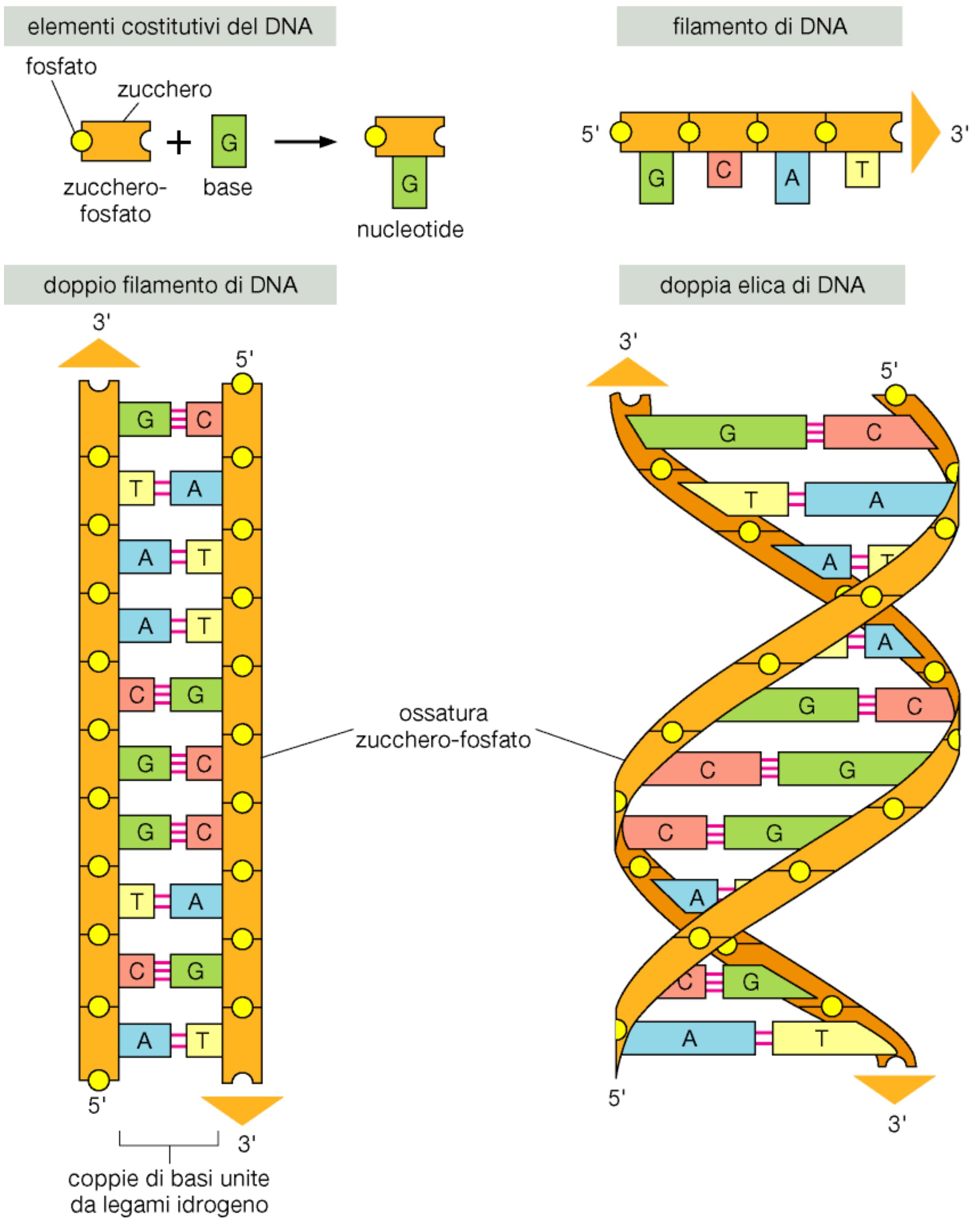
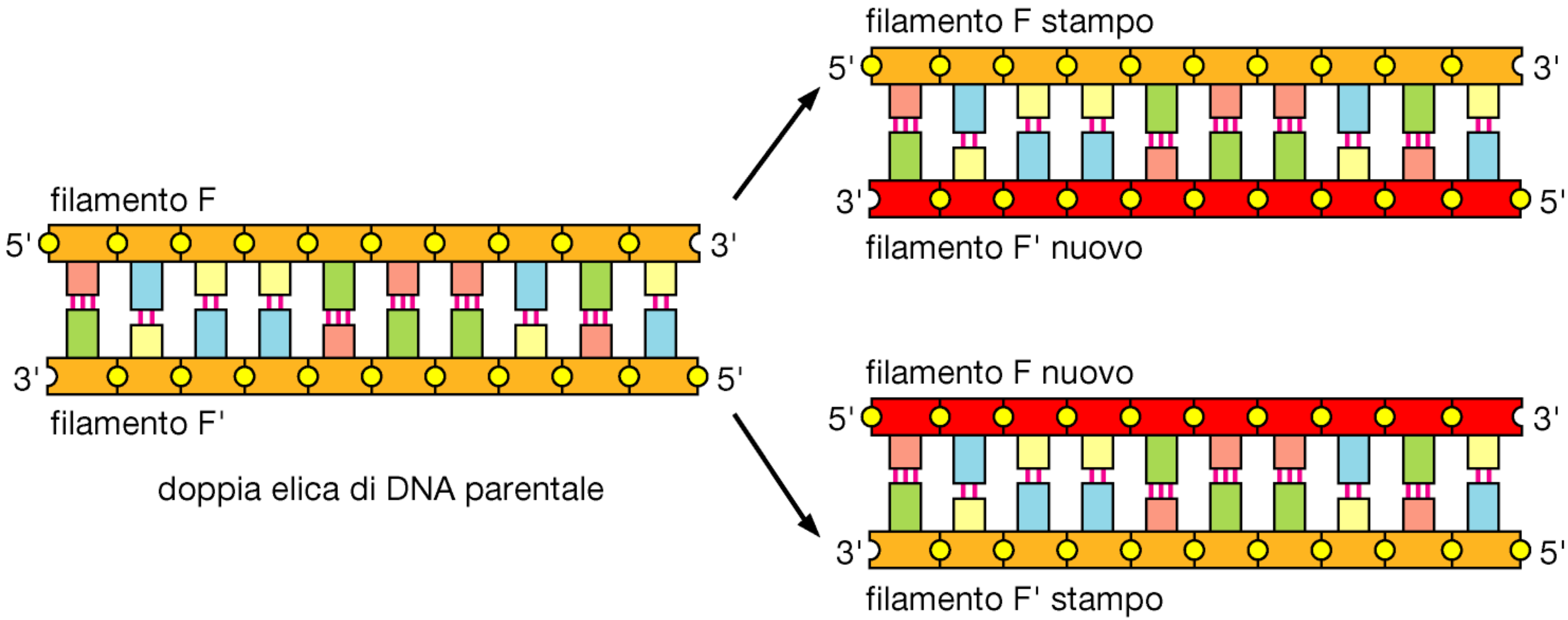
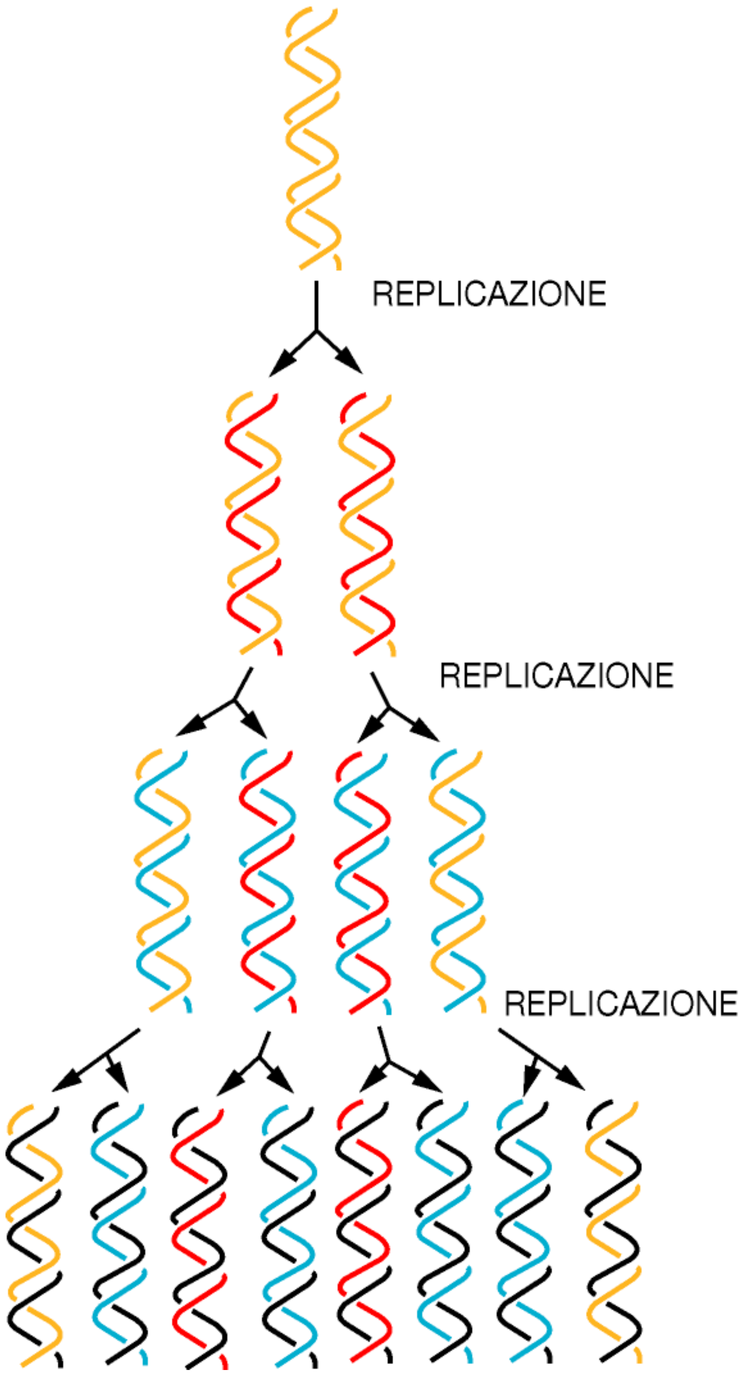
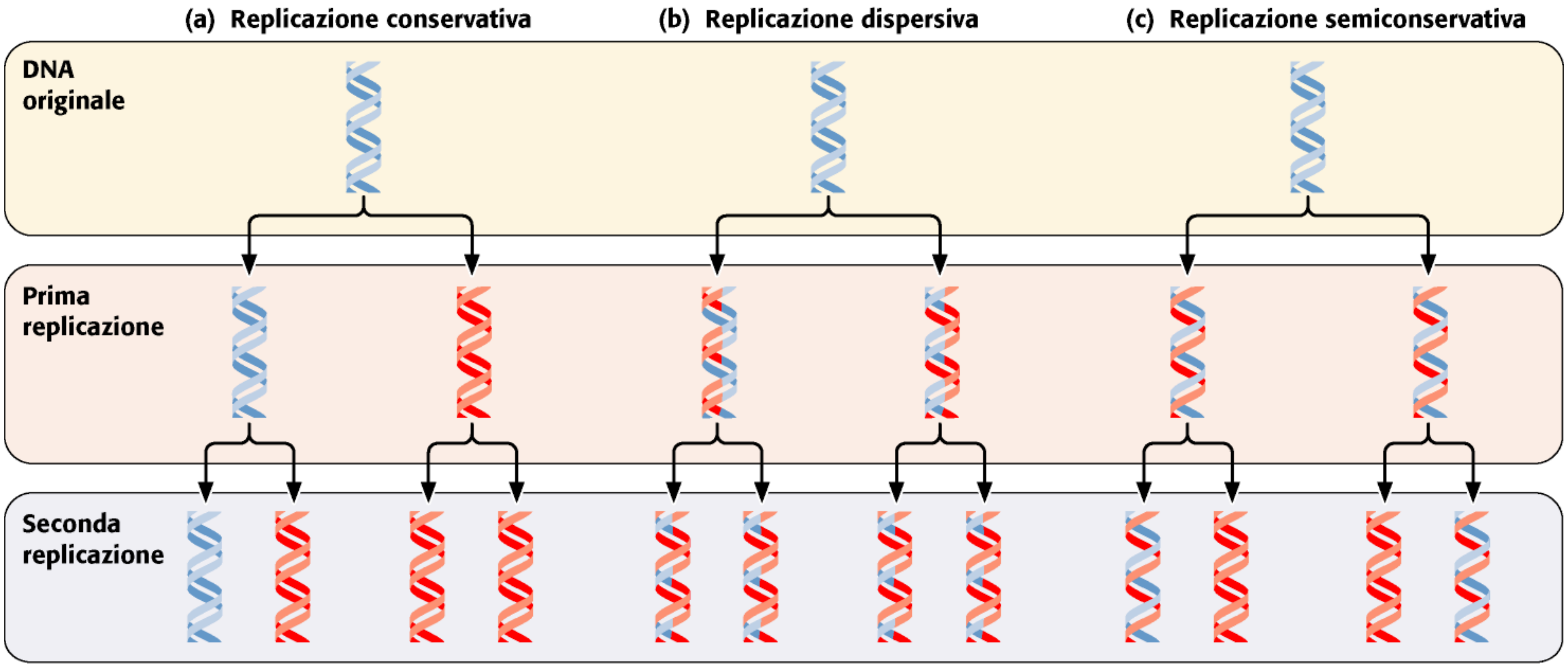
Replicazione del DNA


