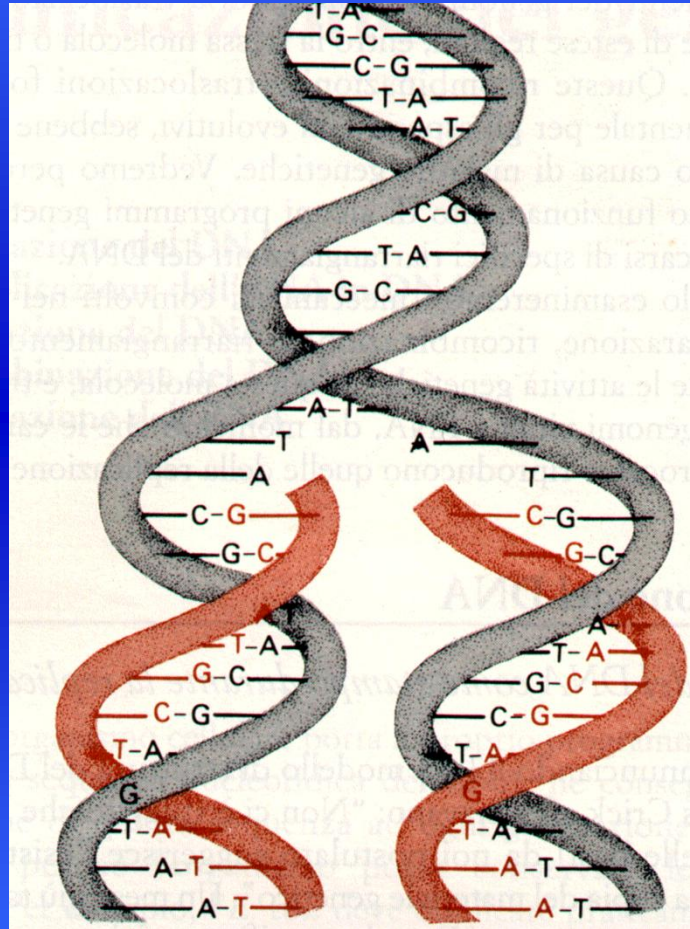


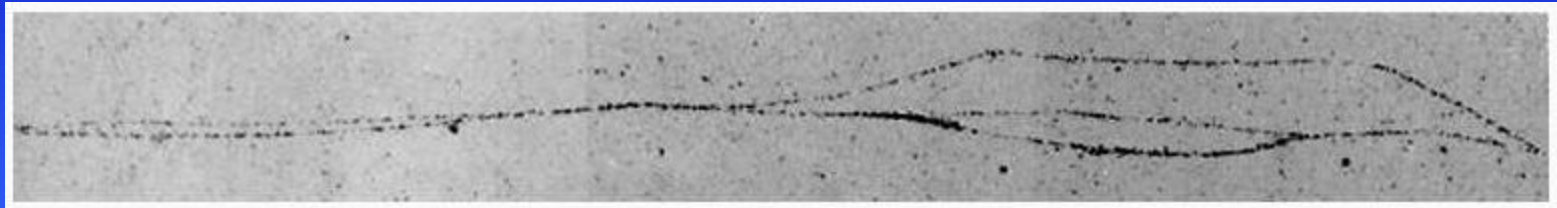
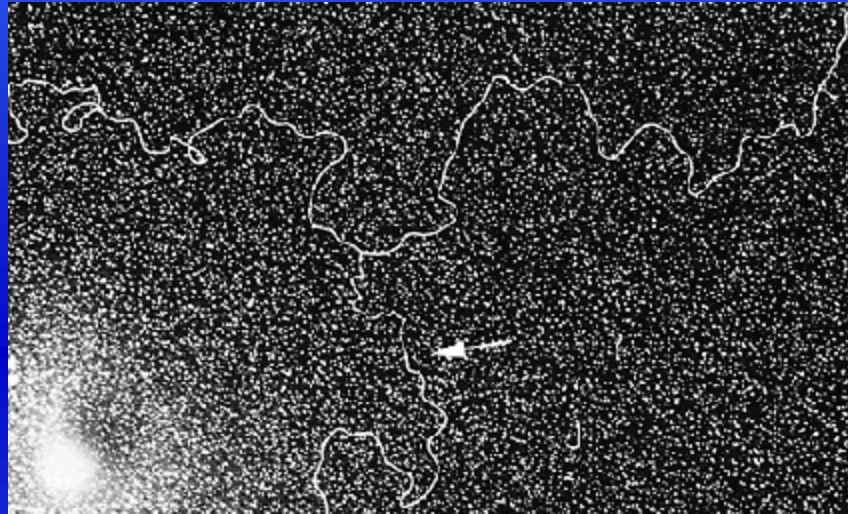
LA replicazione del DNA

- È un fenomeno fondamentale della biologia
- Watson & Crick: nasce l'idea
- Meselson & Stahl e la replicazione semiconservativa
- Cairns e le forche replicative

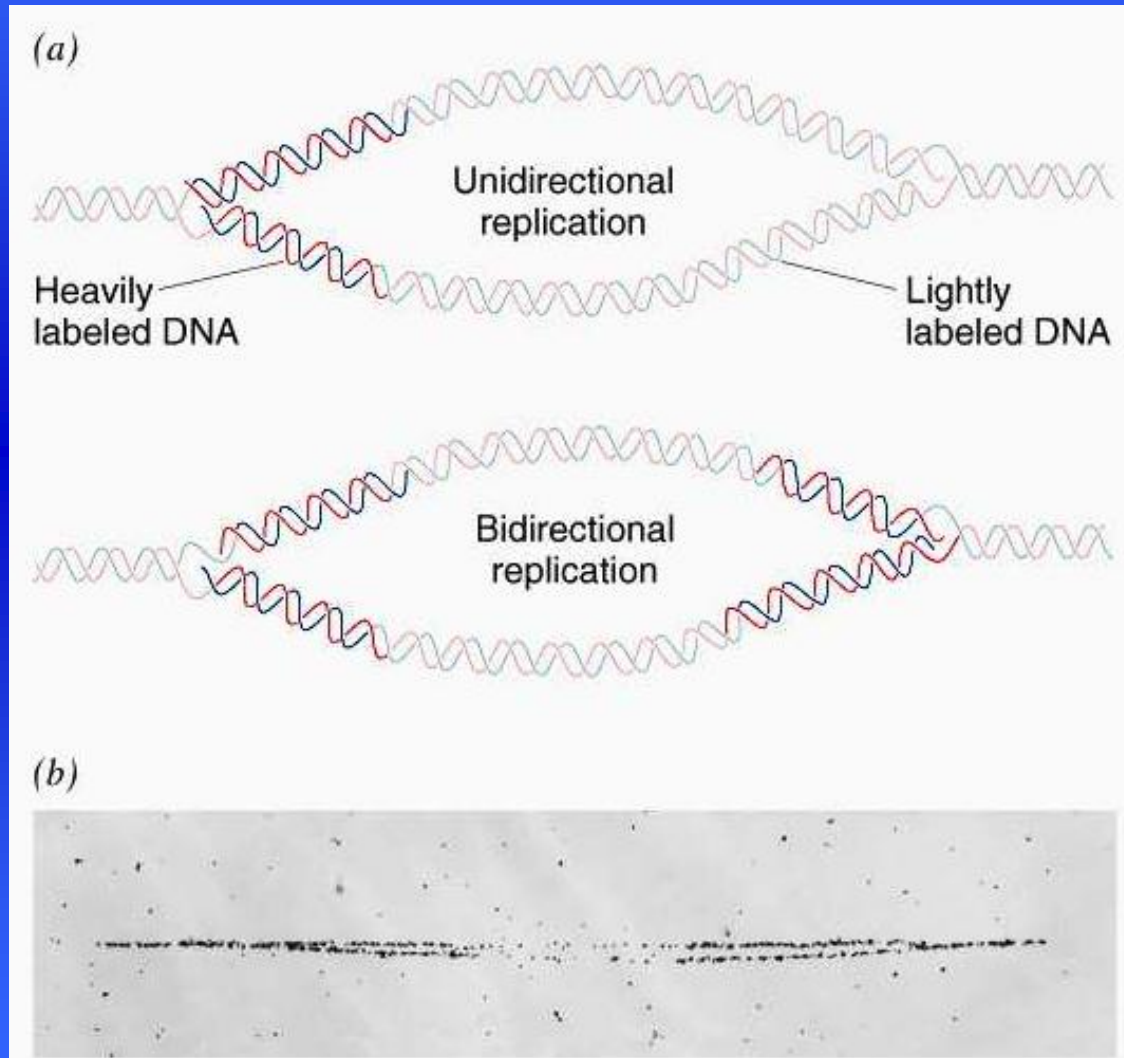
Watson & Crick: nasce l'idea



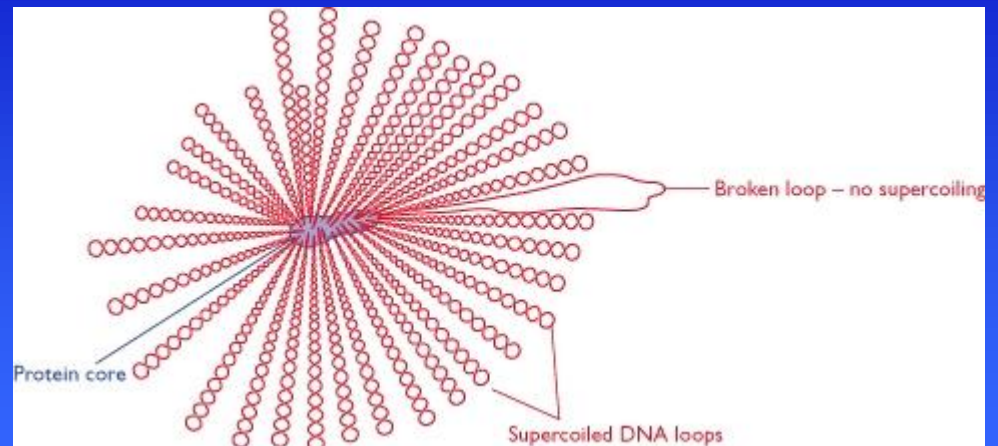
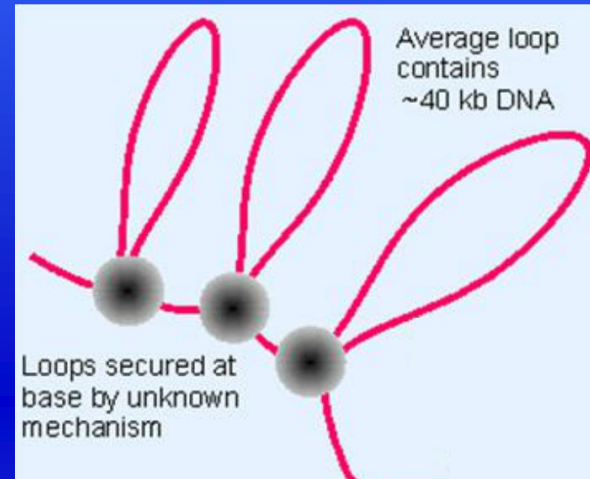
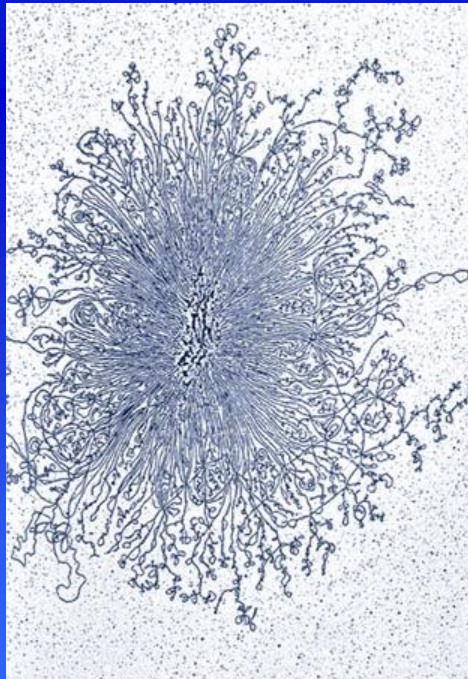
Visualizzazione della forza replicativa



Dimostrazione della bidirezionalità



Il nucleotide batterico e la sua struttura



IDENTIFICAZIONE DEI FATTORI COINVOLTI NELLA REPLICAZIONE DEL DNA

APPROCCIO GENETICO

Selezione di mutanti condizionali letali per i geni coinvolti nella replicazione del DNA:

- Screening di collezione di mutanti incapaci di incorporare H^3 a temperature non permissive
- Selezione di cloni insensibili all'infezione di alcuni fagi a temperature non permissive
- Selezione di cloni resistenti a mutageni a dosi letali a temperature non permissive

TABLE 1. Essential replication proteins of *E. coli*

Protein	Primary function	Polypeptide mass (kilodaltons)	No. of subunits in native protein	Molecules per cell	Gene	Map position (min)	Phenotype of mutant
DnaA	Origin recognition	52.5	1	200	<i>dnaA</i>	83	Slow stop
DnaB	DNA helicase; priming	52.3	6	20	<i>dnaB</i>	92	Quick stop
DnaC	Delivery of dnaB protein to <i>oriC</i>	29	1	100	<i>dnaC</i>	99	Slow or quick stop
SSB	Binding to ssDNA	18.8	4	500	<i>ssb</i>	92	Quick stop
primase	RNA primer synthesis	65.6	1	75	<i>dnaG</i>	67	Quick stop
DNA polymerase III (holoenzyme)	Replicative DNA polymerase	(740)		20			
α	DNA polymerase	130	(2)		<i>polC</i> (<i>dnaE</i>)	4	Quick stop
ε	3' → 5' proofreading exonuclease	27.5	(2)		<i>dnaQ</i> (<i>mutD</i>)	5	Hypermutation
θ	Unknown	10	1		Unknown		
β	DNA polymerase accessory protein	40.6	(2)		<i>dnaV</i>	83	Quick stop
τ	DNA polymerase accessory protein	71.1	(2)		<i>dnaZX</i>	11	Quick stop
γ	DNA polymerase accessory protein	52			<i>dnaZX</i>	11	Quick stop
δ	DNA polymerase accessory protein	32			<i>dnaZX</i> (?)		Quick stop
DNA gyrase	DNA supercoiling; decatenation	374	4				
α	Nicking-closing	97	2	250	<i>gyrA</i>	48	Slow stop
β	ATPase	89.8	2	150	<i>gyrB</i>	83	Slow stop
DNA polymerase I	Primer removal; gap filling	102	1	300	<i>polA</i>	87	DNA repair defective
DNA ligase	Sealing of DNA nicks	74	1	300	<i>lig</i>	52	Accumulate nascent fragments
DnaT	Termination of DNA replication	19.3	3	75	<i>dnaT</i>	99	Slow stop
RNA polymerase	Transcriptional activation of <i>oriC</i>	460	5	3,000	<i>rpoA, B, C, D</i>	73, 90, 90, 67	Slow stop

