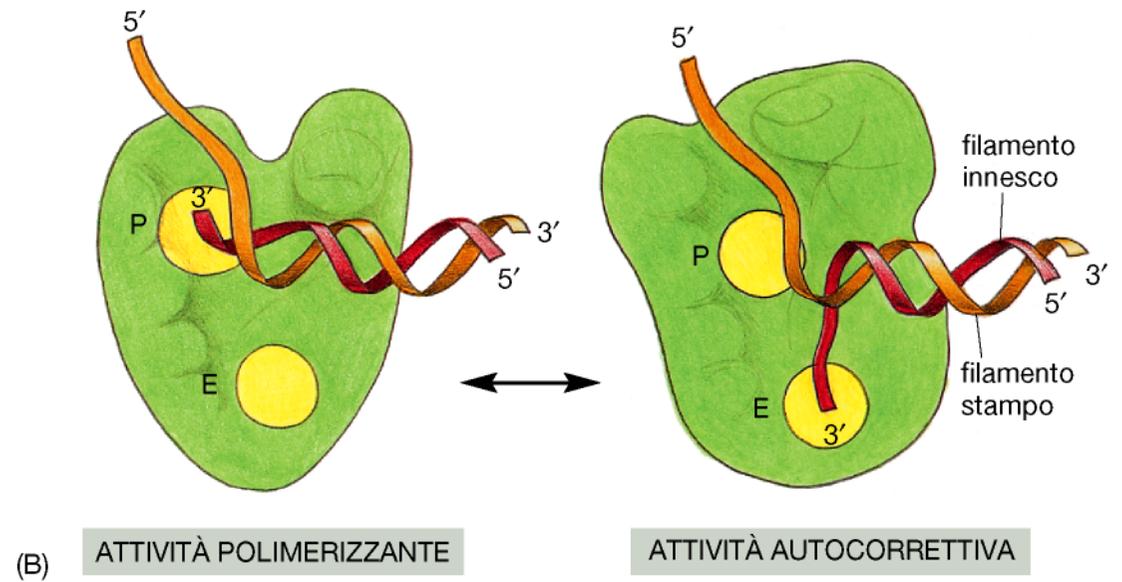
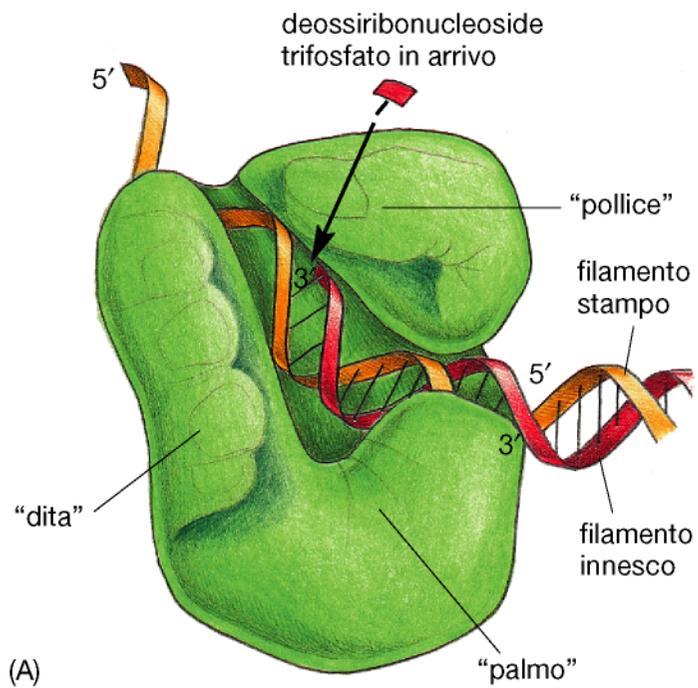
L'incorporazione di una base male appaiata provoca la **fusione del DNA a doppia elica** di nuova formazione. LA polimerasi fa una **pausa** e **l'estremità 3'** del nuovo filamento è **trasferita al dominio esonucleasico**, dove la base male appaiata viene escissa e rilasciata come dNMP.