elementi costitutivi del DNA
fosfato
zucchero
zucchero-fosfato
base
G
nucleotide
filamento di DNA
5'
3'
G C A T
doppio filamento di DNA
3'
5'
G C
T A
A T
A T
C G
G C
G C
T A
C G
A T
5'
3'
coppie di basi unite da legami idrogeno
ossatura zucchero-fosfato
doppia elica di DNA
3'
5'
G C
T A
A T
A
G C
C G
C G
A
C G
A T
5'
3'



filamento F
5'
3'
3'
5'
filamento F'
doppia elica di DNA parentale
filamento F stampo
5'
3'
3'
5'
filamento F' nuovo
filamento F nuovo
5'
3'
3'
5'
filamento F' stampo


REPLICAZIONE
REPLICAZIONE
REPLICAZIONE

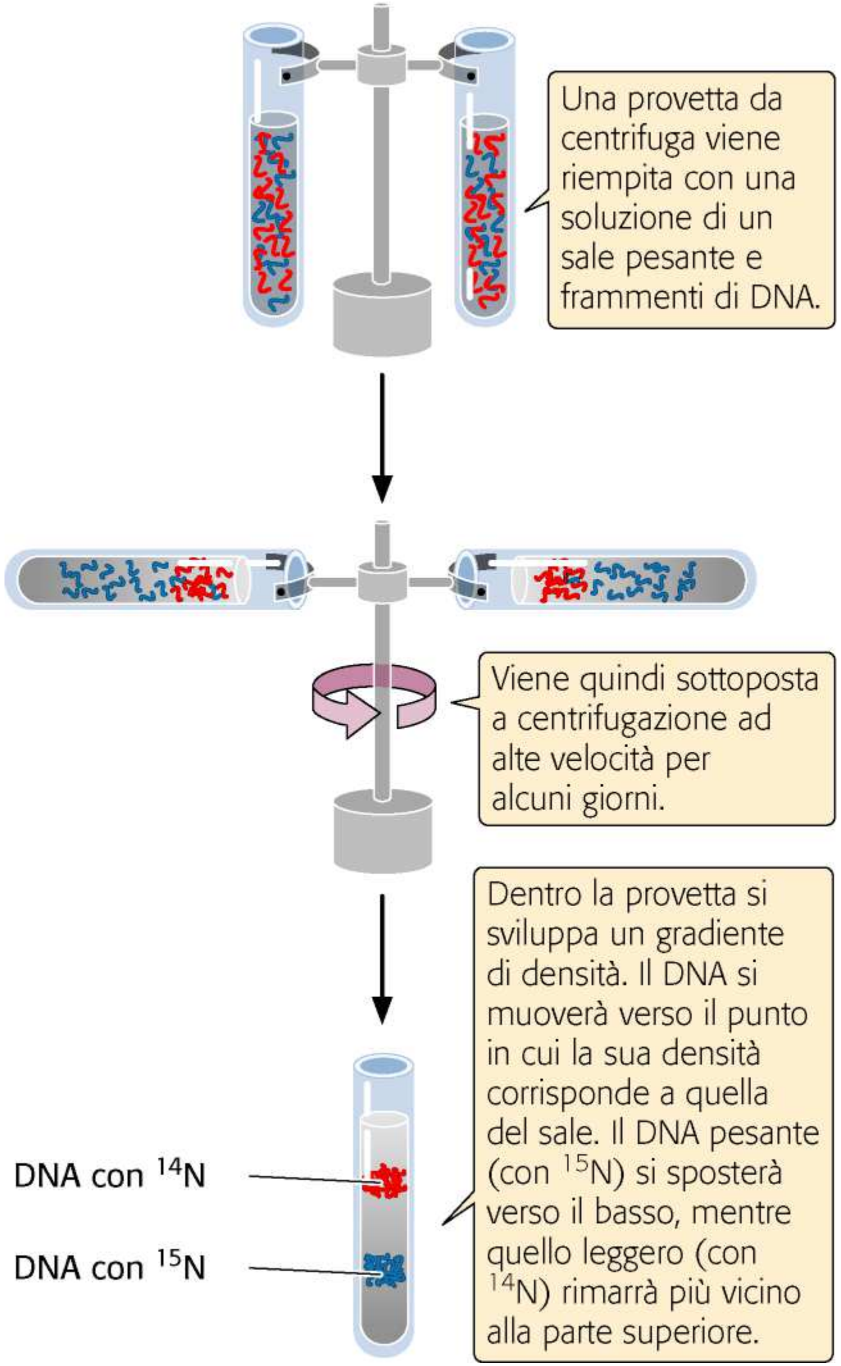

(a) Replicazione conservativa
(b) Replicazione dispersiva
(c) Replicazione semiconservativa
DNA originale
Prima replicazione
Seconda replicazione