IDENTIFICAZIONE DEI FATTORI COINVOLTI NELLA REPLICAZIONE DEL DNA

APPROCCIO BIOCHIMICO-FISIOLOGICO

Selezione di frazioni proteiche e proteine in grado di complementare , in vitro, la mancanza di fattori essenziali alla replicazione del DNA:

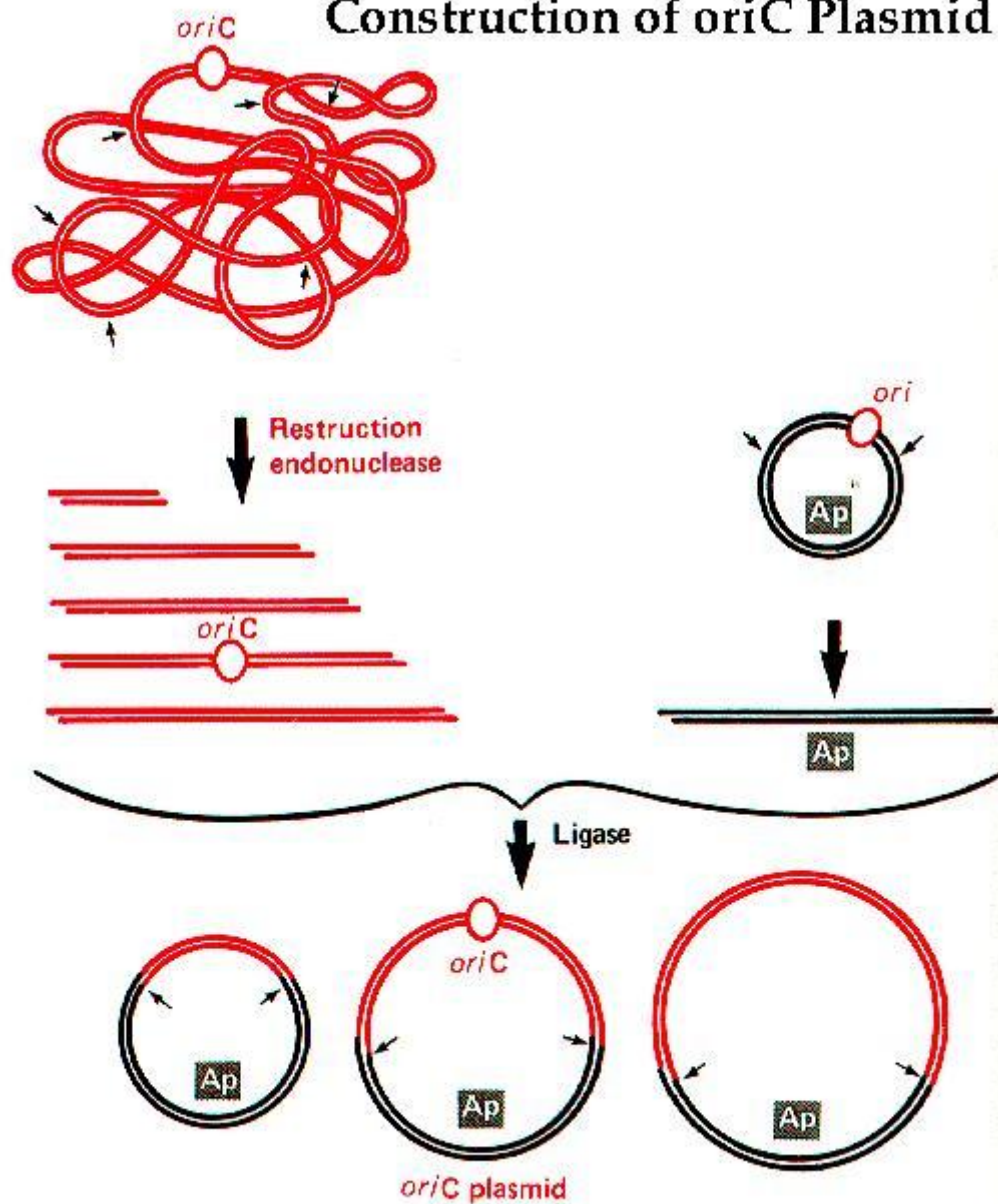
- Disco di Cellophane di Bonhoeffer
- Sistema in vitro di Kornberg

INDIVIDUAZIONE DELL'ORIGINE DI REPLICAZIONE

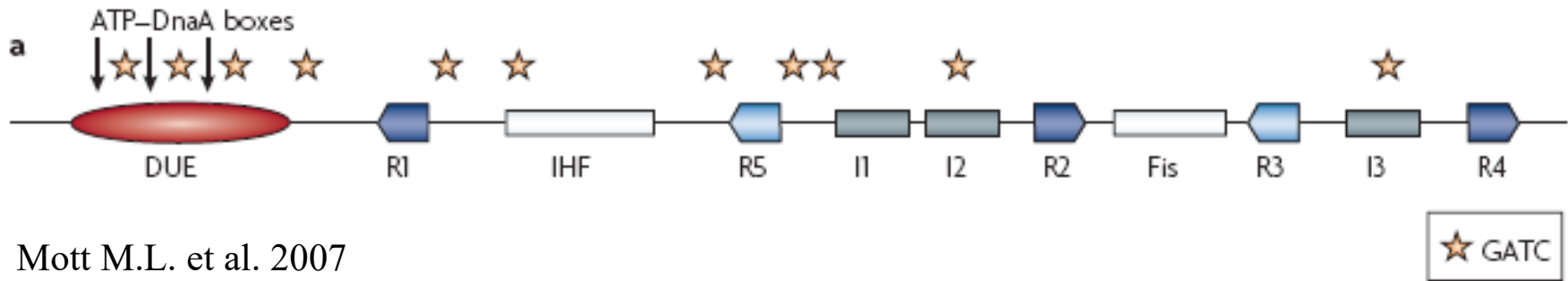
L'ORIGINE DI REPLICAZIONE *oriC* (nel caso di *E.coli*) è stata ottenuta mediante:

- Analisi di delezione (la regione responsabile della replicazione non può essere deleta)
- Analisi dei geni localizzati nei pressi dell'ipotetica origine di replicazione (sono maggiormente espressi perché presenti in numero di copie maggiore)
- Clonaggio della regione di inizio della replicazione in un plasmide privo di proprio replicone (solo in questo modo sarà stabilmente mantenuto in una cellula batterica)

Construction of oriC Plasmid



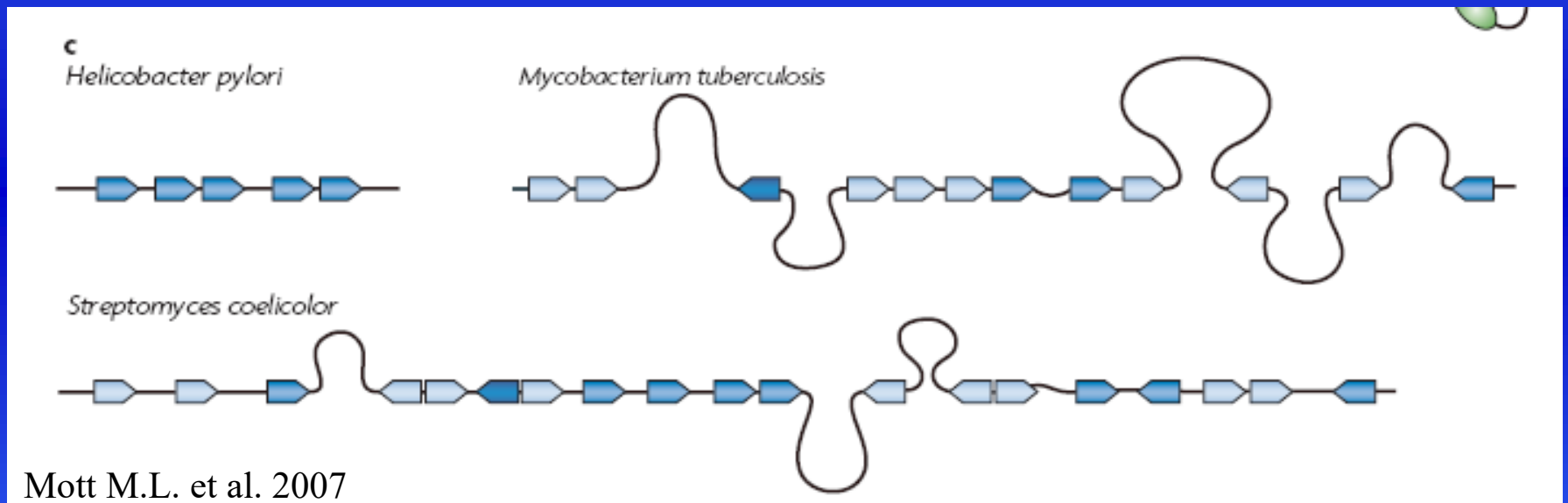
ORGANIZZAZIONE DEL *locus oriC*



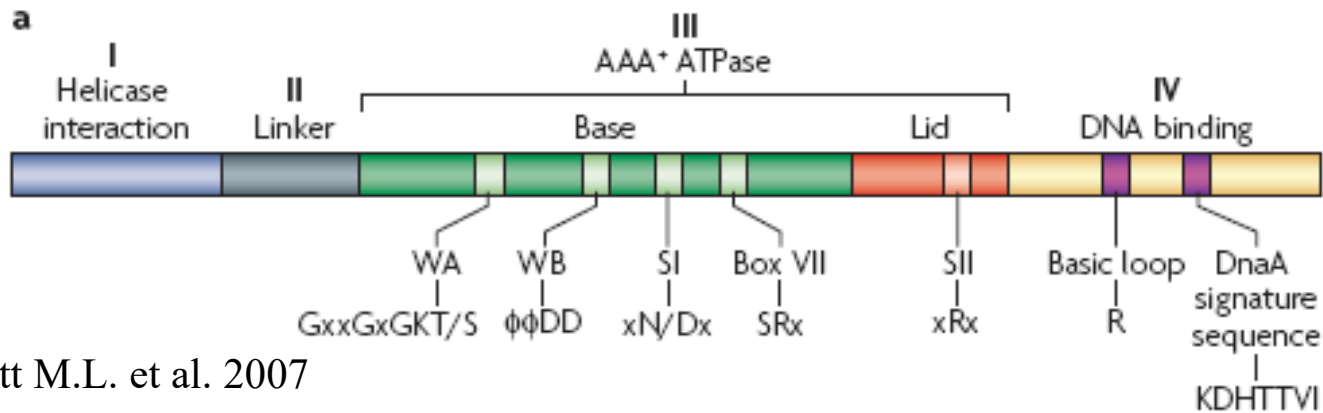
Mott M.L. et al. 2007

La regione *oriC* è ristretta a 245 bp. Essa contiene una regione ricca in AT (DUE-DNA unwinding element), 8 regioni di legame per la DnaA di cui 3 ad alta affinità (R1,2,4), 2 a minore affinità (R3,5) e 3 ad affinità specifica per il complesso ATP-DnaA (I1,2,3), un sito di legame per IHF e uno per FIS. Sono presenti anche molte sequenze GATC (★) sensibili alla metilasi *dam*

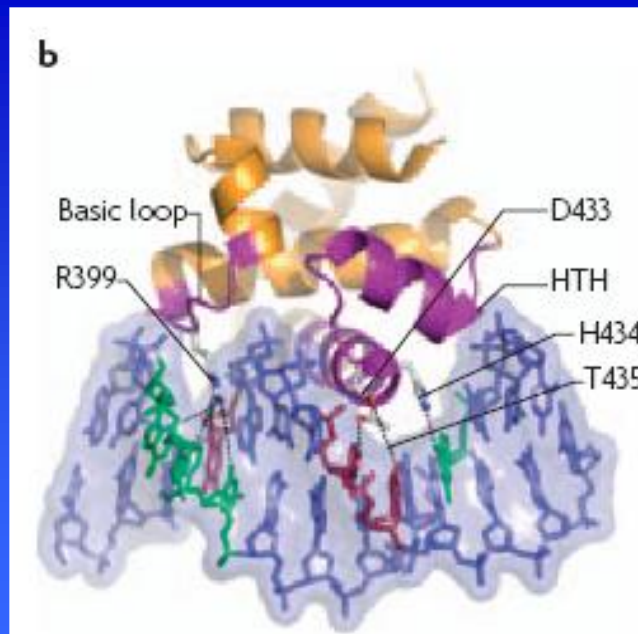
ESEMPI DI ORGANIZZAZIONE DI ORIGINI DI REPLICAZIONE



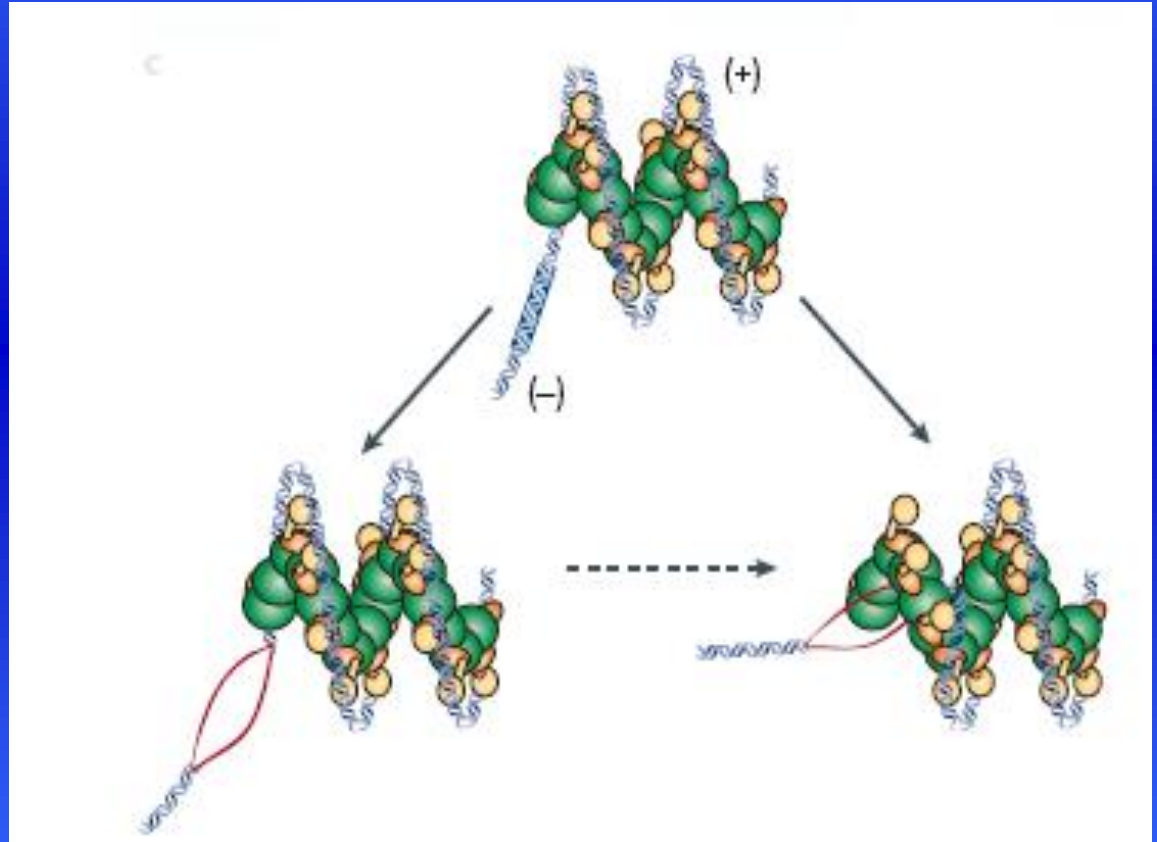
La proteina DnaA ...