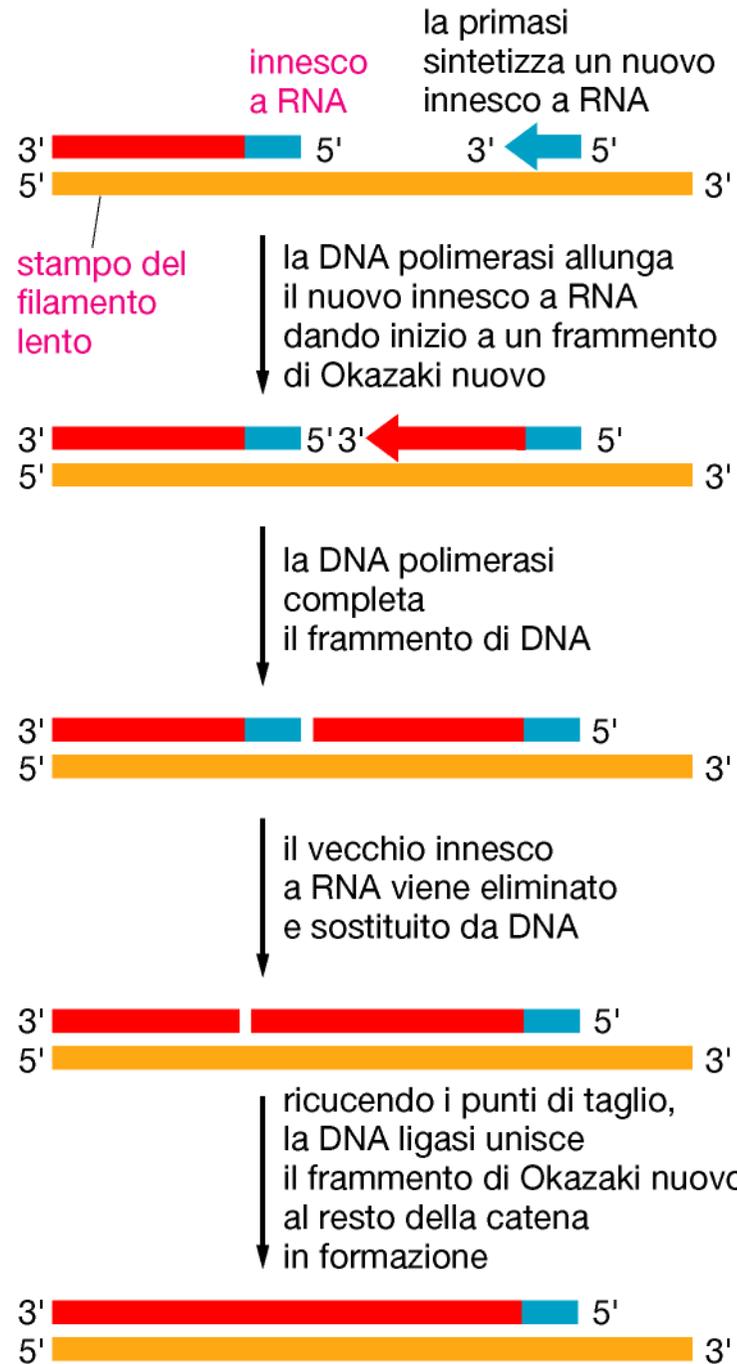


La DNA polimerasi corregge il proprio lavoro man mano che sintetizza il DNA

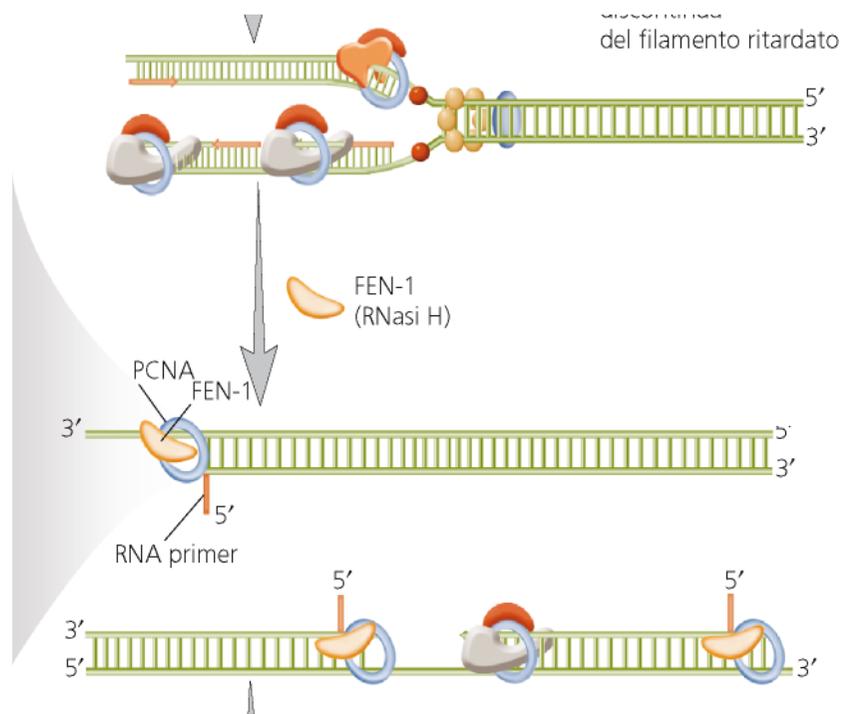








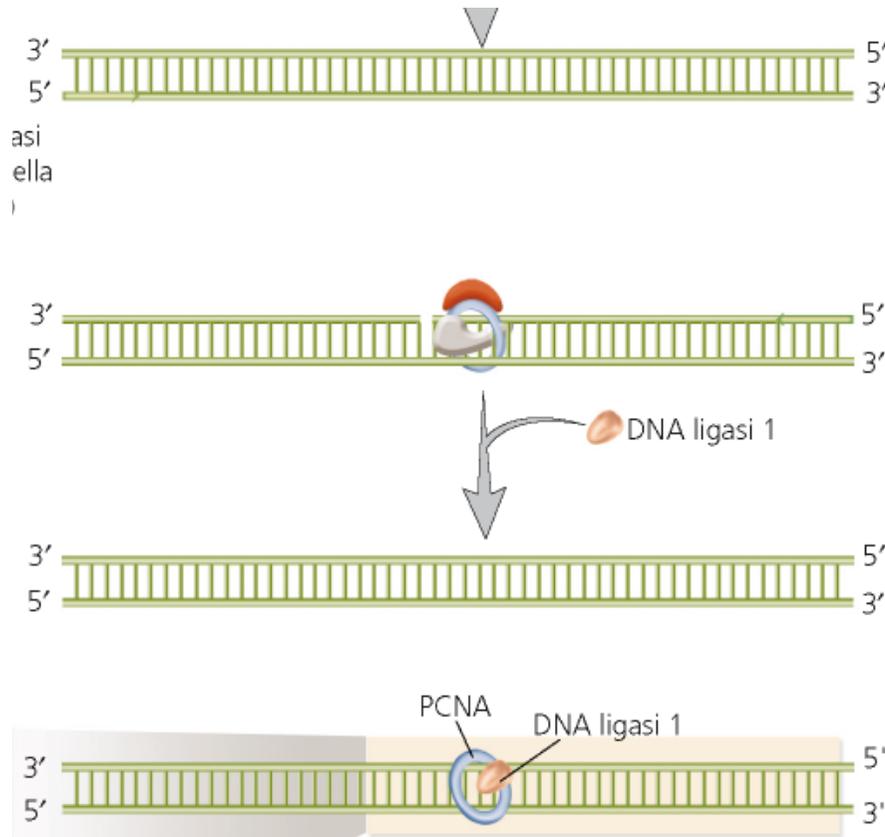