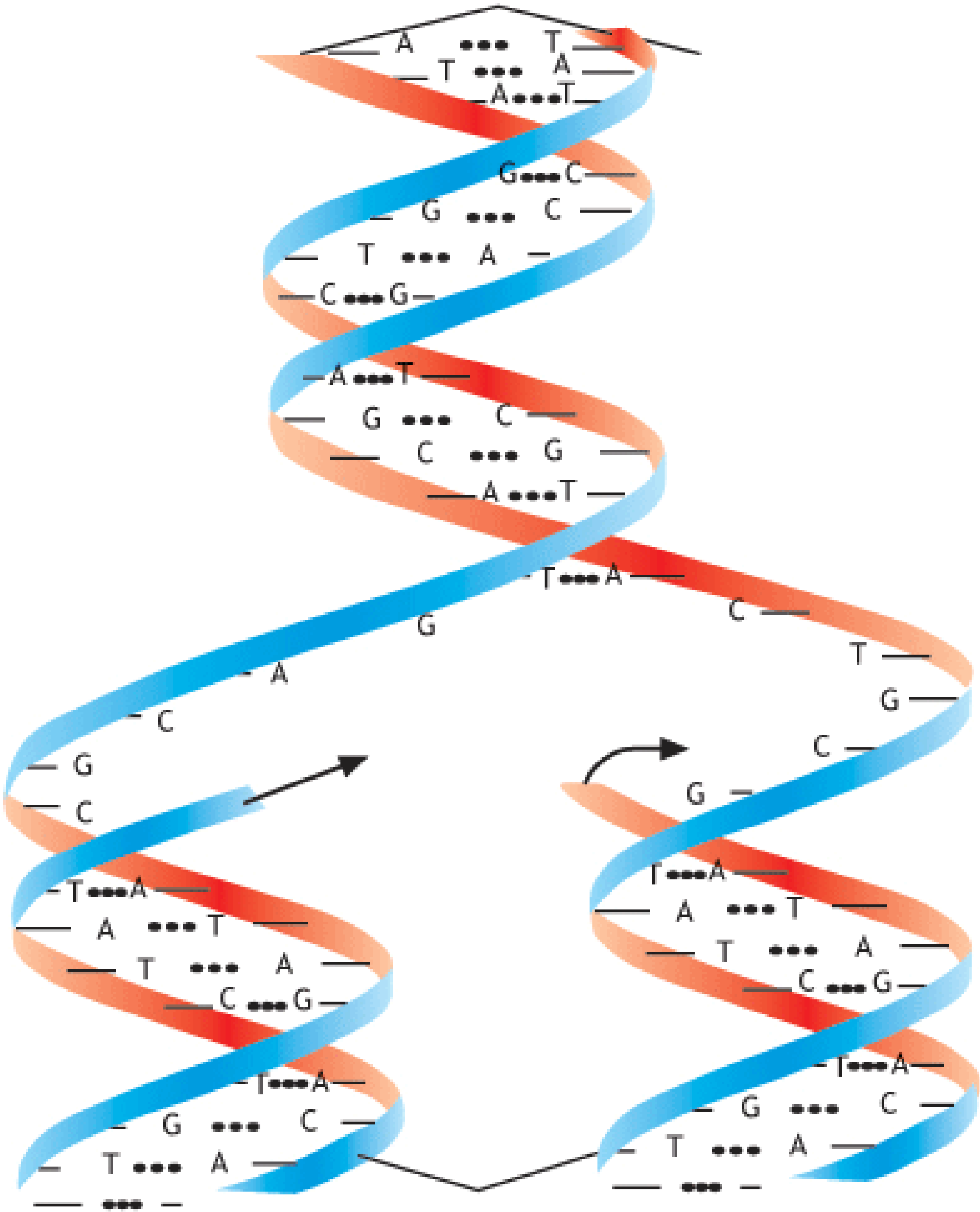
Esperimento di Meselson e Stahl

(1958)

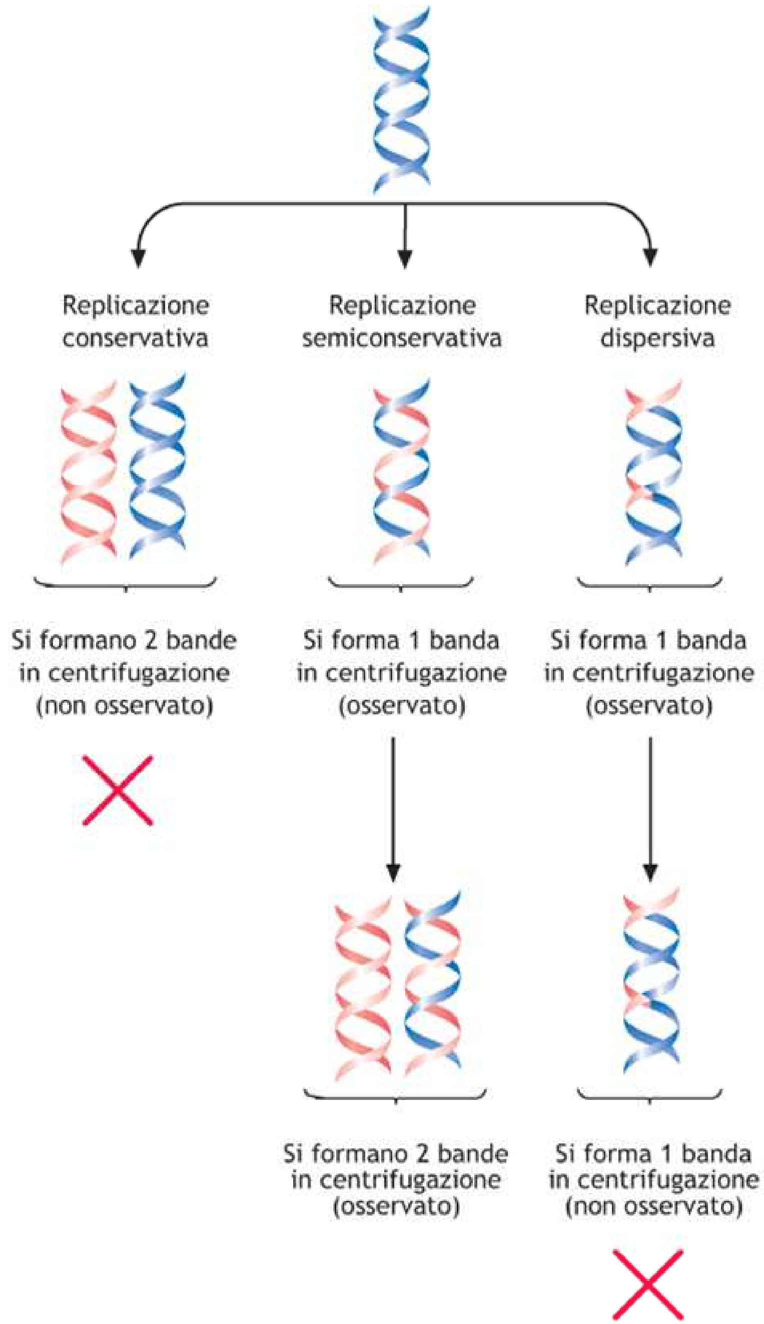
^{14}N = azoto leggero

^{15}N = azoto pesante


Una provetta da centrifuga viene riempita con una soluzione di un sale pesante e frammenti di DNA.
Viene quindi sottoposta a centrifugazione ad alte velocità per alcuni giorni.
Dentro la provetta si sviluppa un gradiente di densità. Il DNA si muoverà verso il punto in cui la sua densità corrisponde a quella del sale. Il DNA pesante (con ^{15}N) si sposterà verso il basso, mentre quello leggero (con ^{14}N) rimarrà più vicino alla parte superiore.
DNA con ^{14}N
DNA con ^{15}N

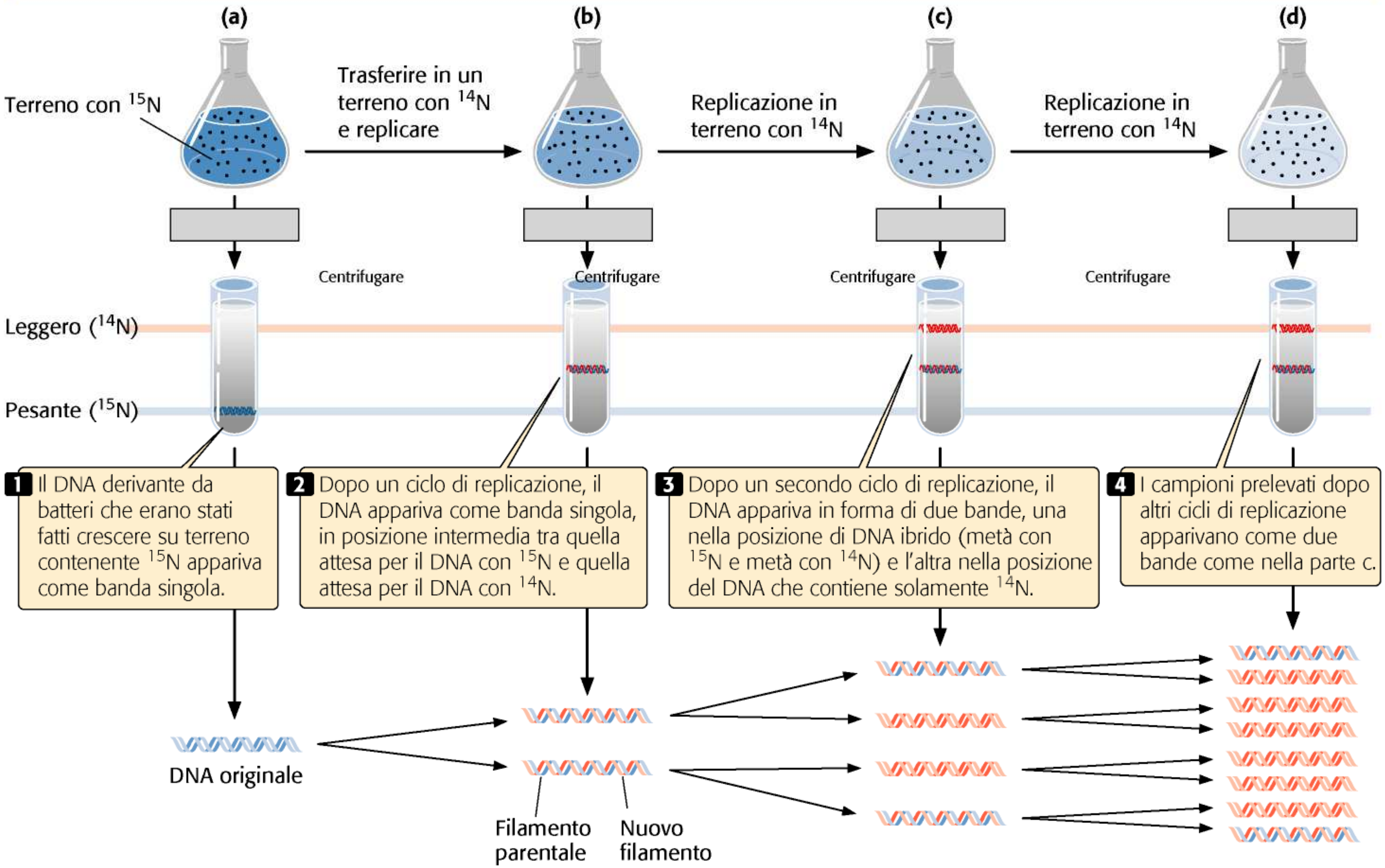


A T
T A
A T
G C
G C
T A
C G
A T
G C
C G
A T
T A
G
A
C
G
C
C
T
G
C
G
T A
A T
T A
C G
T A
G C
T A
T A
A T
T A
C G
T A
G C
T A