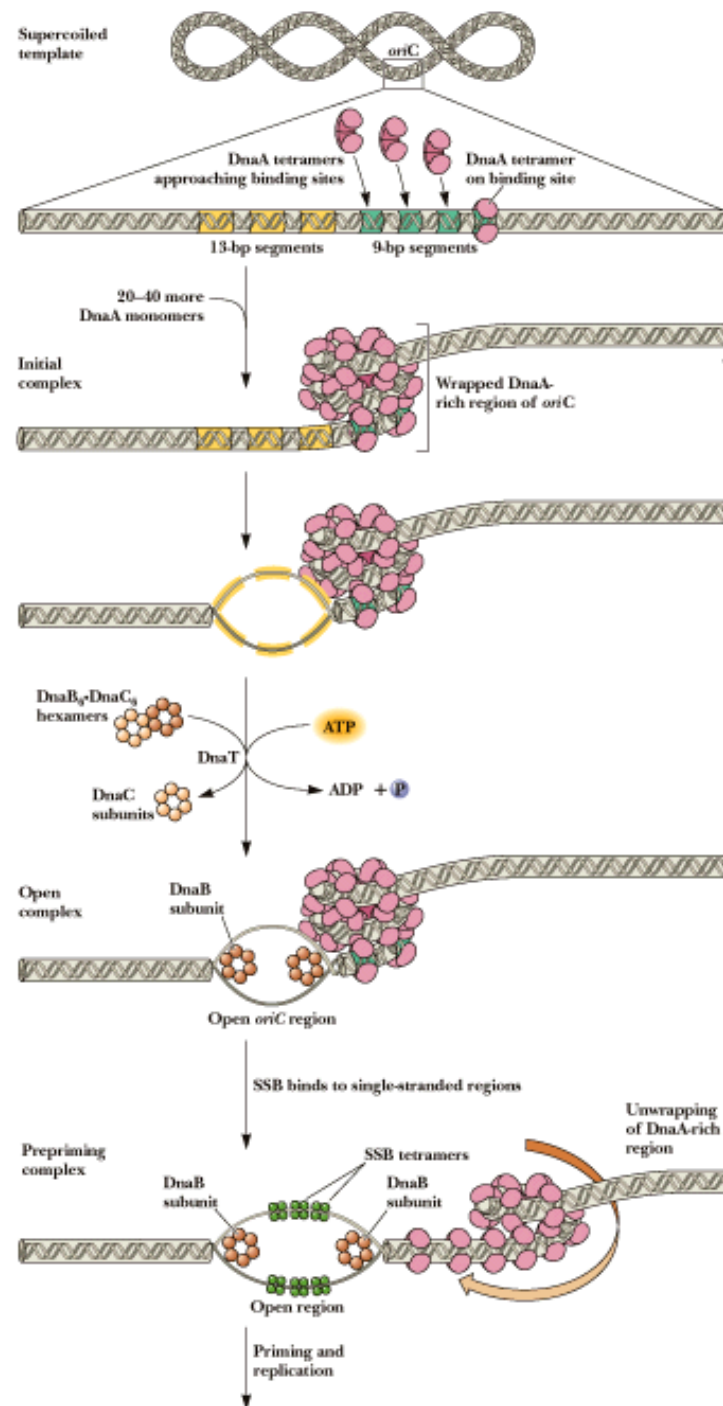
Mott M.L. et al. 2007



La proteina DnaA ...



Mott M.L. et al. 2007



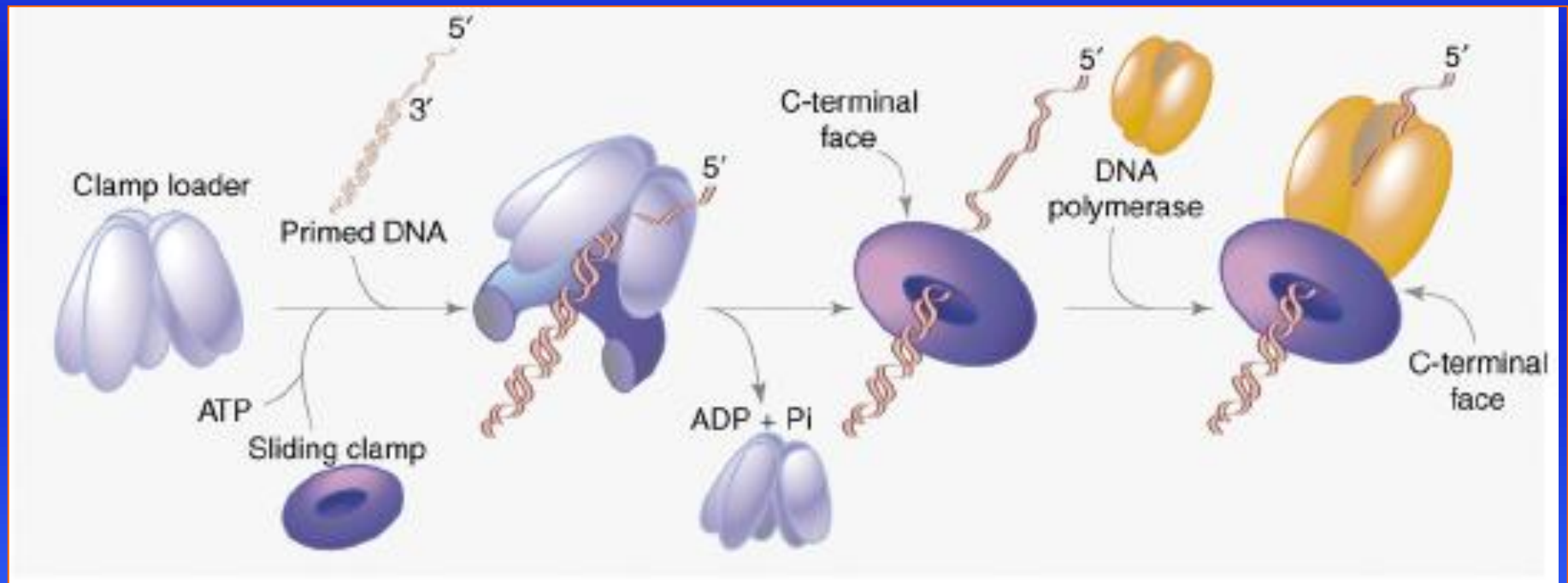
LA DNA POLIMERASI III È UN OLOENZIMA COSTITUITO DA ALMENO 10 SUBUNITÁ DIFFERENTI

Table 5-2
Major subunits and subassemblies of pol III holoenzyme

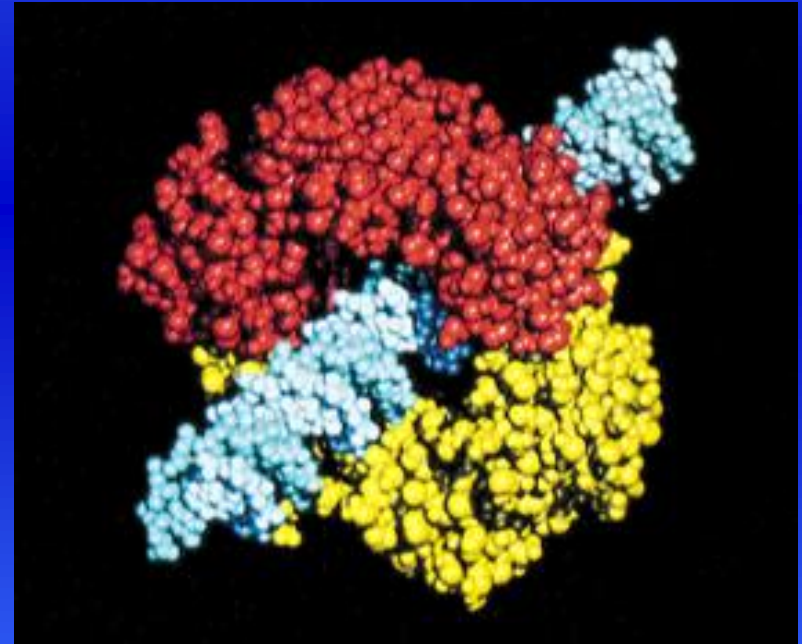
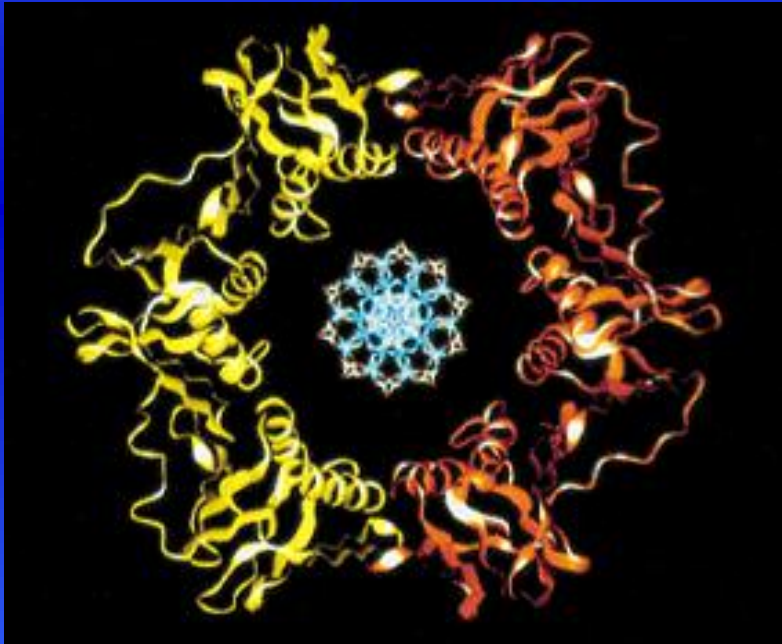
Subunit	Mass (kDa)	Gene	Subassembly					
α	130 ^a	<i>dnaE</i>	} pol III (core)	} pol III'	} pol III*	} holoenzyme		
ϵ	27.5 ^a	<i>dnaQ (mutD)</i>						
θ	10							
τ	71 ^a	<i>dnaX</i>	} γ complex					
γ	47.5 ^a	<i>dnaX</i>						
δ	35							
δ'	33							
χ	15							
ψ	12							
β	40.6 ^a	<i>dnaN</i>						

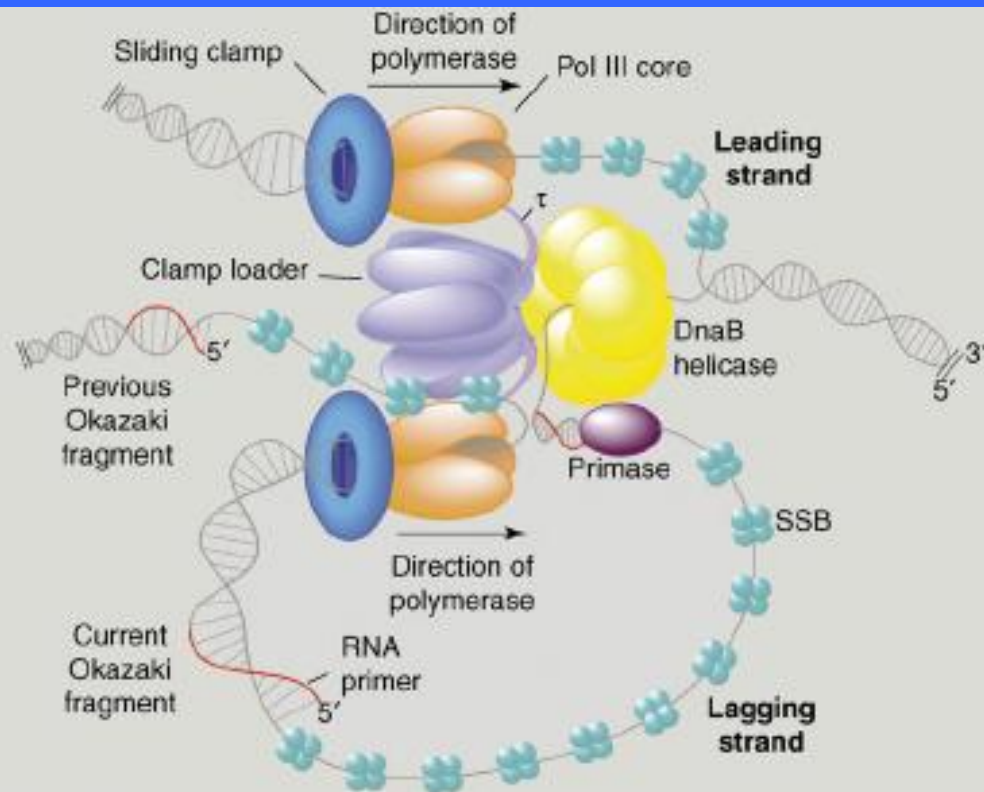
^a Based on DNA sequence; others are based on electrophoresis.