Rimozione dell'RNA primer



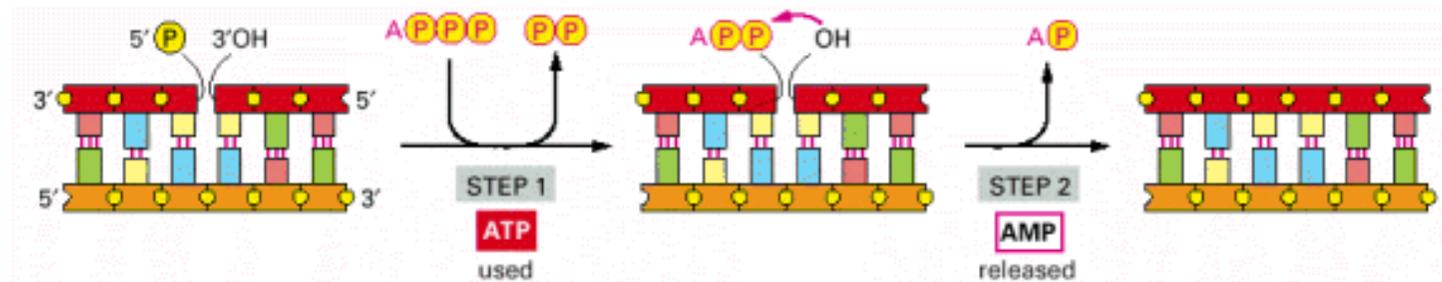
L'RNasi H o l'endonucleasi FEN-1 degradano l'RNA primer.

Le interruzioni lasciate dalla rimozione del primer sul filamento ritardato sono riempite