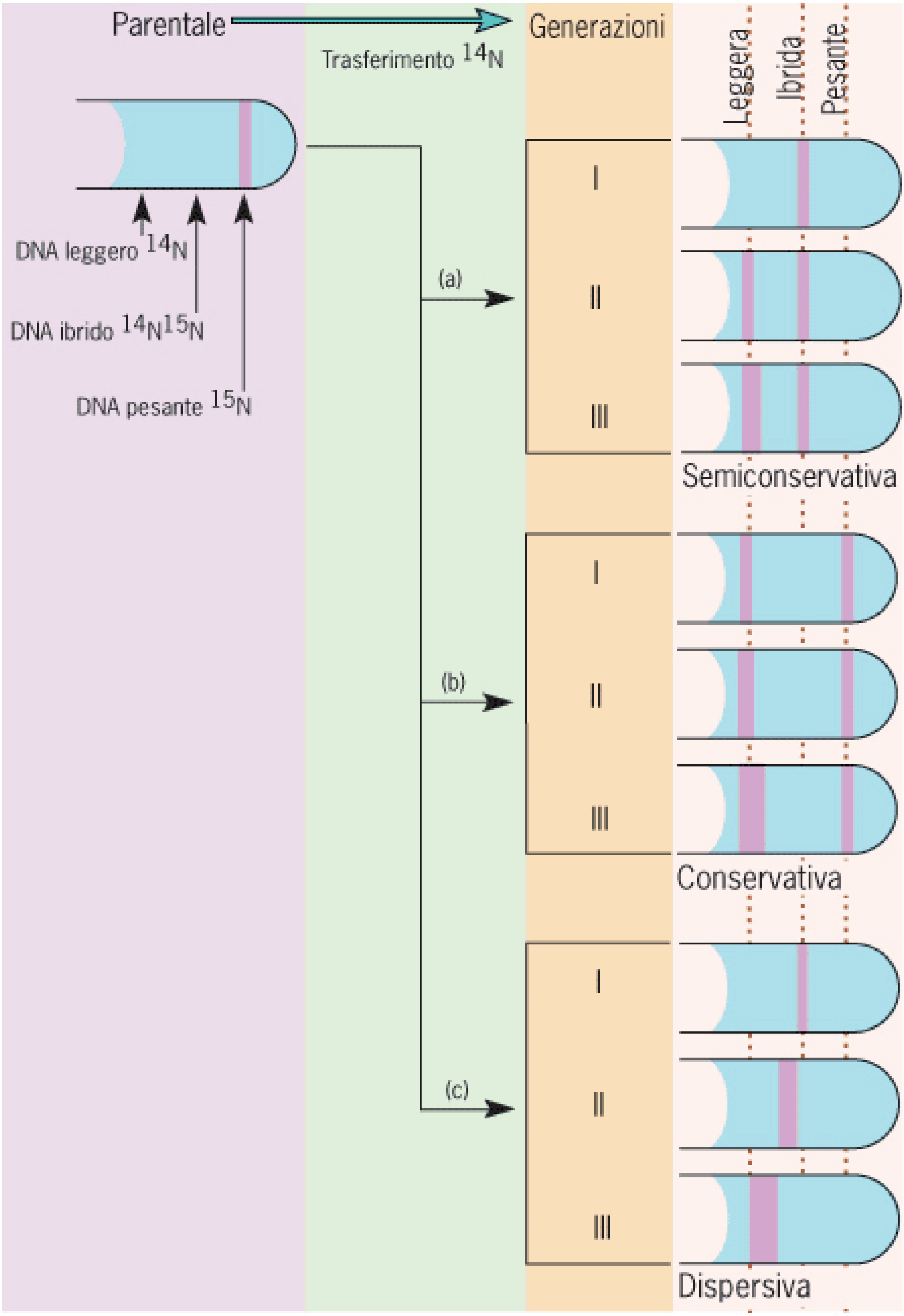

Replicazione conservativa
Replicazione semiconservativa
Replicazione dispersiva
Si formano 2 bande in centrifugazione (non osservato)
Si forma 1 banda in centrifugazione (osservato)
Si forma 1 banda in centrifugazione (osservato)
Si formano 2 bande in centrifugazione (osservato)
Si forma 1 banda in centrifugazione (non osservato)

Esperimento

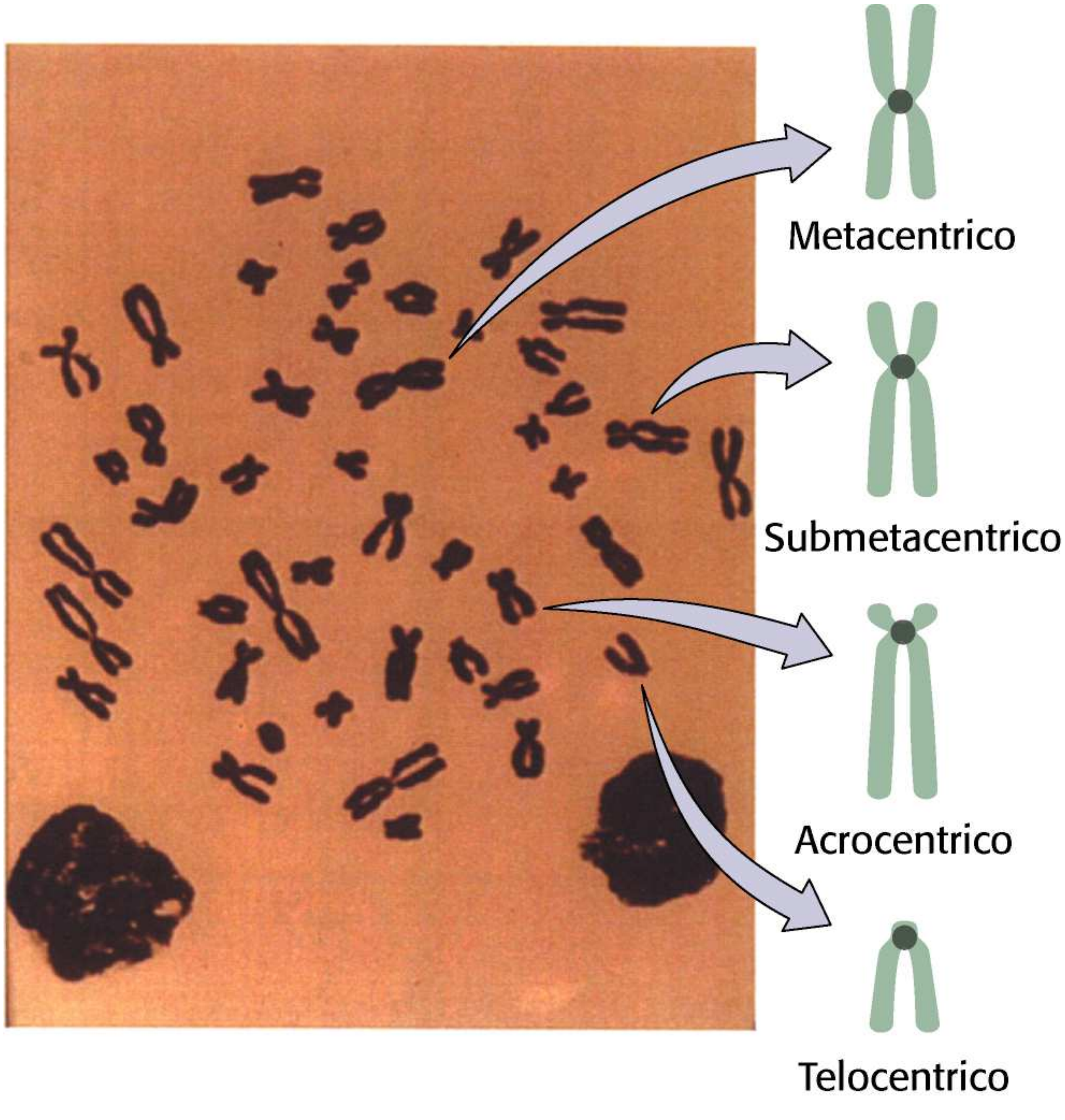
Domanda: Quale modello di replicazione del DNA (conservativa, dispersiva o semiconservativa) si applica a *E. coli*?