IL COMPLESSO γ AGISCE APPLICANDO LE SUBUNITÀ β SUL DNA DA REPLICARE



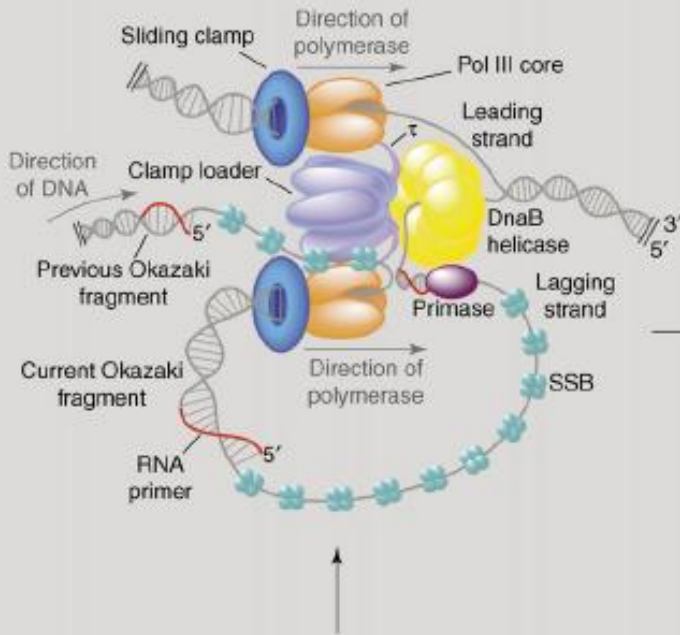
**2 SUBUNITÁ β FORMANO UN ANELLO (clamp)
INTORNO AL DNA DA REPLICARE**



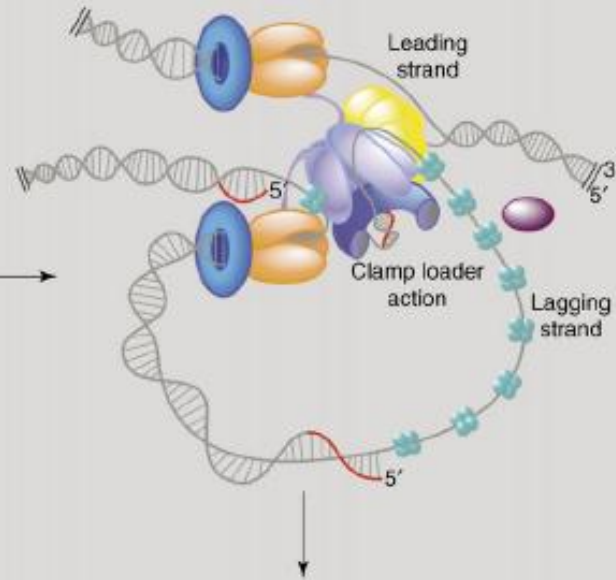


Replisome component	Molecular weight (kDa)	Function
Pol III core (heterotrimer)	166	DNA polymerase, 3' to 5' exonuclease
Sliding clamp (homodimer)	40.6 X 2	Processivity factor
Clamp loader (heteropentamer)	297.1	Assembles sliding clamps, protein trafficking
DnaB helicase (homo-hexamer)	52.4 X 6	5' to 3' DNA unwinding
Primase (monomer)	65.6	Synthesizes RNA primers
SSB (homotetramer)	18.8 X 4	Binds to single-stranded DNA, prevents secondary structure

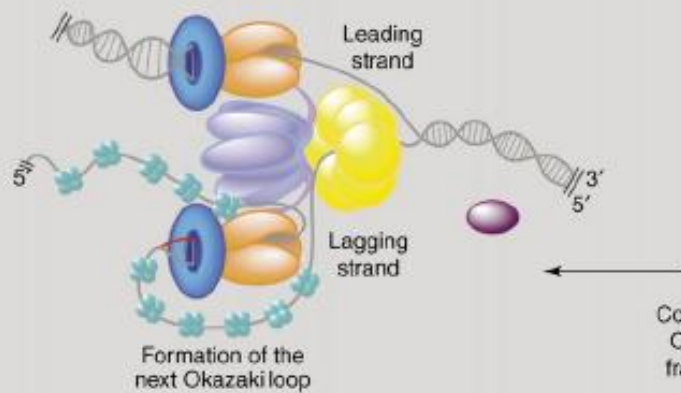
(a) Primase synthesizes a RNA primer



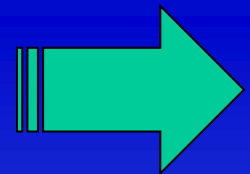
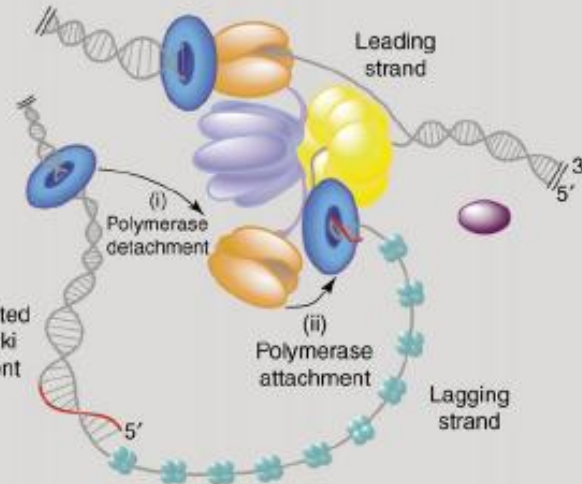
(b) A sliding clamp is assembled at the newly primed site



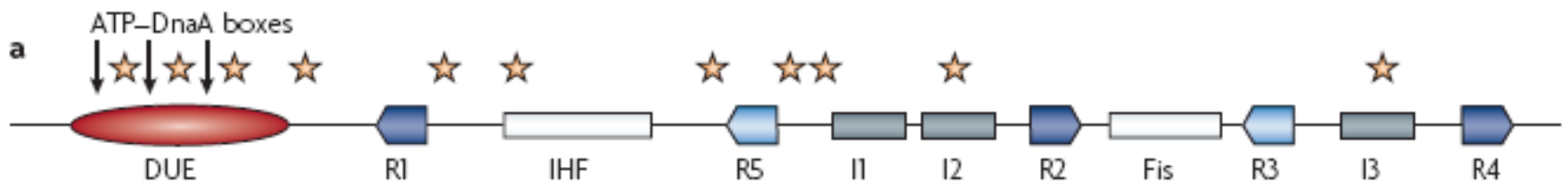
(d) Lagging strand polymerase synthesizes the next Okazaki fragment



(e) Lagging strand polymerase cycles to the next Okazaki fragment



oriC



Mott M.L. et al. 2007



REGOLAZIONE DELL'INIZIO DELLA REPLICAZIONE (firing)

- Titolazione della forma libera della proteina DnaA da parte del sito *datA*
- Regolazione trascrizionale di DnaA
- Sequestro dell'origine di replicazione da parte della membrana di SeqA
- *Rejuvenation* di DNA-ATP membrana mediato
- Inattivazione regolativa di DnaA (RIDA)

REGOLAZIONE DELL'INIZIO DELLA REPLICAZIONE: modello del sequestro dell'origine

La regione *oriC* è ricca di sequenze GATC che possono essere metilate dalla *dam* metilasi sull'A

La natura della replicazione di tipo semiconservativa determina un DNA neosintetizzato di tipo emimetilato. Il DNA genomico viene rimetilato in 3'. Quello della regione *oriC* impiega 12'-13'

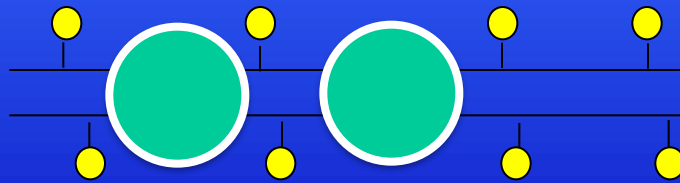
Questo ritardo è dovuto al legame di questa regione della proteina SeqA che si lega saldamente al DNA emimetilato

La proteina DnaA si lega al DNA della regione *oriC* quando questo è completamente metilato

Sulla base di queste osservazioni è stata elaborata l'ipotesi della regolazione determinata dal sequestro da parte della membrana dell'origine di replicazione.