dalla **DNA polimerasi ϵ** , producendo un DNA a doppio filamento contenente nick (interruzione).

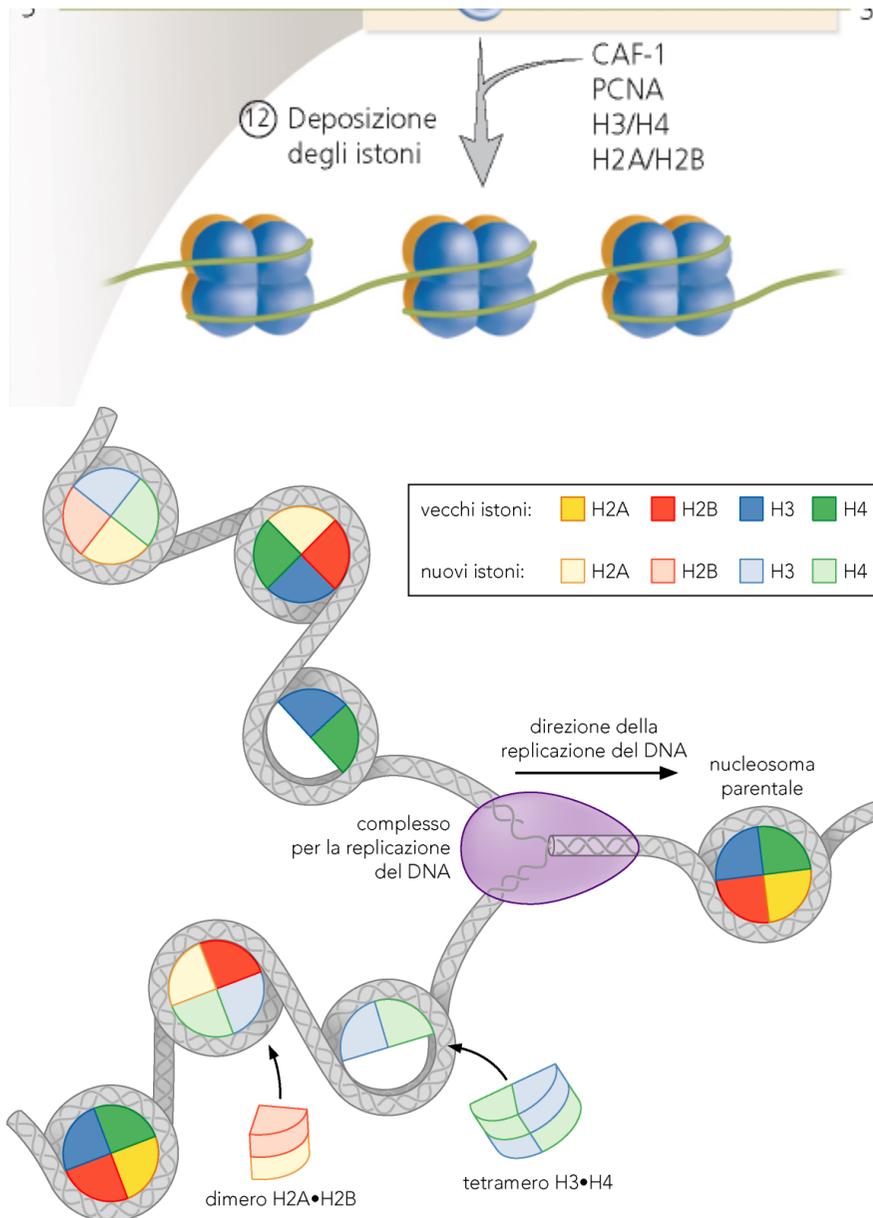
Riempimento delle interruzioni e unione dei frammenti di Okazaki