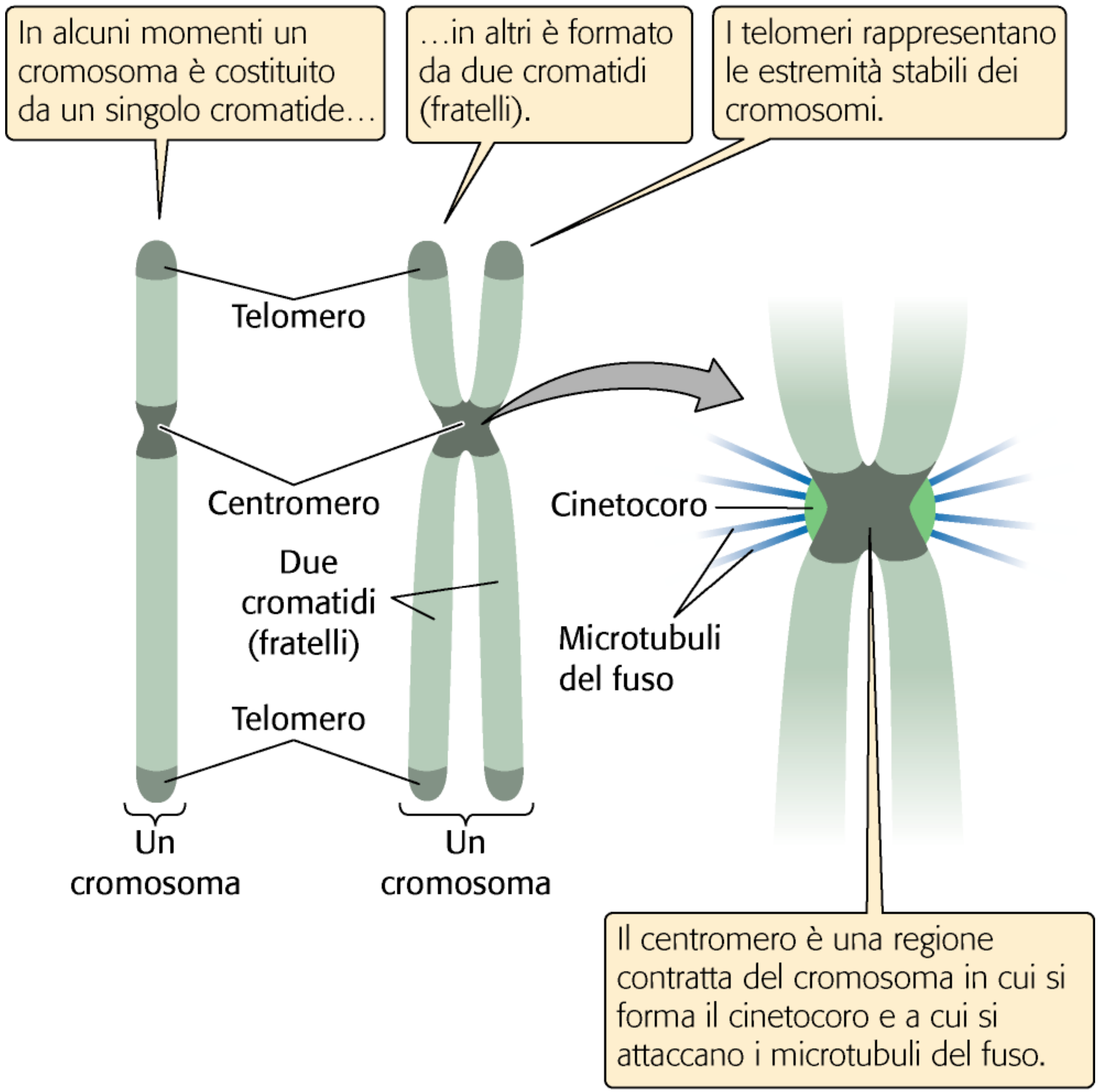


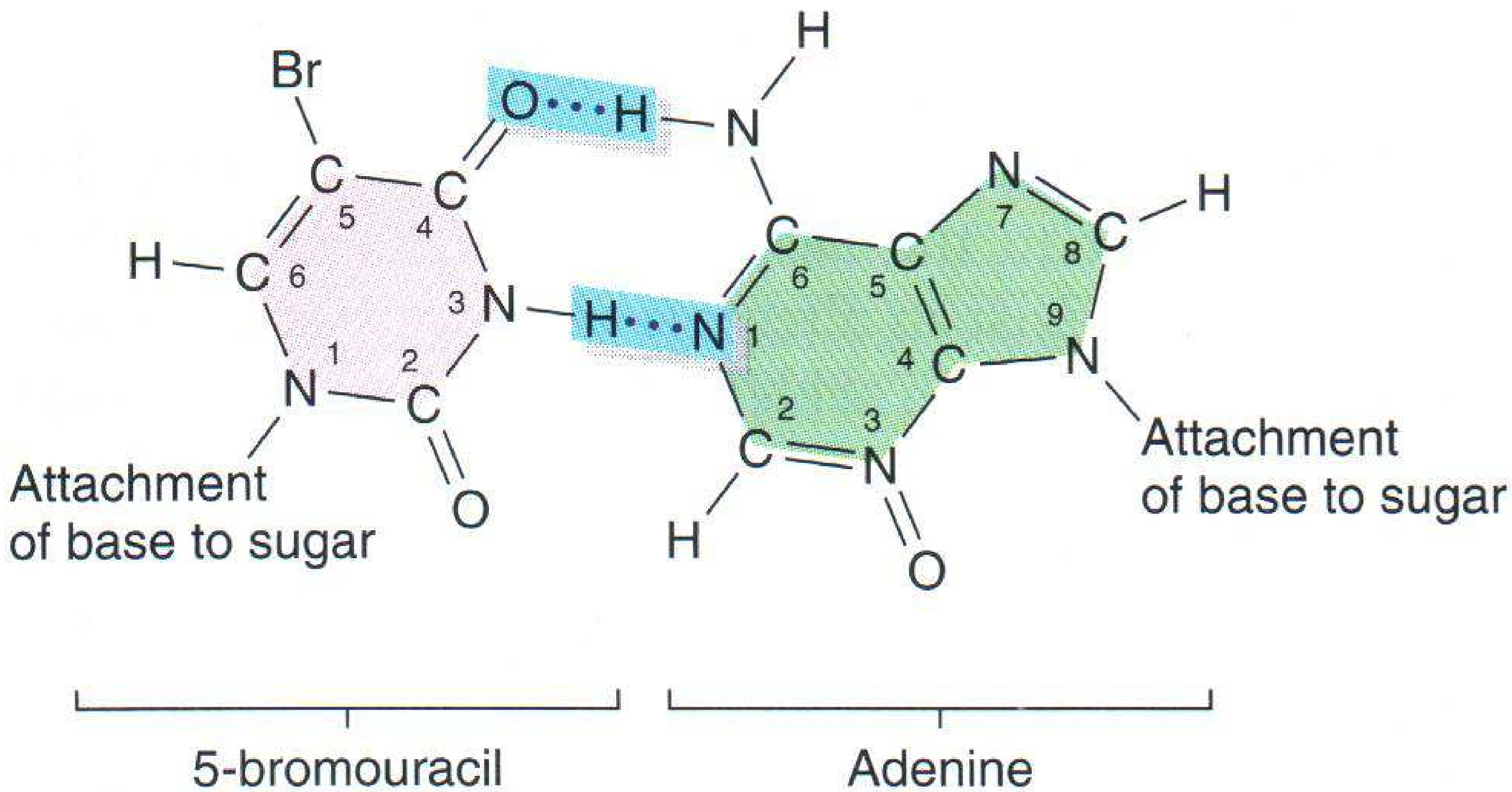
Conclusione: La replicazione del DNA in *E.coli* è semiconservativa.

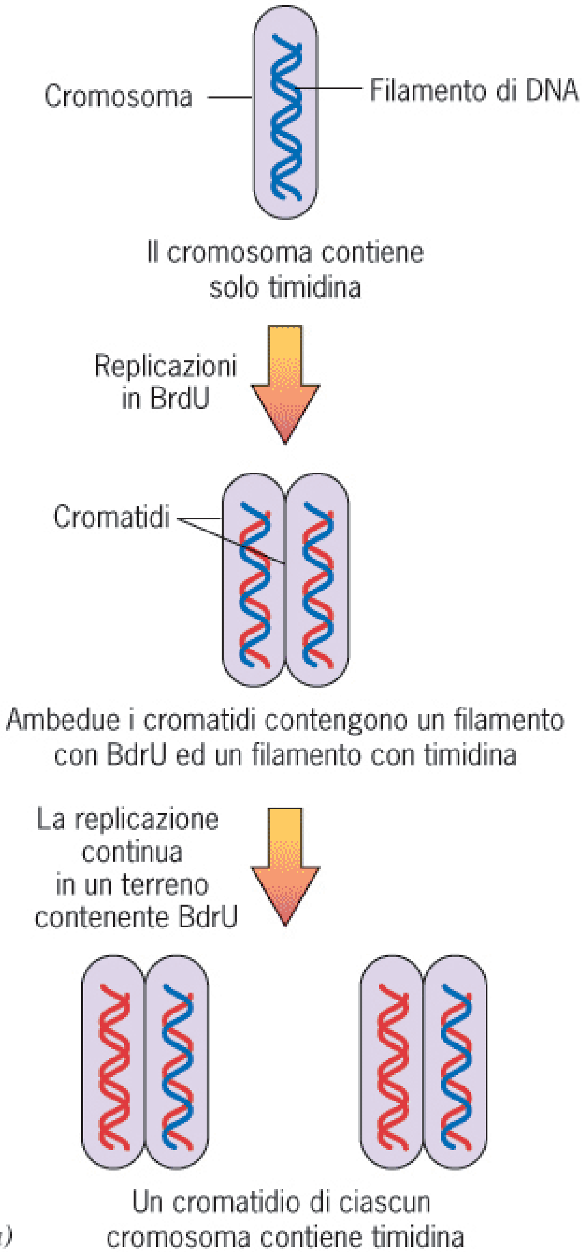


Parentale
Trasferimento ^{14}N
Generazioni
DNA leggero ^{14}N
DNA ibrido $^{14}N^{15}N$
DNA pesante ^{15}N
(a)
(b)
(c)
I
II
III
Leggera
Ibrida
Pesante
Semiconservativa
Conservativa
Dispersiva