metile
GATC

oriC

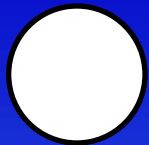


Replicazione

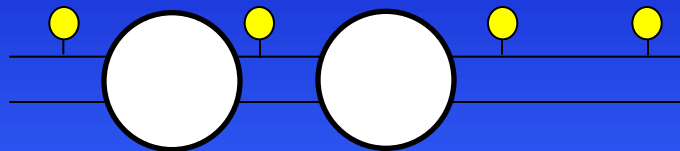
DnaA



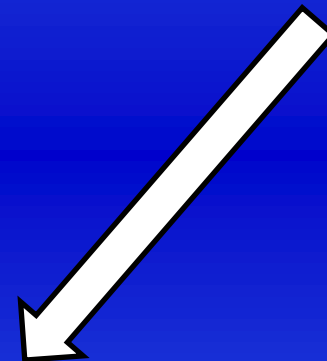
SeqA



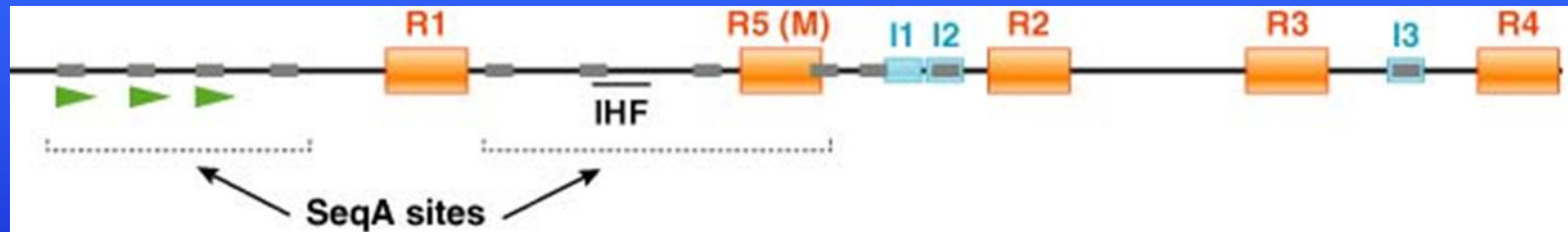
Dam



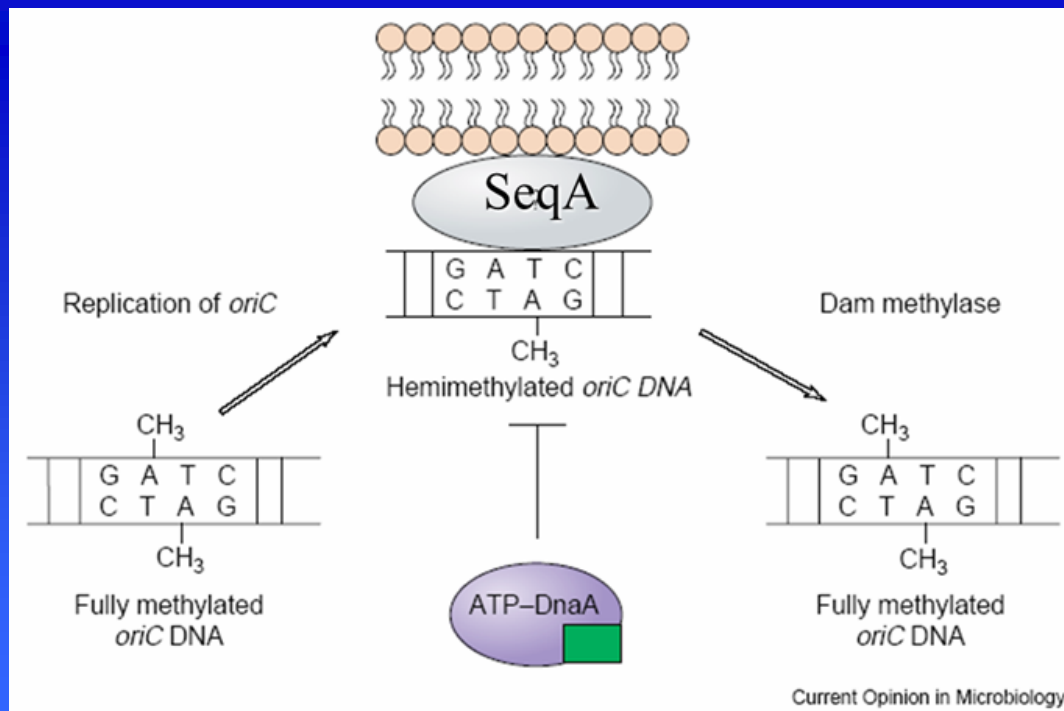
Sequestro



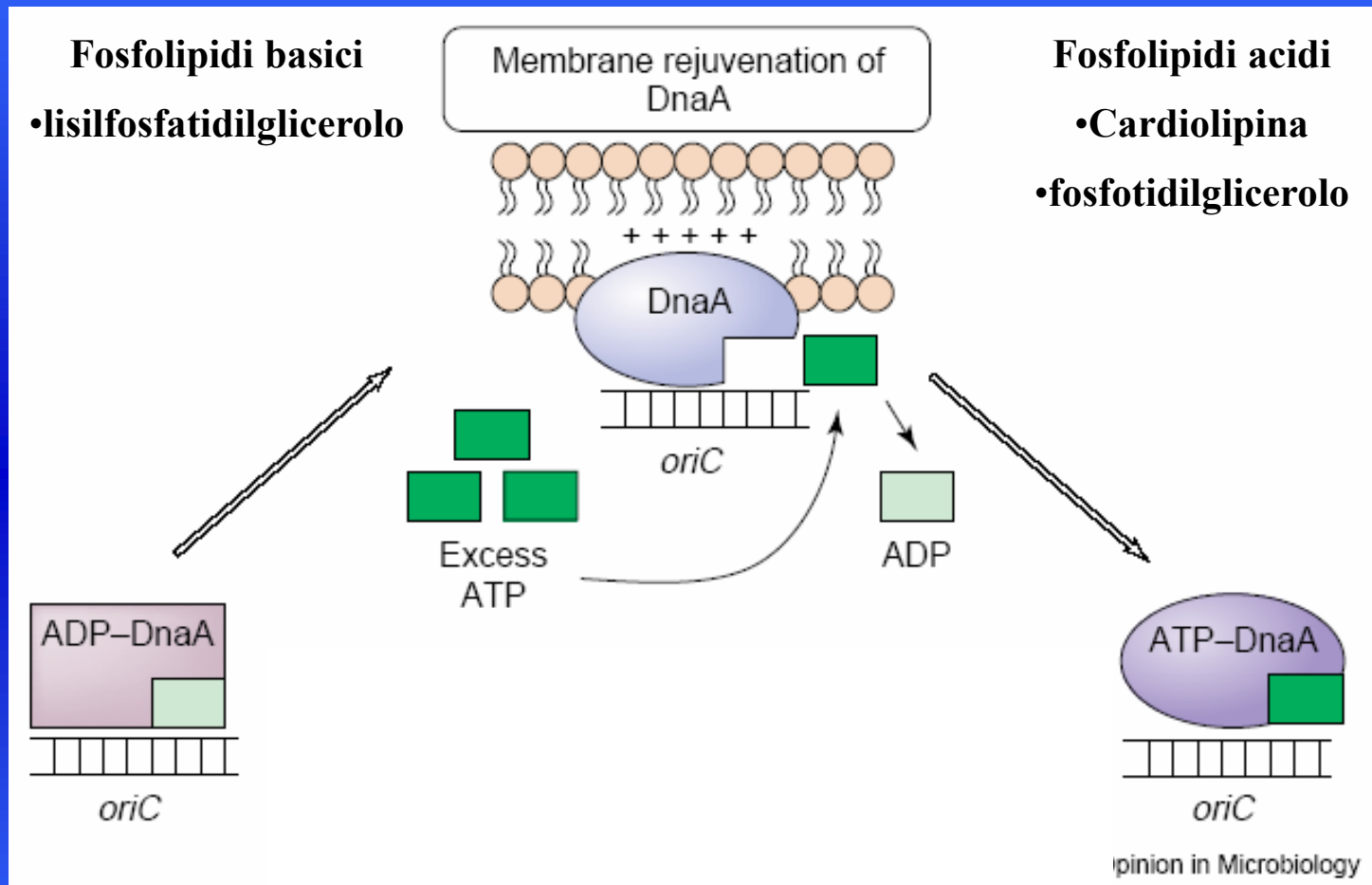
IPOTESI DEL SEQUESTRO



AR Kaguni JM. 2006.
Annu. Rev. Microbiol. 60:351–71



IPOTESI DEL CONTROLLO MEMBRANA MEDIATO



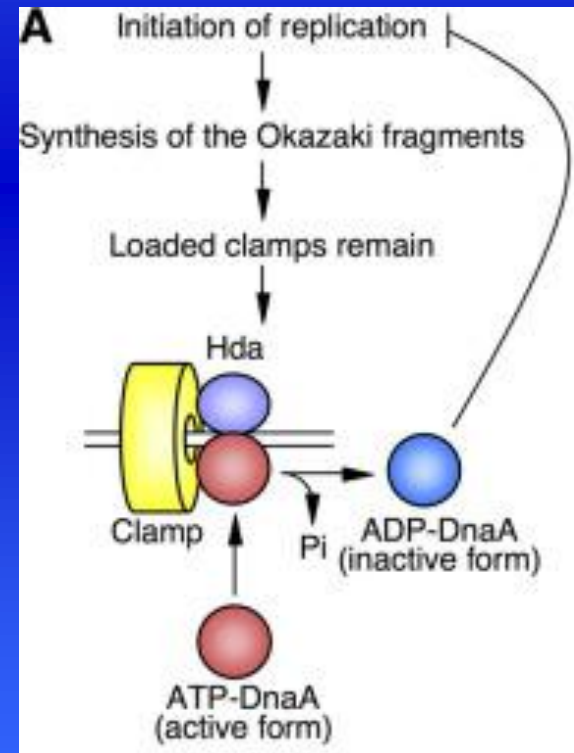
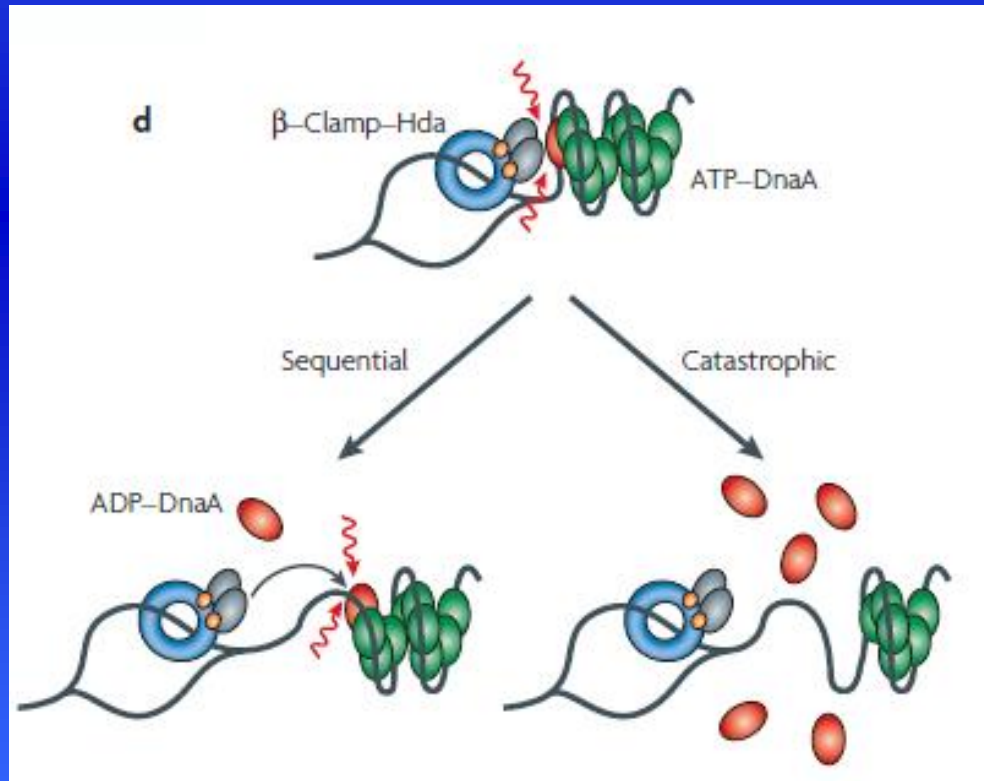
RIDA: Regulatory Inactivation of DnaA

Hda: Homologous to DnaA

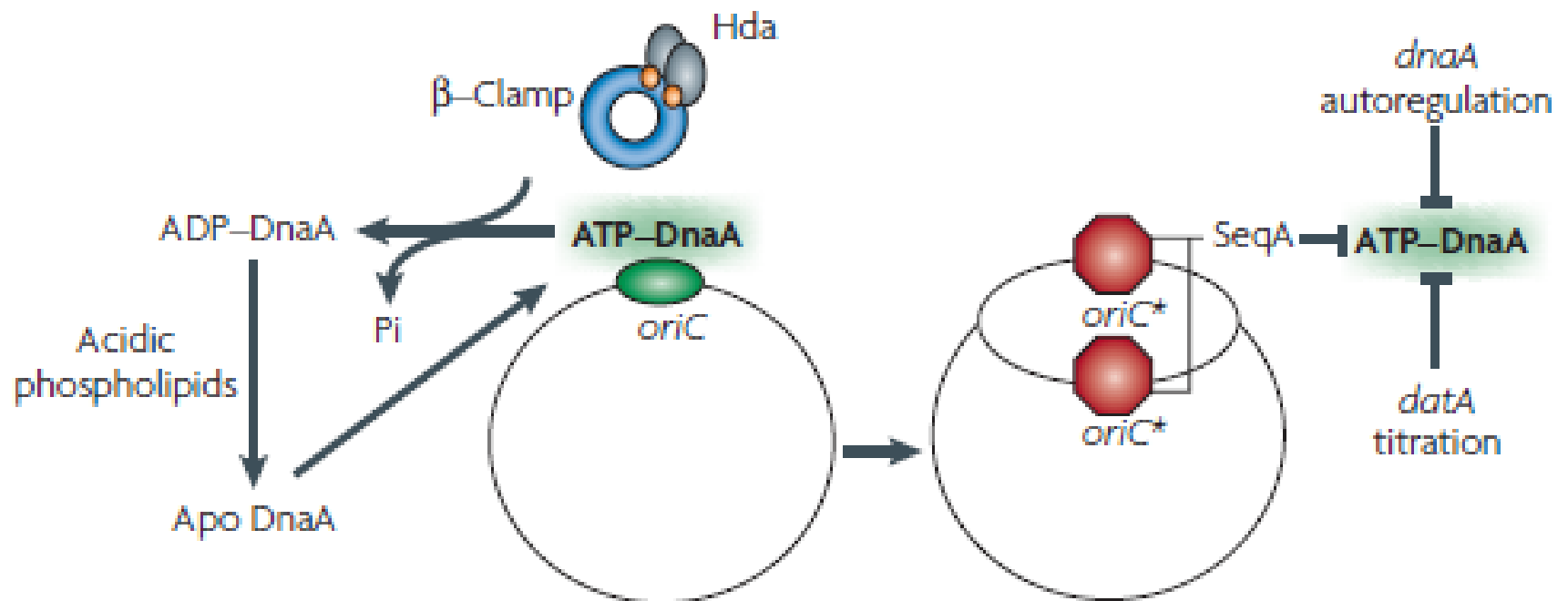
CONTROLLO R.I.D.A. (Regulatory Inactivation of DnaA)

Si tratta di un sistema che inattiva l'innesco della replicazione dopo che questa è iniziata.

E' coinvolta la proteina Hda



RIASSUMENDO.....



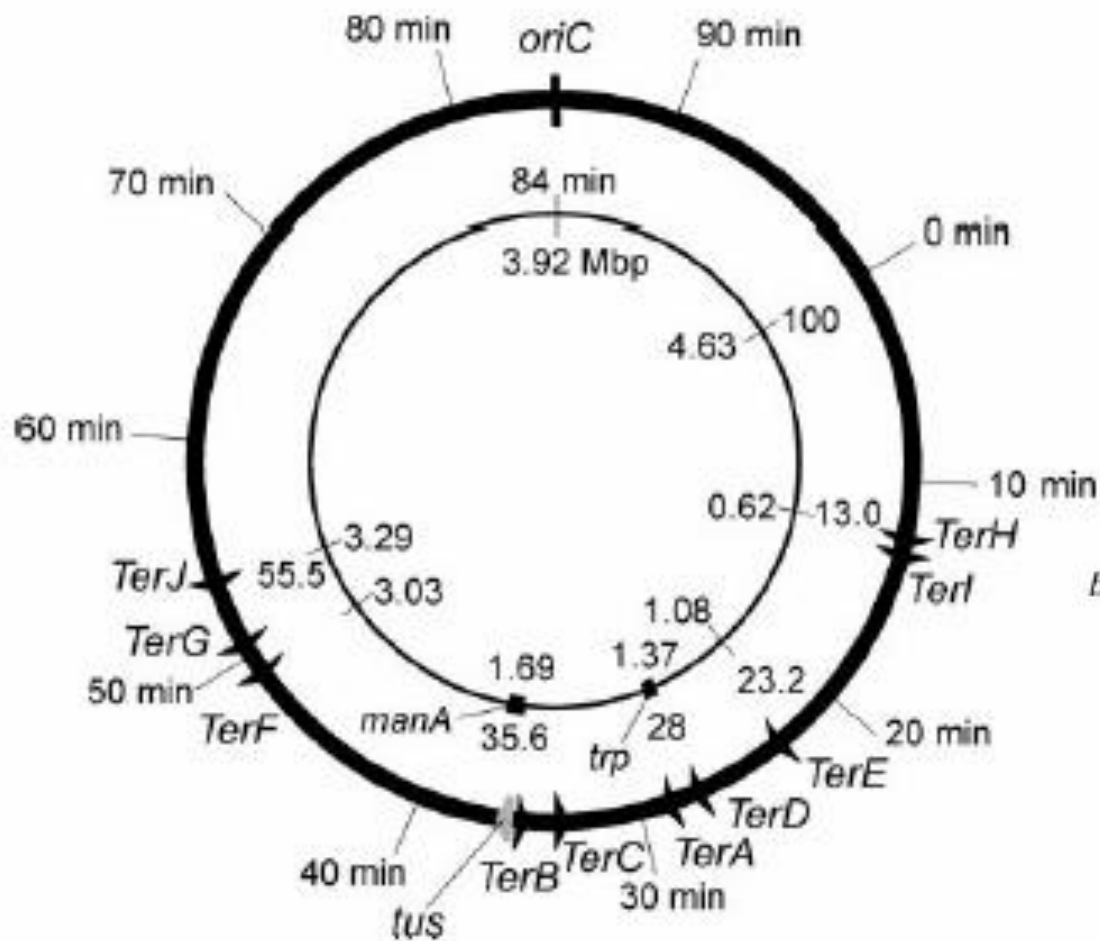
TERMINAZIONE DELLA REPLICAZIONE

La terminazione della replicazione avviene per collisione delle forche replicative.

Il processo è regolato a livello spaziale. Sono stati individuati, infatti, sul cromosoma di *E.coli* e *B.subtilis* i siti di terminazione denominati *ter*. Essi legano due proteine terminatrici denominate rispettivamente Tus e RPT. Queste proteine interrompono il procedere della forza replicativa interagendo probabilmente con la elicasi.