Sul **filamento ritardato** la **DNA ligasi I** unisce i frammenti di Okazaki catalizzando la formazione di nuovi legami fosfodiesteri.



La deposizione degli istoni



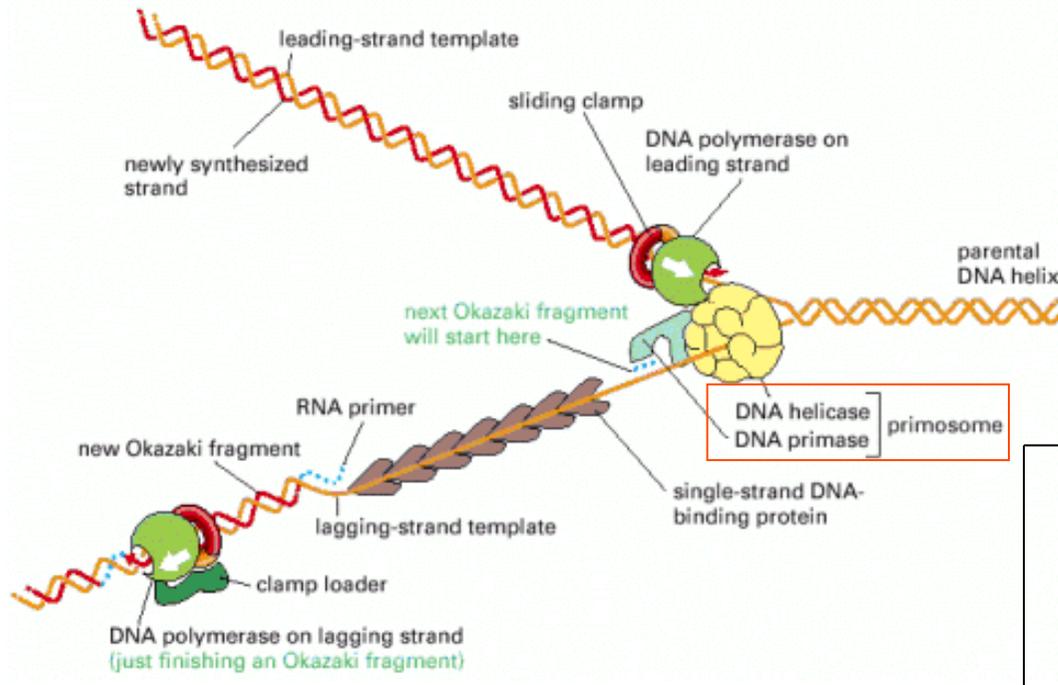
La deposizione degli istoni avviene non appena c'è abbastanza DNA disponibile per assemblare un nucleosoma (180 bp).

Il fattore di assemblaggio della cromatina (**CAF-1**) porta gli istoni alla forcella di replicazione del DNA tramite un'interazione diretta con PCNA.

Istoni parentali e nuovi istoni si “mescolano” nei nucleosomi nuovamente assemblati.

Gli istoni vengono rapidamente acetilati.

Forcella di replicazione nei batteri



Forcella di replicazione nei mammiferi

-tre polimerasi diverse

-la primasi è una subunità della DNA polimerasi α , mentre quella batterica è associata con la DNA elicasi nel **primosoma** e sintetizza solo un primer a RNA.