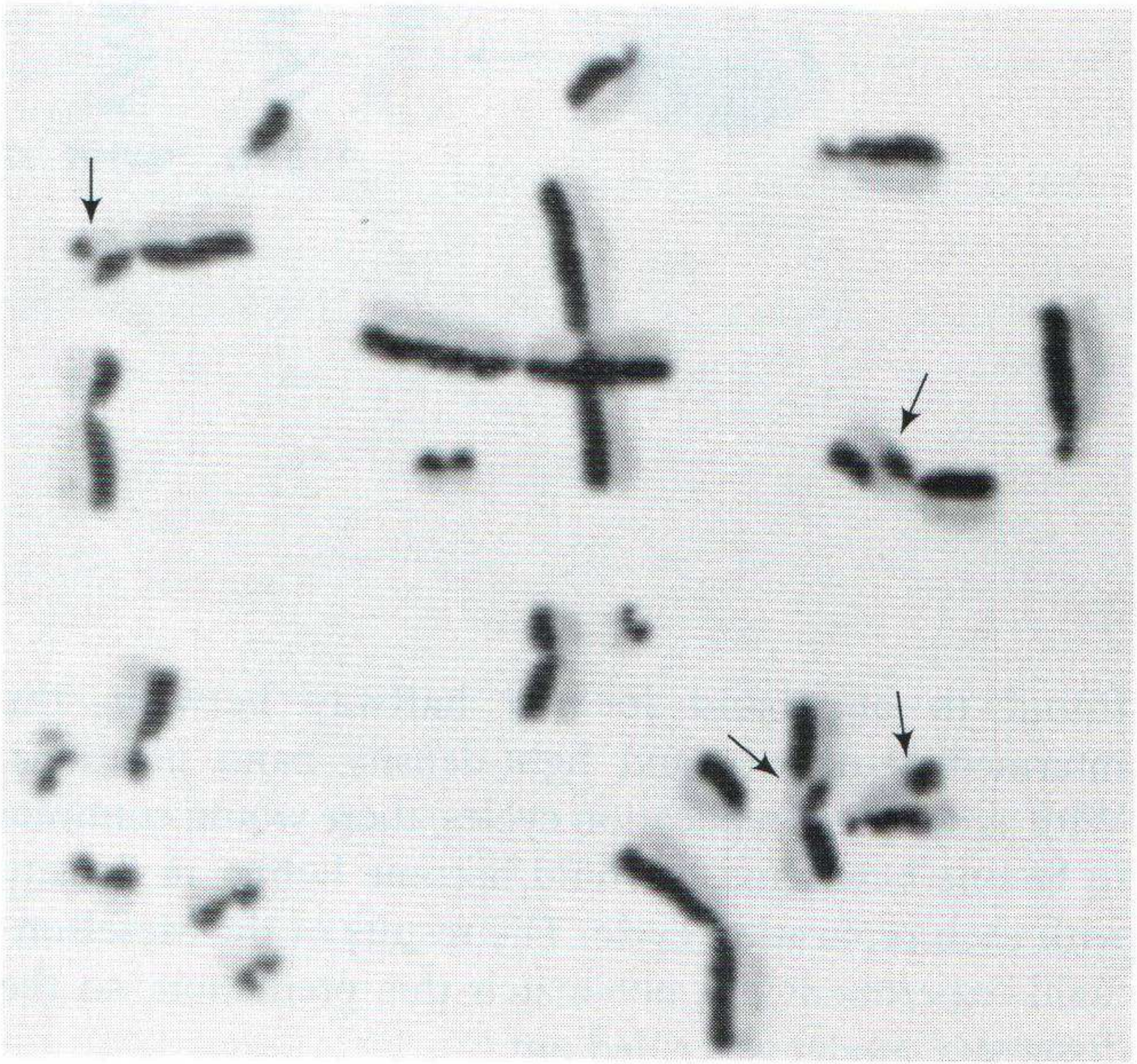

Metacentrico
Submetacentrico
Acrocentrico
Telocentrico

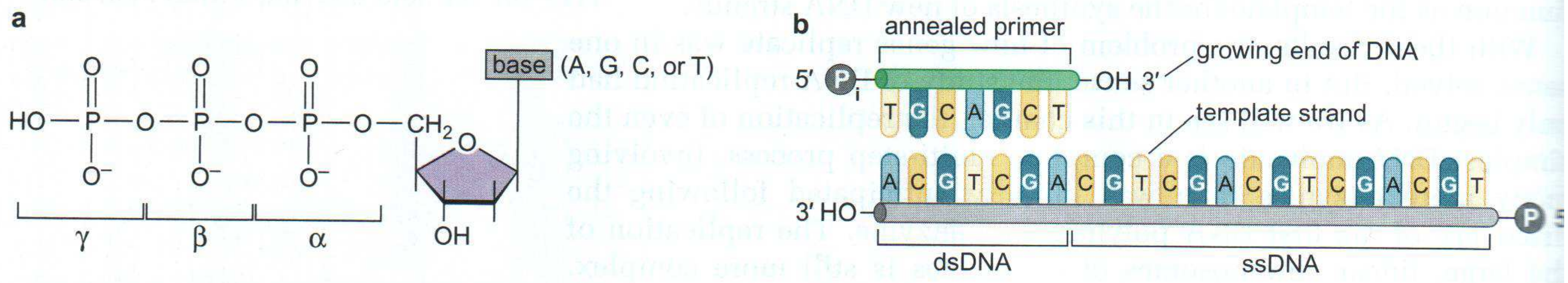

In alcuni momenti un cromosoma è costituito da un singolo cromatide…
…in altri è formato da due cromatidi (fratelli).
I telomeri rappresentano le estremità stabili dei cromosomi.
Telomero
Centromero
Due cromatidi (fratelli)
Telomero
Un cromosoma
Un cromosoma
Cinetocoro
Microtubuli del fuso
Il centromero è una regione contratta del cromosoma in cui si forma il cinetocoro e a cui si attaccano i microtubuli del fuso.

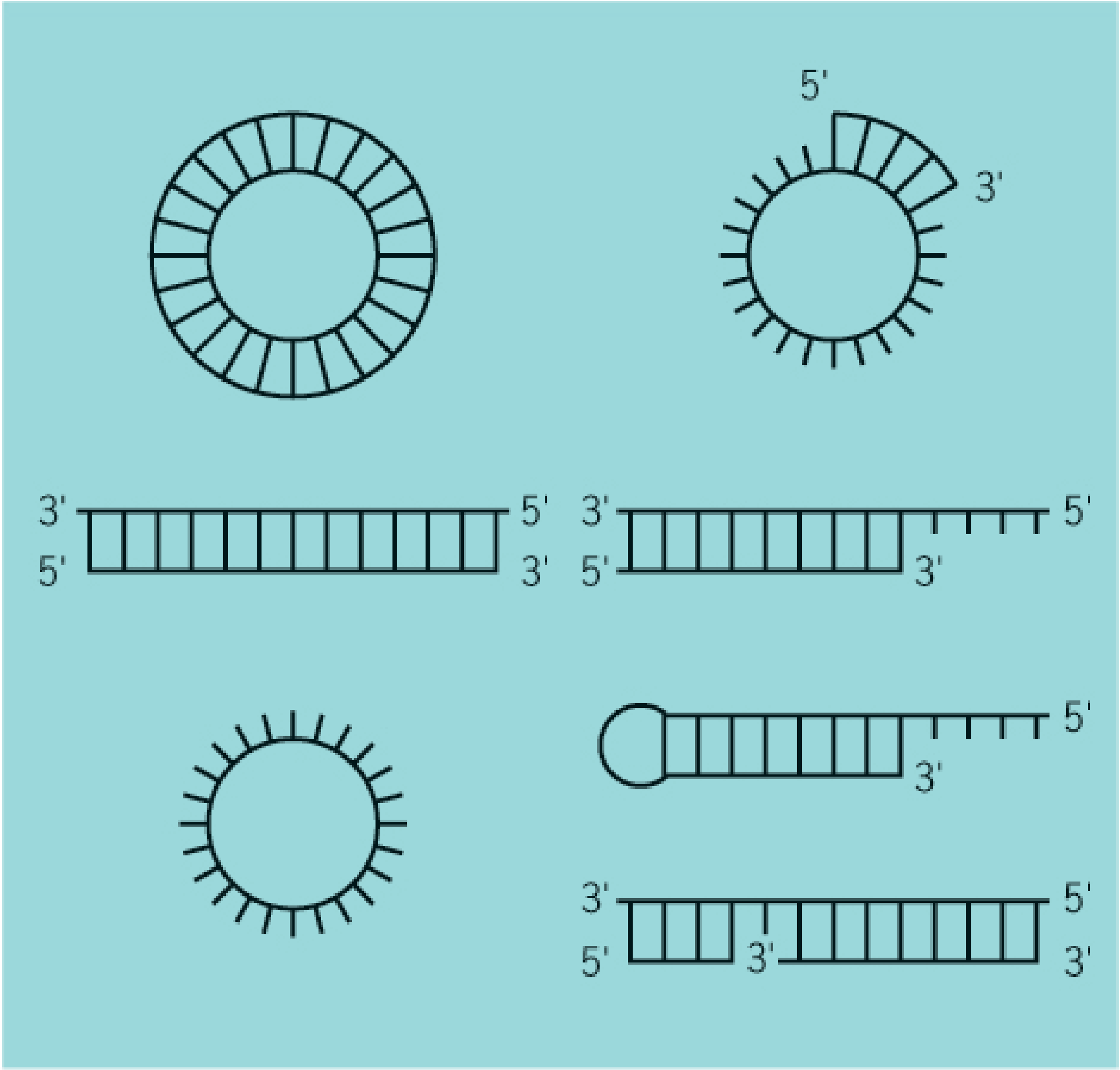

Br
O
H
N
H
C
C
5
4
H
C
6
3
N
H
N
1
1
2
N
C
Attachment
of base to sugar
O
C
C
6
5
N
7
8
C
H
9
4
C
N
2
3
C
N
H
O
Attachment
of base to sugar
5-bromouracil
Adenine


Cromosoma
Filamento di DNA
Il cromosoma contiene solo timidina
Replicazioni in BrdU
Cromatidi
Ambedue i cromatidi contengono un filamento con BdrU ed un filamento con timidina
La replicazione continua in un terreno contenente BdrU
Un cromatidio di ciascun cromosoma contiene timidina

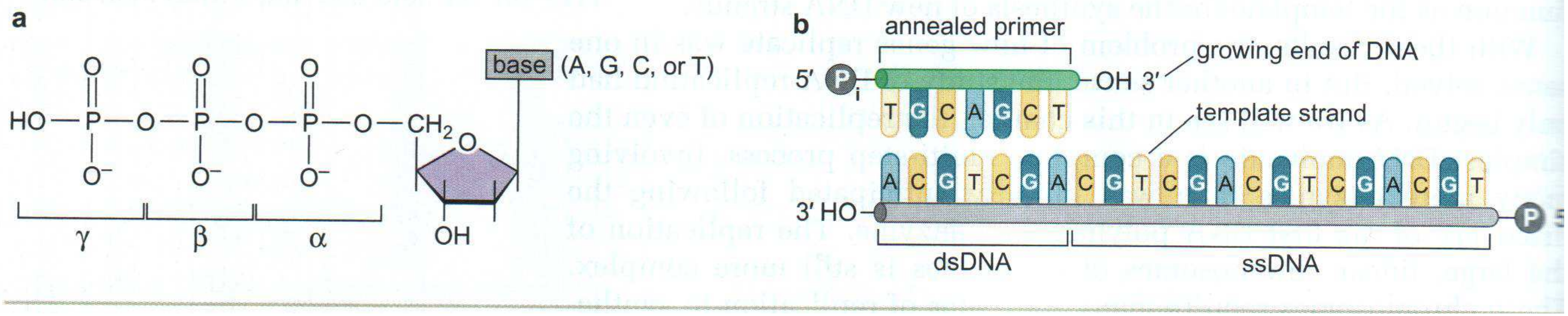
(a)