I siti *ter* hanno due caratteristiche importanti:

- o Sono più di uno (almeno 6 in *E.coli*)
- o Funzionano in modo unidirezionale



E. coli Chromosome

TerA	AATTAGTATGTTGTAAGTAAAGT
TerB	AATAA-T-----AGT
TerC	ATATA-G-----TAT
TerD	CATTA-T-----ATG
TerE	TTAAA-T-----GCA
TerF	CCTTC-T-----G-CGAT
TerG	GTCAA-G-----CCA
TerH	CGATC-T-----TCTC
TerI	AACAT-G-A-----CCG
TerJ	ACGCA-T-A-----TGC

R6K Plasmid

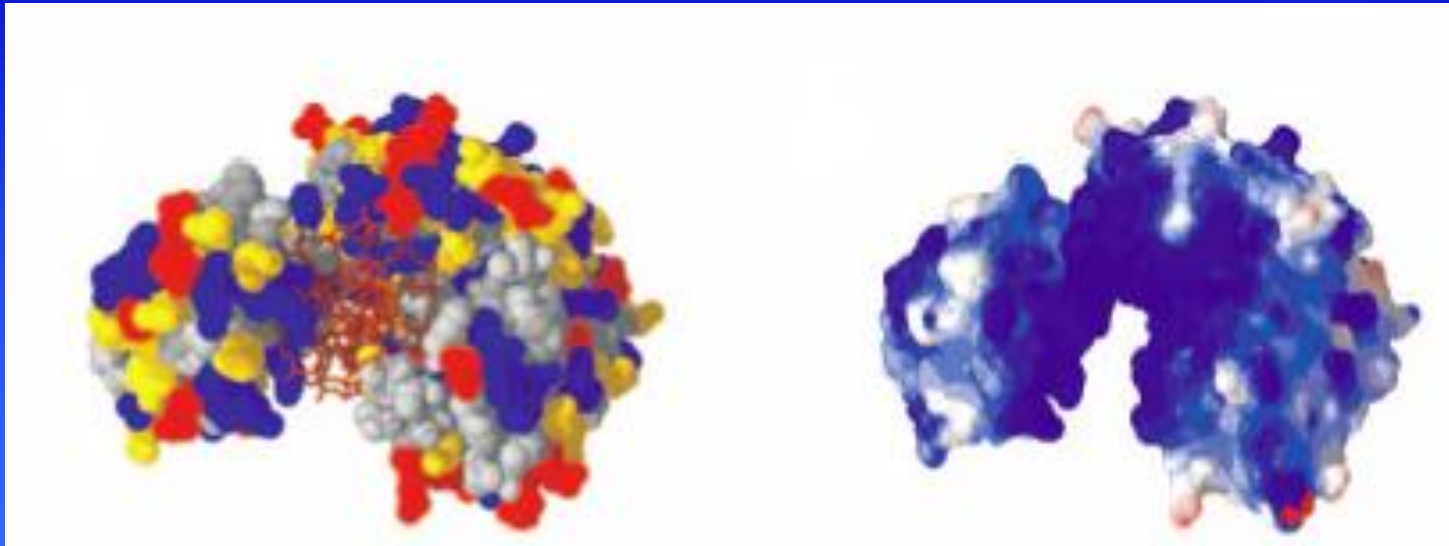
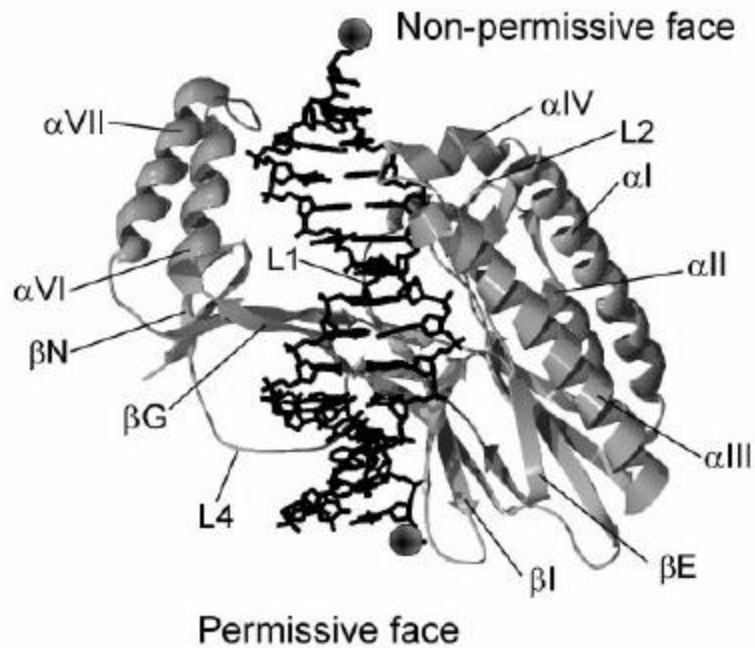
TerR1	CTCTT-TG-----ATC
TerR2	CTATT-AG-----CTAG

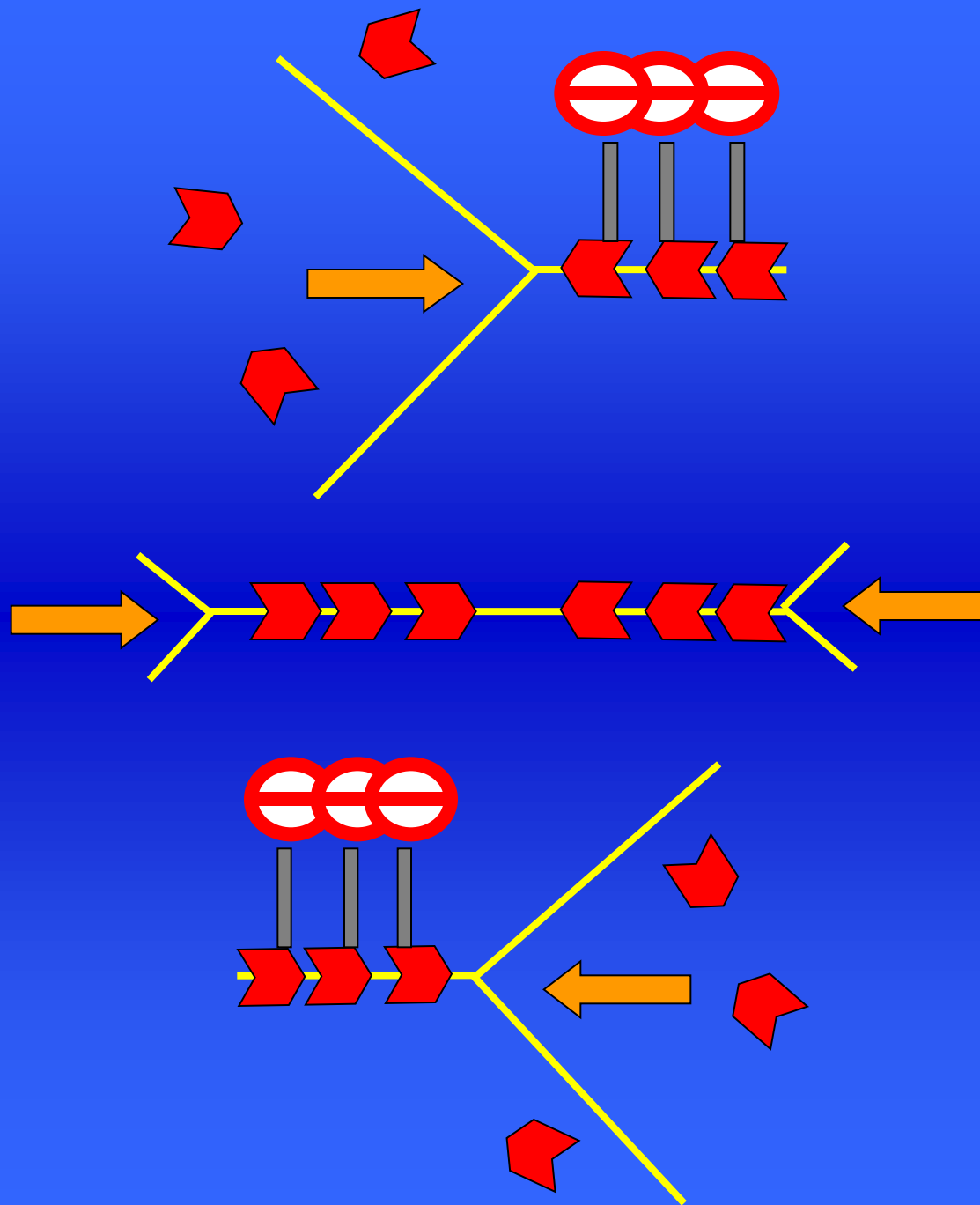
Consensus	AGNATGTTGTAAGTAA
Allowed subs	N-GN-----TG-N
Position	
	5 10 15 20

Neylon et al. 2005

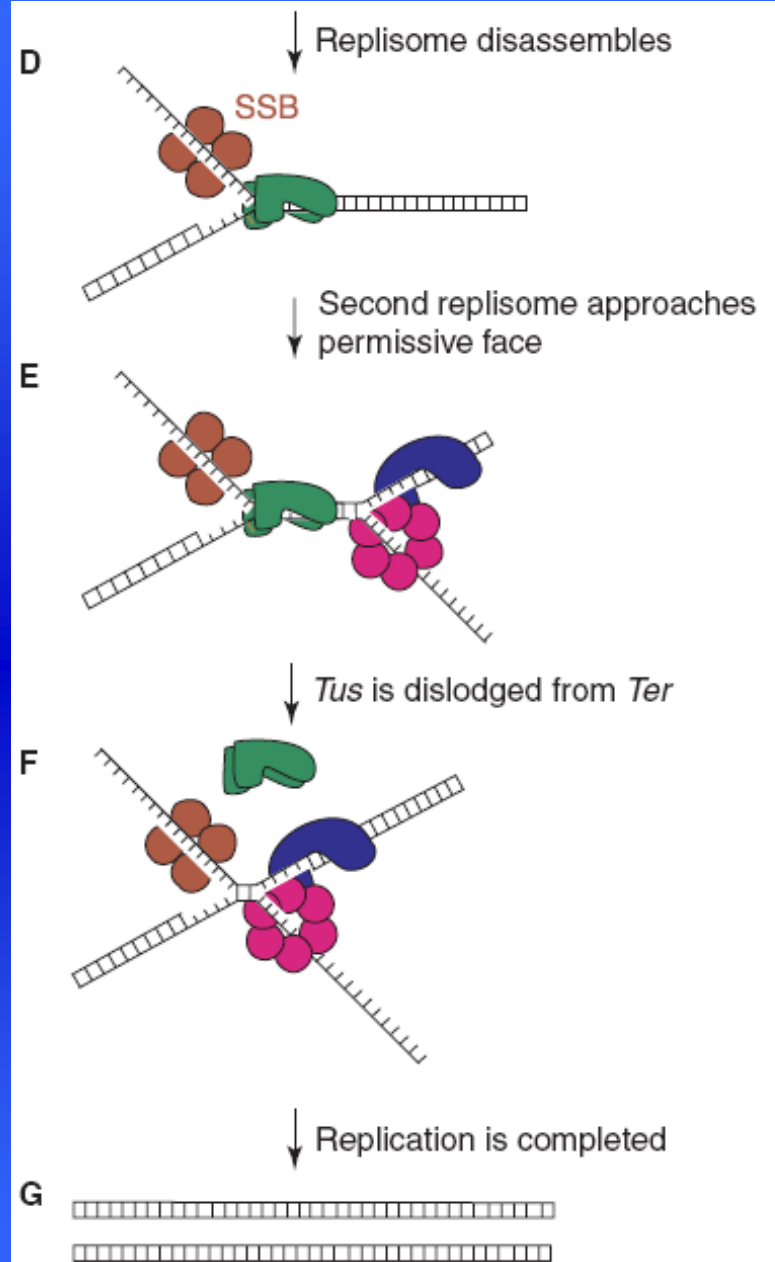
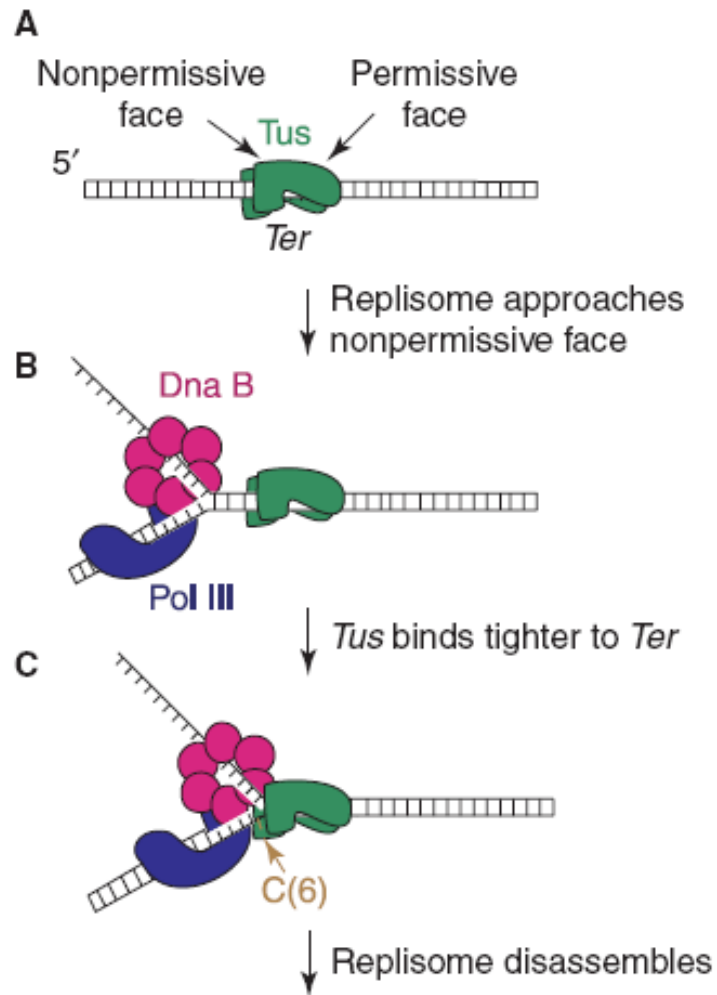
La proteina Tus