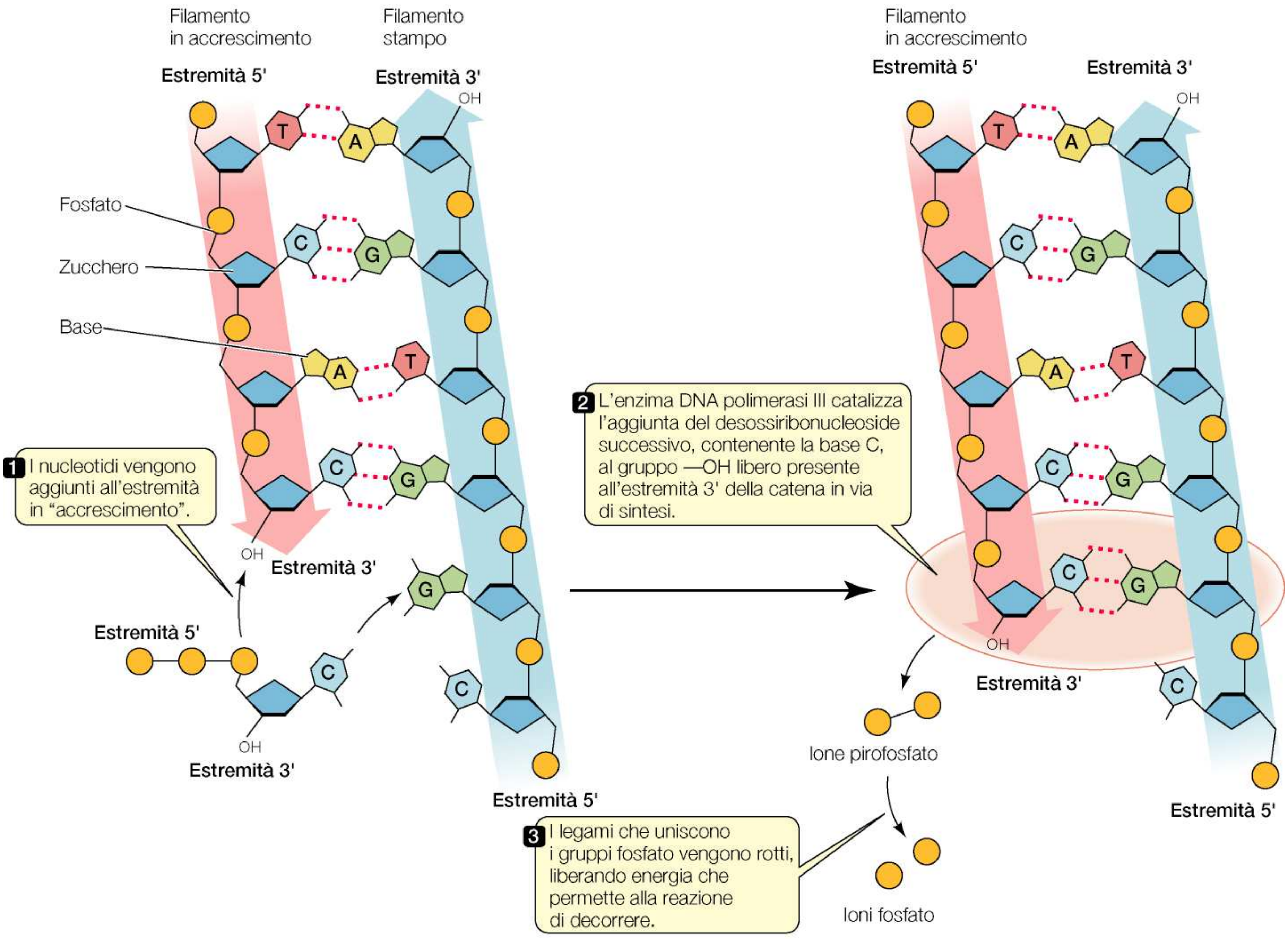



a
base (A, G, C, or T)
HO—P—O—P—O—P—O—CH2
O
O⁻
OH
γ
β
α
b
annealed primer
growing end of DNA
5′ Pi
OH 3′
T G C A G C T
template strand
A C G T C G A C G T C G A C G T C G A C G T
3′ HO
P
dsDNA
ssDNA



(a) (b)


a
base
(A, G, C, or T)
HO
O
P
O⁻
CH2
OH
γ
β
α
b
annealed primer
growing end of DNA
5′
Pi
OH 3′
T G C A G C T
template strand
A C G T C G A C G T C G A C G T C G A C G T
3′ HO
P
dsDNA
ssDNA



Filamento in accrescimento
Filamento stampo
Estremità 5'
Estremità 3'
OH
Fosfato
Zucchero
Base
T
A
C
G
1 I nucleotidi vengono aggiunti all'estremità in "accrescimento".
OH
Estremità 3'
Estremità 5'
OH
Estremità 3'
Estremità 5'
2 L'enzima DNA polimerasi III catalizza l'aggiunta del desossiribonucleoside successivo, contenente la base C, al gruppo —OH libero presente all'estremità 3' della catena in via di sintesi.
Filamento in accrescimento
Estremità 5'
Estremità 3'
OH
OH
Estremità 3'
Estremità 5'
Ione pirofosfato
3 I legami che uniscono i gruppi fosfato vengono rotti, liberando energia che permette alla reazione di decorrere.
Ioni fosfato

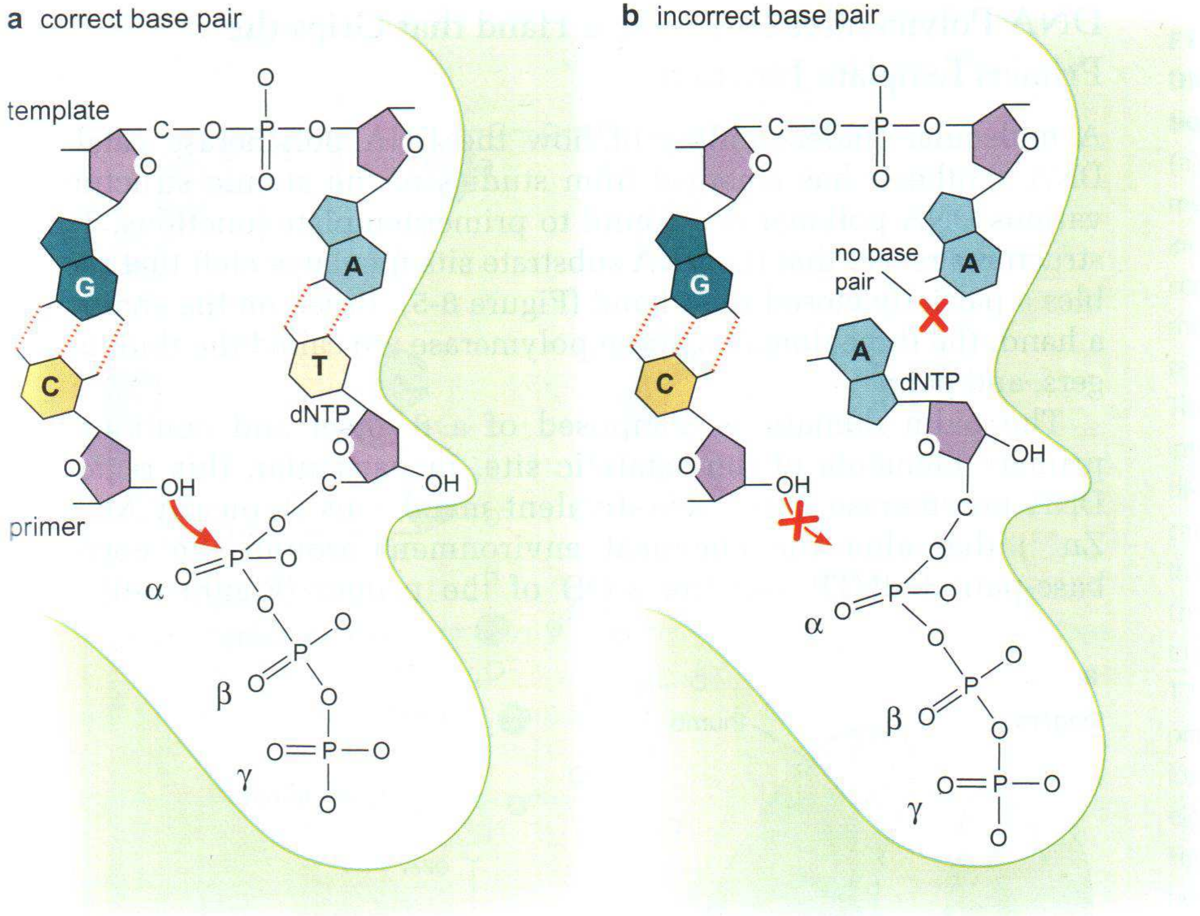


FIGURE 8-3 Correctly paired bases are required for DNA polymerase catalyzed nucleotide addition. (a) Schematic diagram of the attack of a primer 3′OH end on a correctly base-paired dNTP. (b) Schematic diagram of the consequence of incorrect base-pairing on catalysis by DNA polymerase. In the example shown, the incorrect A:A base pair displaces the α-phosphate of the incoming nucleotide. This incorrect alignment reduces the rate of catalysis dramatically resulting in the DNA polymerase preferentially adding correctly base-paired dNTPs. (Source: Based on Brautigan C.A. and Steitz T.A. 1998. Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerase. *Curr. Opin. Structural Biology* 8: 60, fig 4, part d. Copyright © 1998 with permission from Elsevier.)