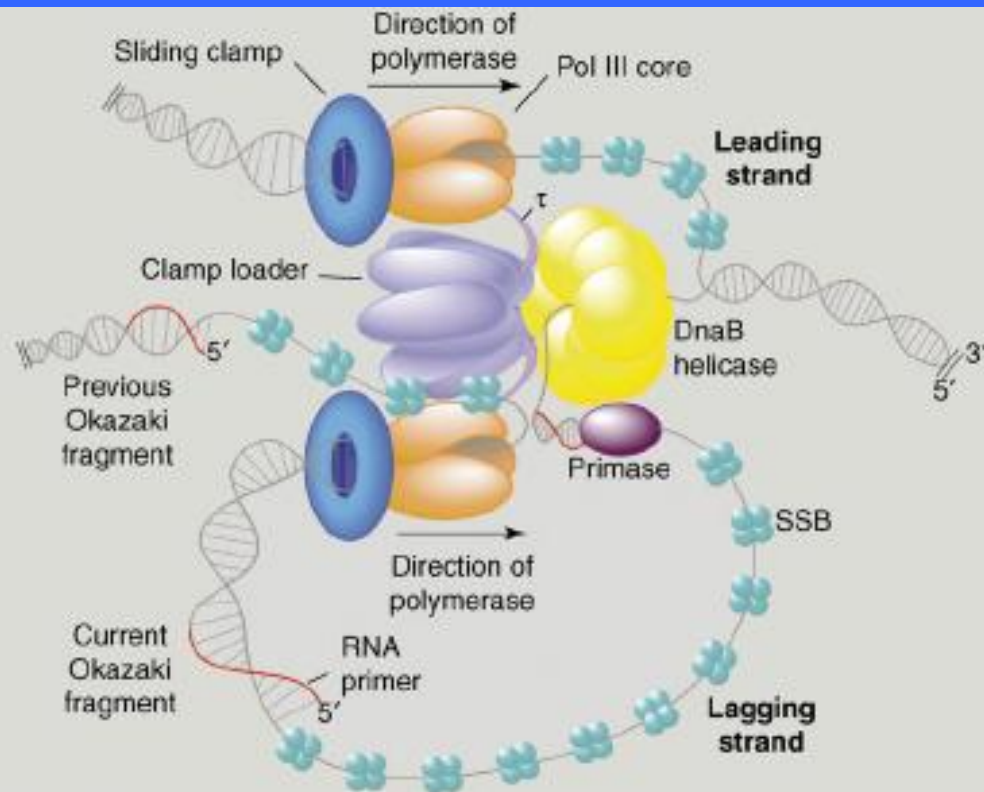
Neylon et al. 2005





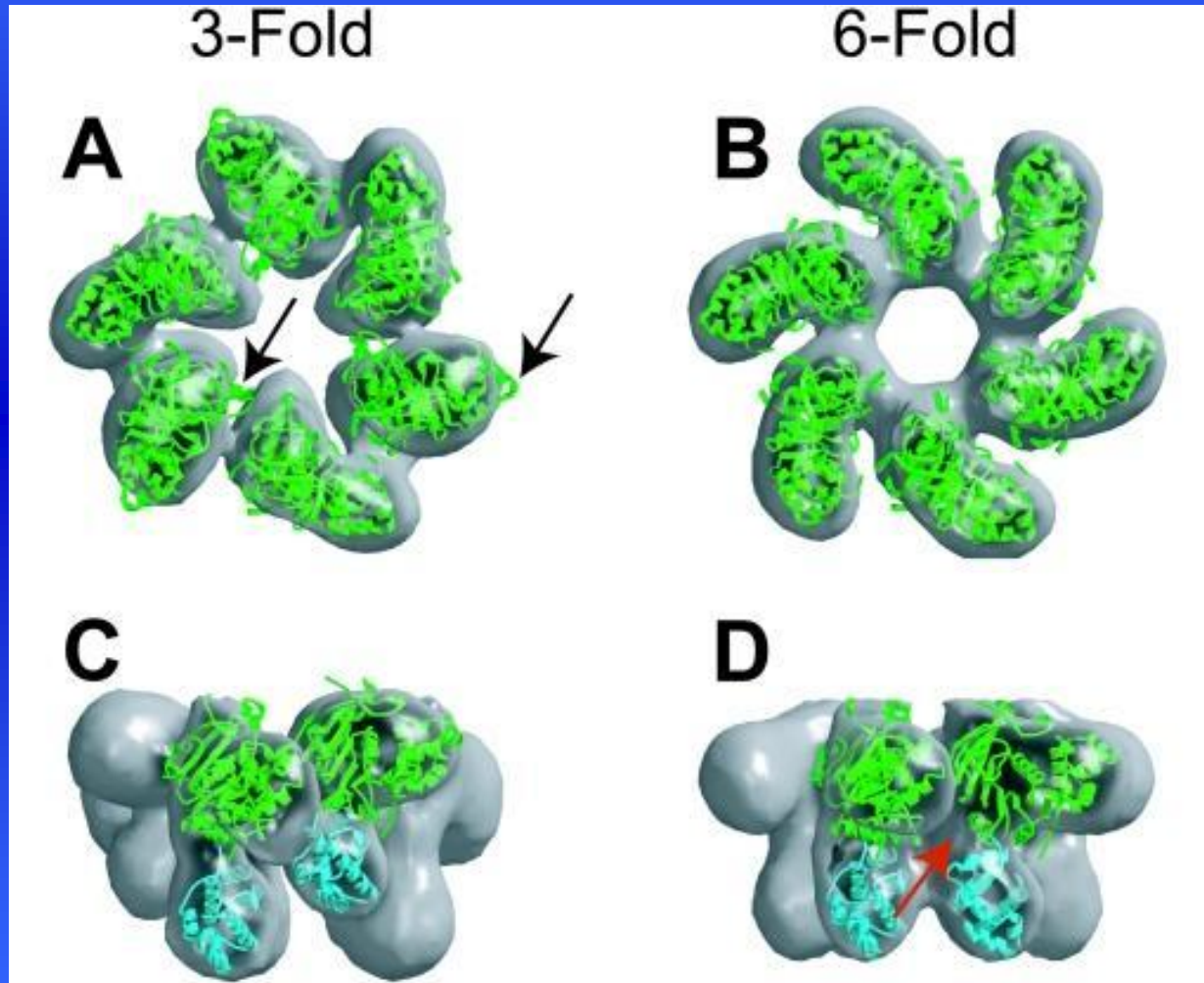
MECCANISMO D'AZIONE DI Tus





Replisome component	Molecular weight (kDa)	Function
Pol III core (heterotrimer)	166	DNA polymerase, 3' to 5' exonuclease
Sliding clamp (homodimer)	40.6 X 2	Processivity factor
Clamp loader (heteropentamer)	297.1	Assembles sliding clamps, protein trafficking
DnaB helicase (homo-hexamers)	52.4 X 6	5' to 3' DNA unwinding
Primase (monomer)	65.6	Synthesizes RNA primers
SSB (homotetramer)	18.8 X 4	Binds to single-stranded DNA, prevents secondary structure

Struttura dell'elicasi



NusA on
Helicase

T7
Helicase

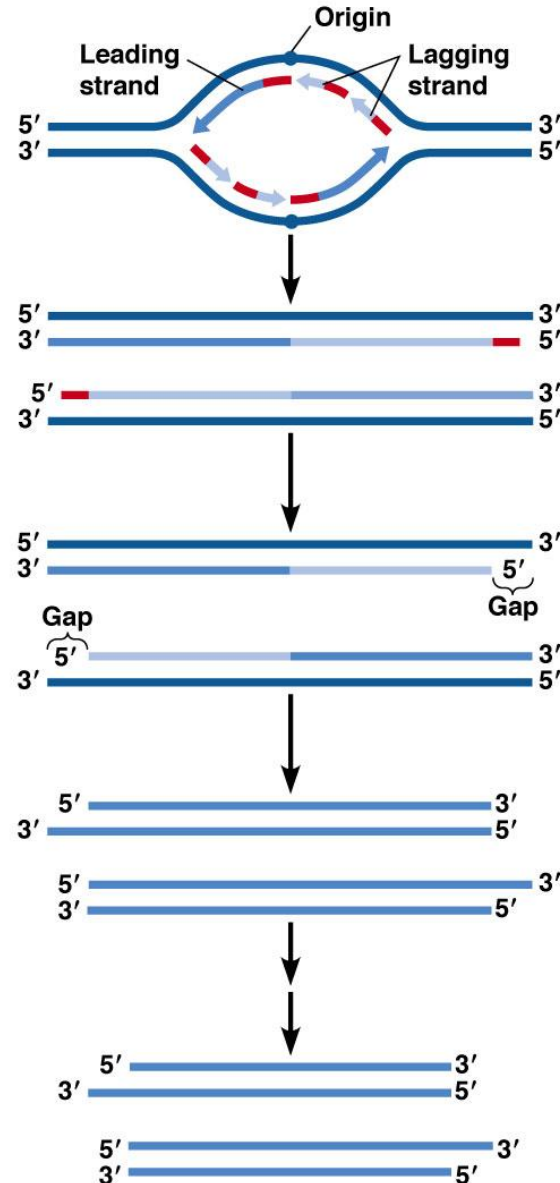
REPLICAZIONE DEI CROMOSOMI LINEARI

1 DNA replication is initiated at the origin; the replication bubble grows as the two replication forks move in opposite directions.

2 Finally only one primer (red) remains on each daughter DNA molecule.

3 The last primers are removed by a $5' \rightarrow 3'$ exonuclease, but no DNA polymerase can fill the resulting gaps because there is no $3'$ OH available to which a nucleotide can be added.

4 Each round of replication generates shorter and shorter DNA molecules.



REPLICAZIONE DEI CROMOSOMI LINEARI

I cromosomi lineari sono caratteristici del genere *Borrelia* (spirochete), *Streptomyces* (gram⁺), l'actinomicete *Rhodococcus fascians* e, infine, uno dei due cromosomi di *Agrobacterium tumefaciens* è lineare

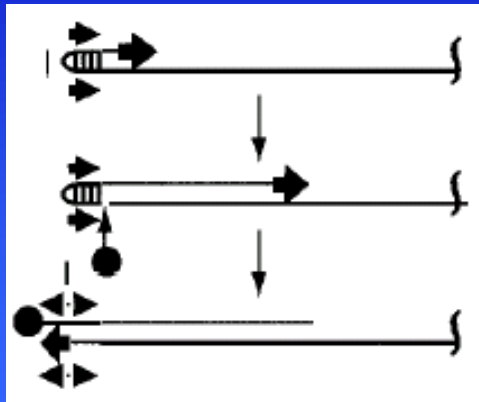
1



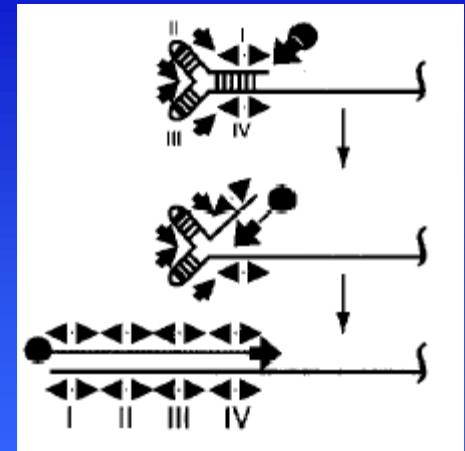
3



2

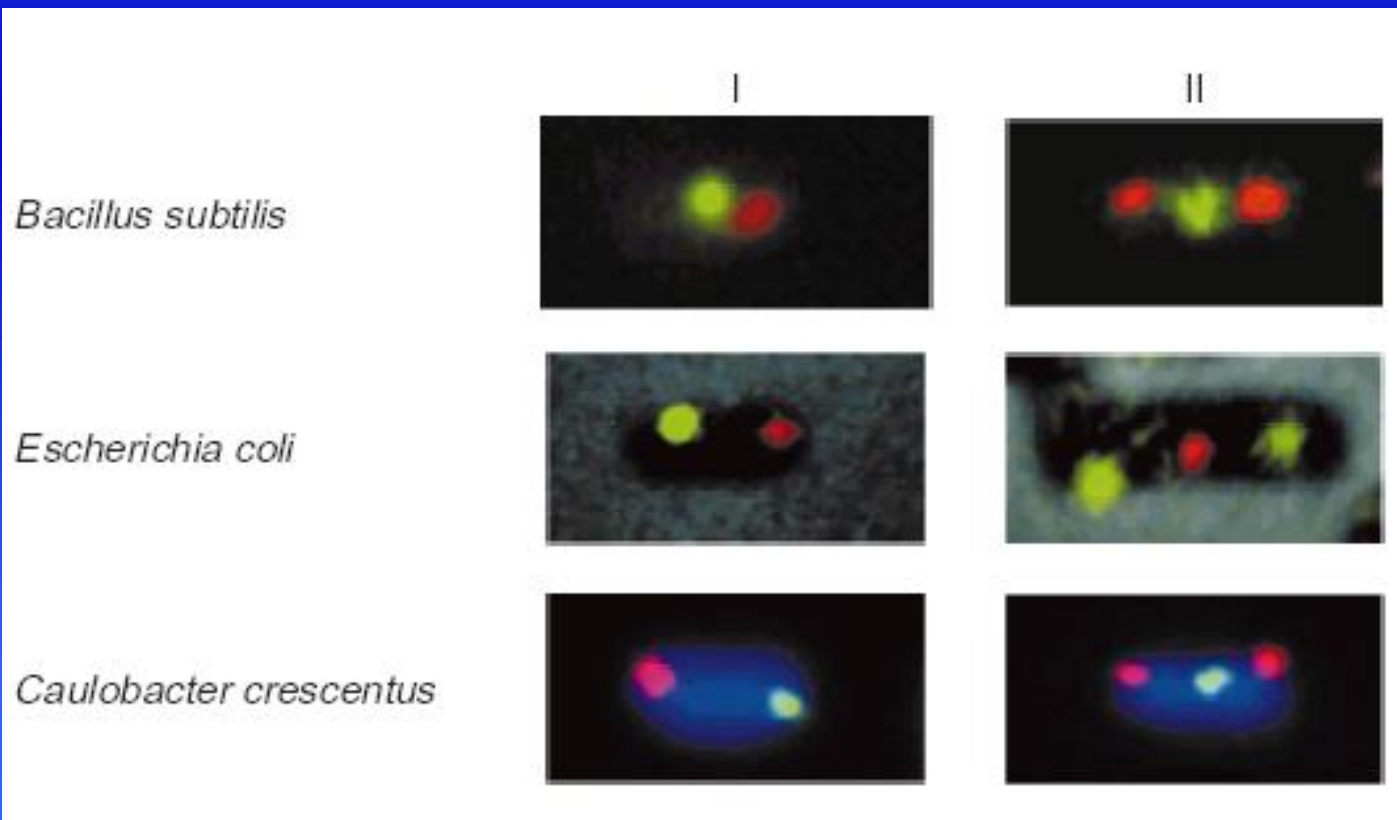


● Terminal protein
➡ DNA polymerase
◄► Palindrome

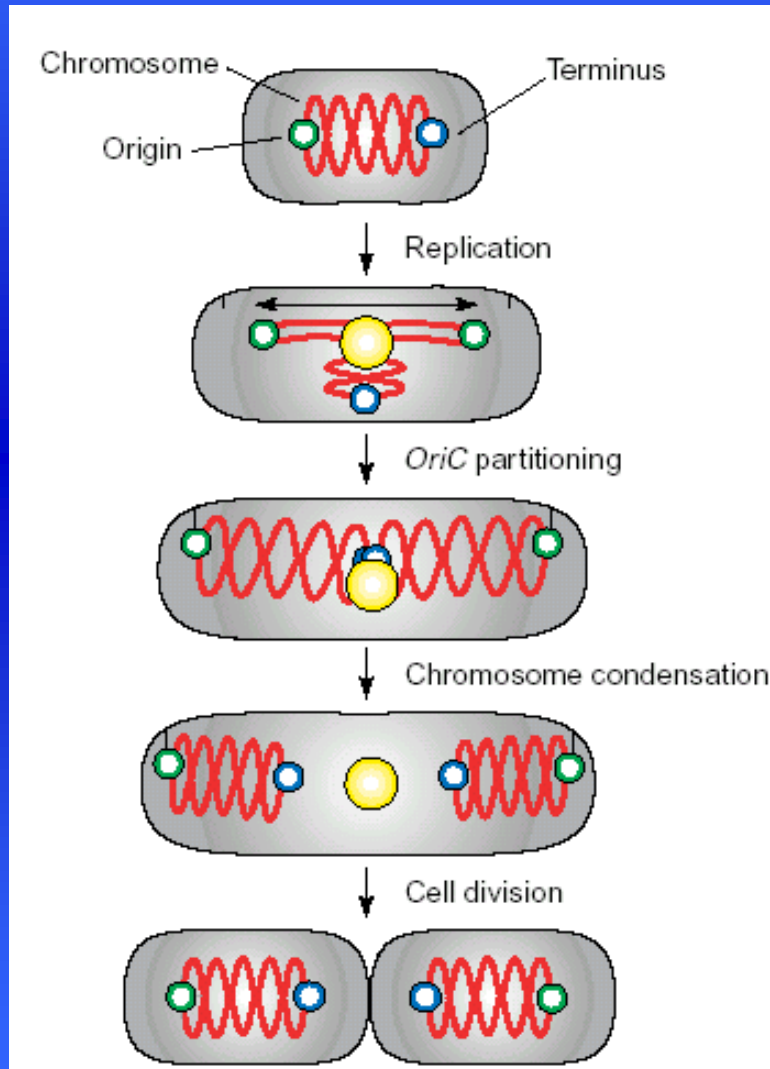


DINAMICA DEI NUCLEOIDI DURANTE LA DIVISIONE CELLULARE

L'analisi delle micrografie in fluorescenza ottenute marcando il DNA nei pressi dell'origine di replicazione in quelli del sito *ter* hanno evidenziato la cinetica della replicazione e la sua organizzazione spaziale:



Modello finale proposto



Il replisoma è ancorato nella regione centrale della cellula

I cromosomi neosintetizzati migrano alle estremità polari con l'origine di replicazione

Una volta replicato i due cromosomi devono essere separati e sequestrati nelle due cellule figlie

**Questo processo può essere suddiviso in due fasi distinte:
il **cleaning** ed il **partitioning****

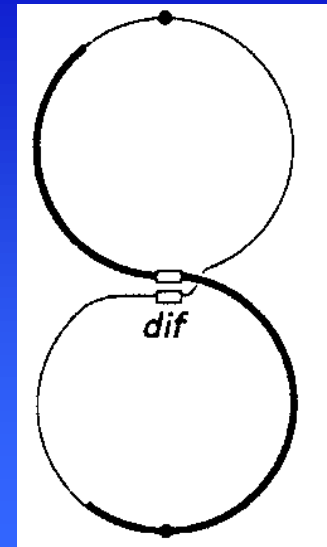
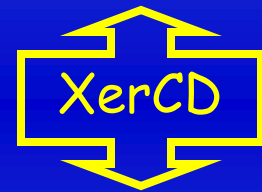
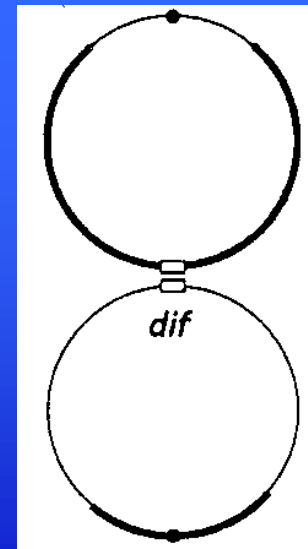
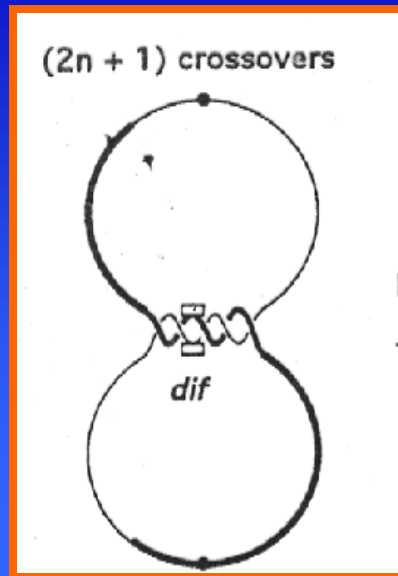
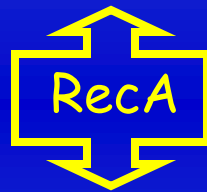
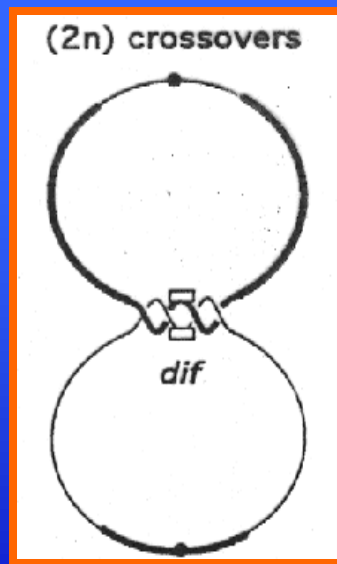
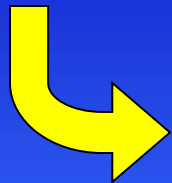
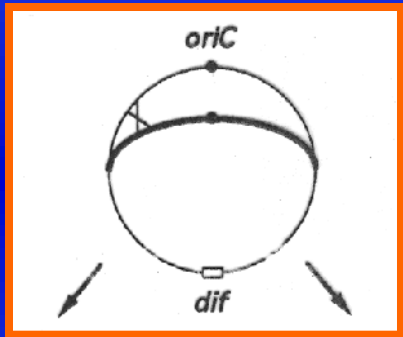
Il **cleaning** prevede la risoluzione dei grovigli e delle eventuali ricombinazioni avvenute tra le sequenze omologhe dei due cromosomi neosintetizzati

Il **partitioning** è invece il processo responsabile della migrazione dei due cromosomi neosintetizzati nelle due cellule figlie

CLEANING

Nel processo di cleaning intervengono

- **la proteina RecA con il sistema di ricombinazione omologa**
- **La topoisomerasi IV (*parC* e *parE*)**
- **La resolvasi del sistema XerCD**



PARTITIONING

Inizialmente la teoria per la quale l'origine di replicazione viene sequestrata dal rivestimento cellulare aveva portato all'ipotesi che questi punti di ancoraggio servissero alla cellula anche per trainare i due cromosomi figli all'estremità della cellula. In questo caso la forza trainante era data dal processo di allungamento del rivestimento cellulare.

Questa teoria entrò in crisi quando si osservò che la velocità di spostamento dei cromosomi neosintetizzati era superiore a quella dell'allungamento della cellula.

Studio genetico del partitioning di grandi plasmidi come il plasmide coniugativo F, il plasmide P1 e R1.

È stato scoperto un locus genico responsabile di questo fenomeno:

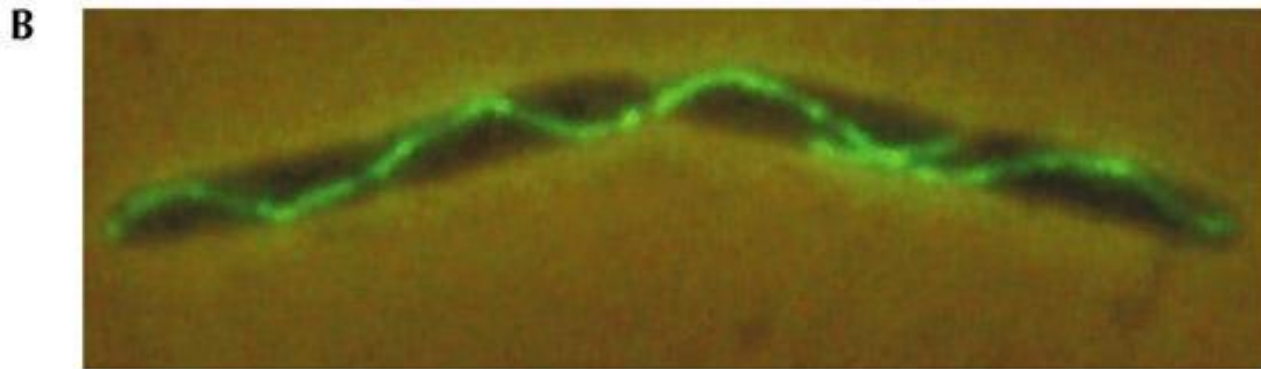
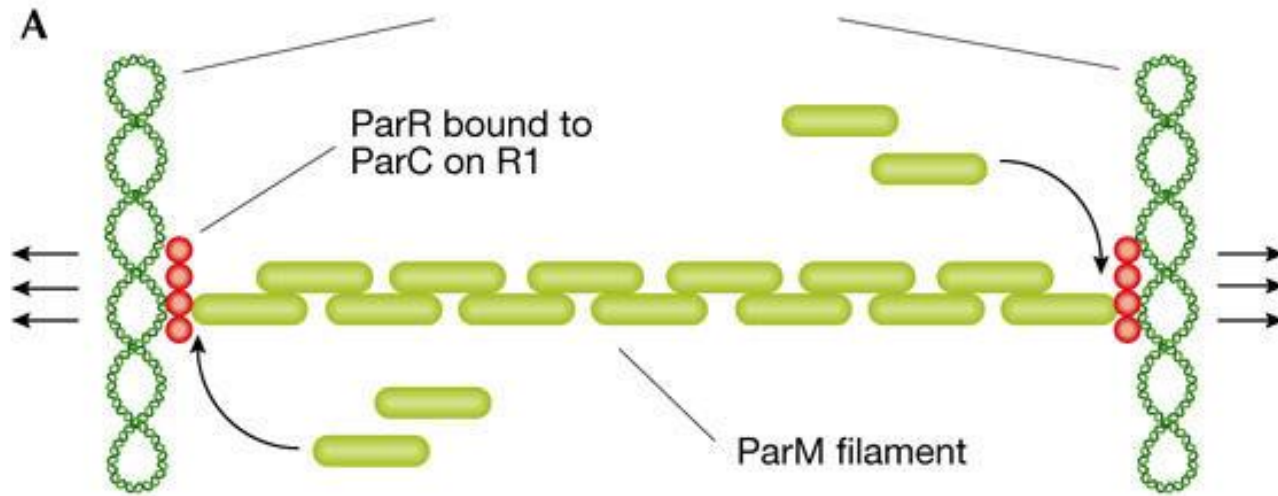
parAB con parS per F

sopAB con sopC per P1

parMR con parC per R1

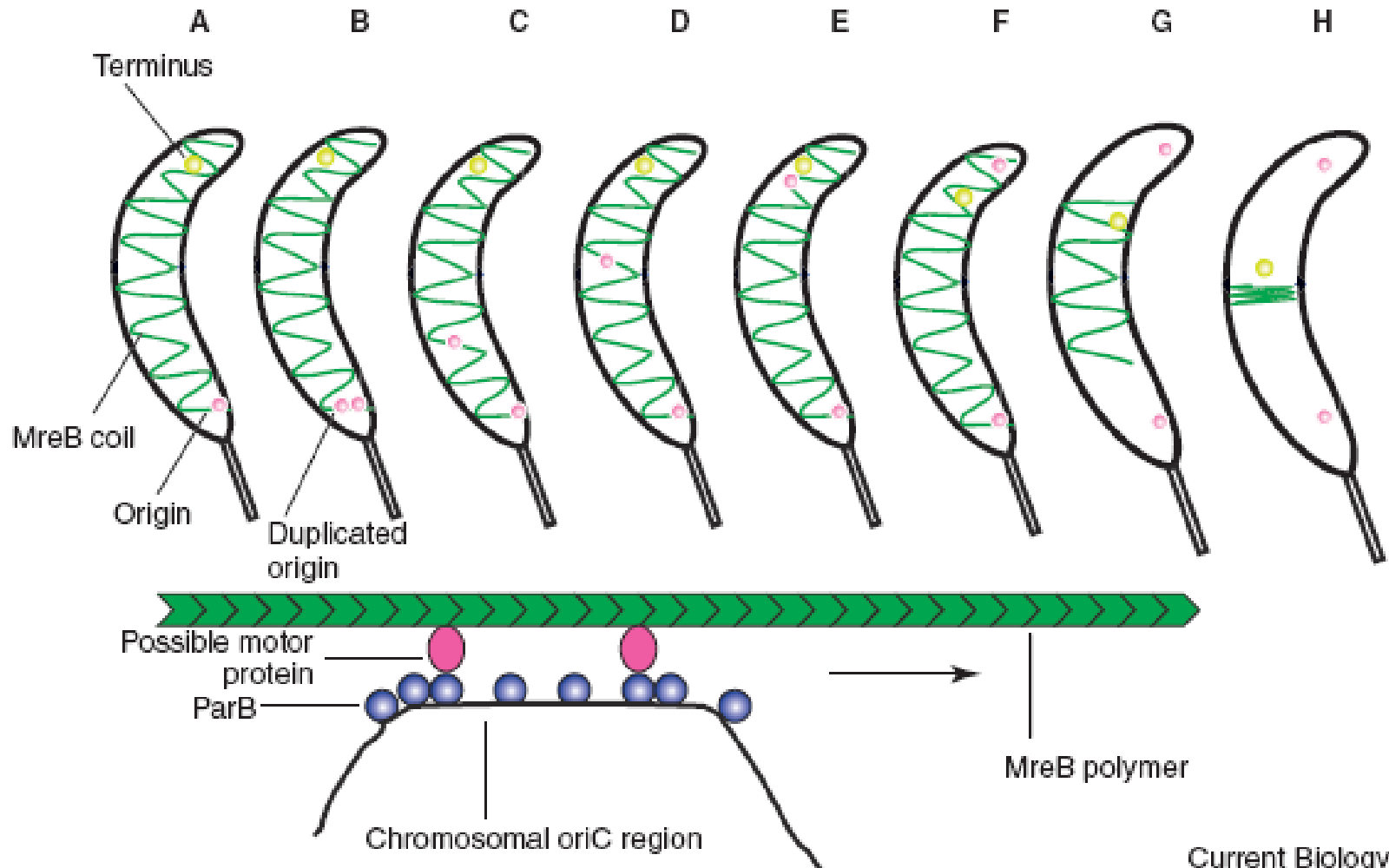
Ciascuno di questi loci sono costituiti da due geni (*parA/sopA/parM* e *parB/sopB/parR*) e un sito di legame per la seconda proteina del sistema (*parS/sopC/parC*)

ParM, ParR e *parC*



Sono stati trovati omologhi cromosomali dei sistemi *par* e di quello *sop* in molti microrganismi, tra questi i più importanti sono *B.subtilis* (*soj-spo0J*) e *Caulobacter crescentus* (*parA-parB*).

Coinvolgimento di MreB



Referenze

- **Pomertantz et al. Replisome mechanics: insights into a twin DNA polymerase machine. (2007) TRENDS in microbiol 15 (4): 156-164**
- **Mott & Berger. DNA replication initiation: mechanisms and regulation in bacteria. (2007) Nat. rev. Microbiol. 5: 343-354**
- **Margolin W. Bacterial Mitosis: Actin in a New Role at the origin. (2005). Curr. Biol. 15(7): R259.R261**

Links

- <http://www.wehi.edu.au/education/wehi-tv/dna/replication.html>
- <http://www.scianafilms.com/html/animation/features/t7/index.htm>