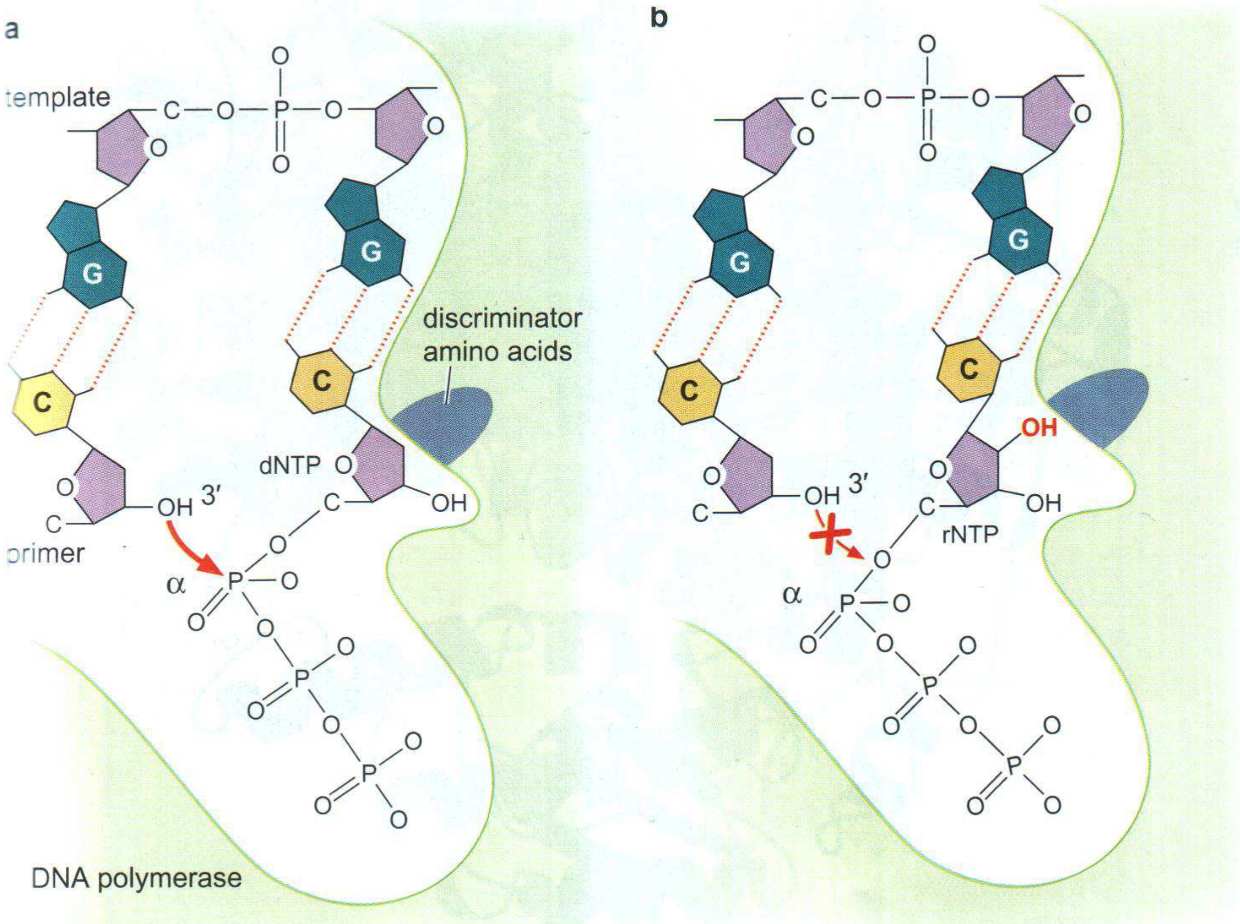
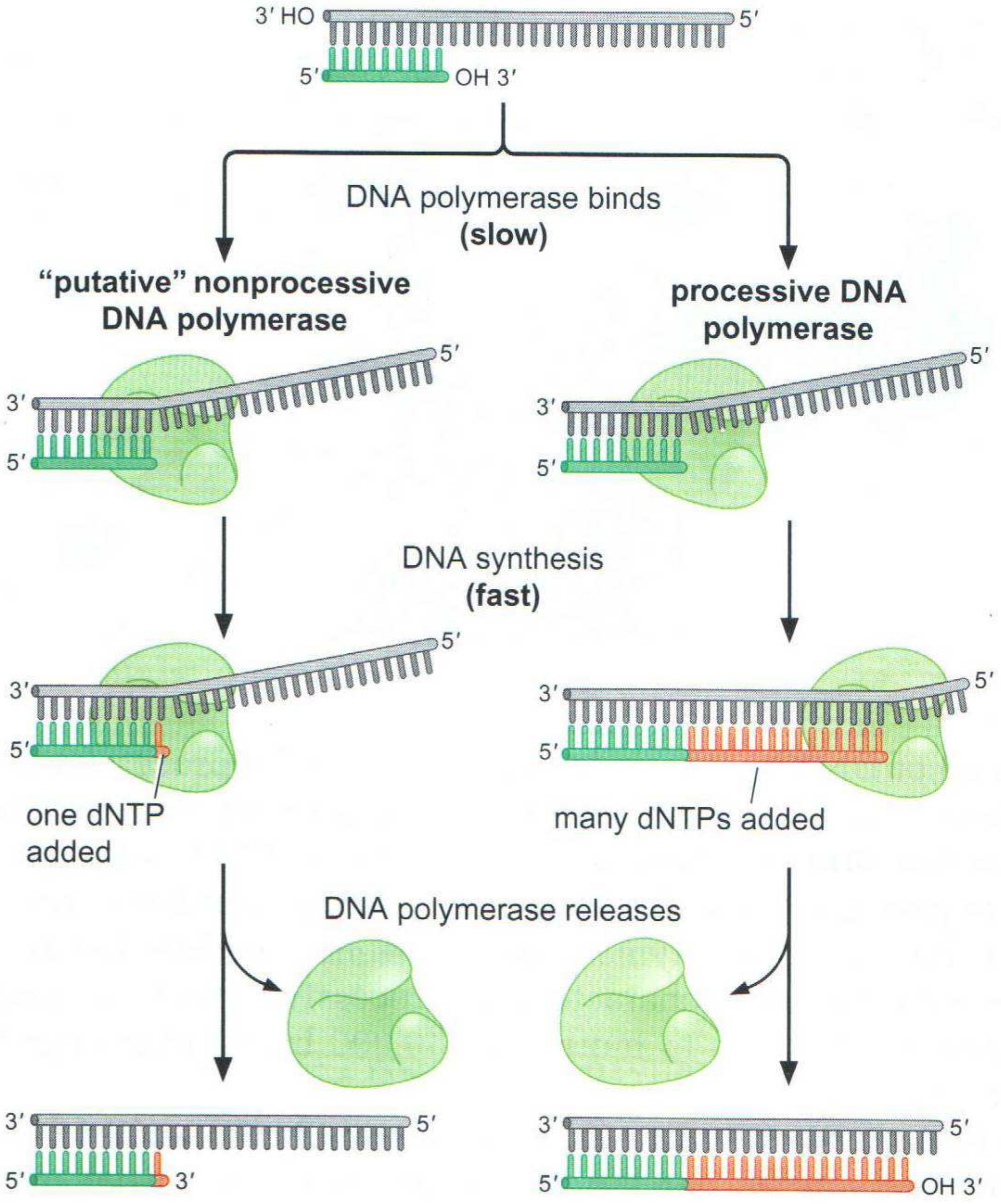


FIGURE 8-4 Schematic illustration of the steric constraints preventing catalysis using rNTPs by DNA polymerase. (a) Binding of a correctly base-paired dNTP to the DNA polymerase. Under these conditions, the 3′OH of the primer and the α-phosphate of the dNTP are in close proximity. (b) Addition of a 2′OH results in a steric clash with amino acids (the discriminator amino acids) in the nucleotide binding pocket. This results in the α-phosphate of the dNTP being displaced and a misalignment with the 3′OH of the primer, dramatically reducing the rate of catalysis.

Processività: caratteristica degli enzimi che operano su substrati polimerici.

Nel caso della DNA-polimerasi è definita dal numero (medio) di desossi-nucleotidi che l'enzima aggiunge ogni volta che si lega alla struttura primer-stampo.


3′ HO
5′
5′
OH 3′
DNA polymerase binds
(slow)
"putative" nonprocessive
DNA polymerase
processive DNA
polymerase
3′
5′
5′
3′
5′
5′
DNA synthesis
(fast)
3′
5′
5′
one dNTP
added
3′
5′
5′
many dNTPs added
DNA polymerase releases
3′
5′
5′
3′
3′
5′
5′
OH 3′

Ogni DNA-polimerasi ha una propria caratteristica processività, che varia da pochi nucleotidi a oltre 50.000 nucleotidi aggiunti per evento di legame.

La tappa limitante è data dal legame iniziale (circa 1 secondo).

Gene Product and or Function
DNA polymerase I
DNA polymerase II
DNA polymerase III
Initiator protein; binds to *oriC*
IHF protein (DNA-binding protein); binds to *oriC*
FIS protein (DNA-binding protein); binds to *oriC*
Helicase and activator of primase
Complexes with *dnaB* protein and delivers it to DNA
Primase; makes RNA primer for extension by DNA polymerase III
Single-strand binding (SSB) proteins; bind to unwound single-stranded arms of replication forks
DNA ligase; seals single-stranded gaps
Gyrase (type II topoisomerase); replication swivel to avoid tangling of DNA as replication fork advances
Origin of chromosomal replication
Terminus of chromosomal replication
TBP (*ter* binding protein); stalls replication forks

E. coli has 5 DNA polymerases

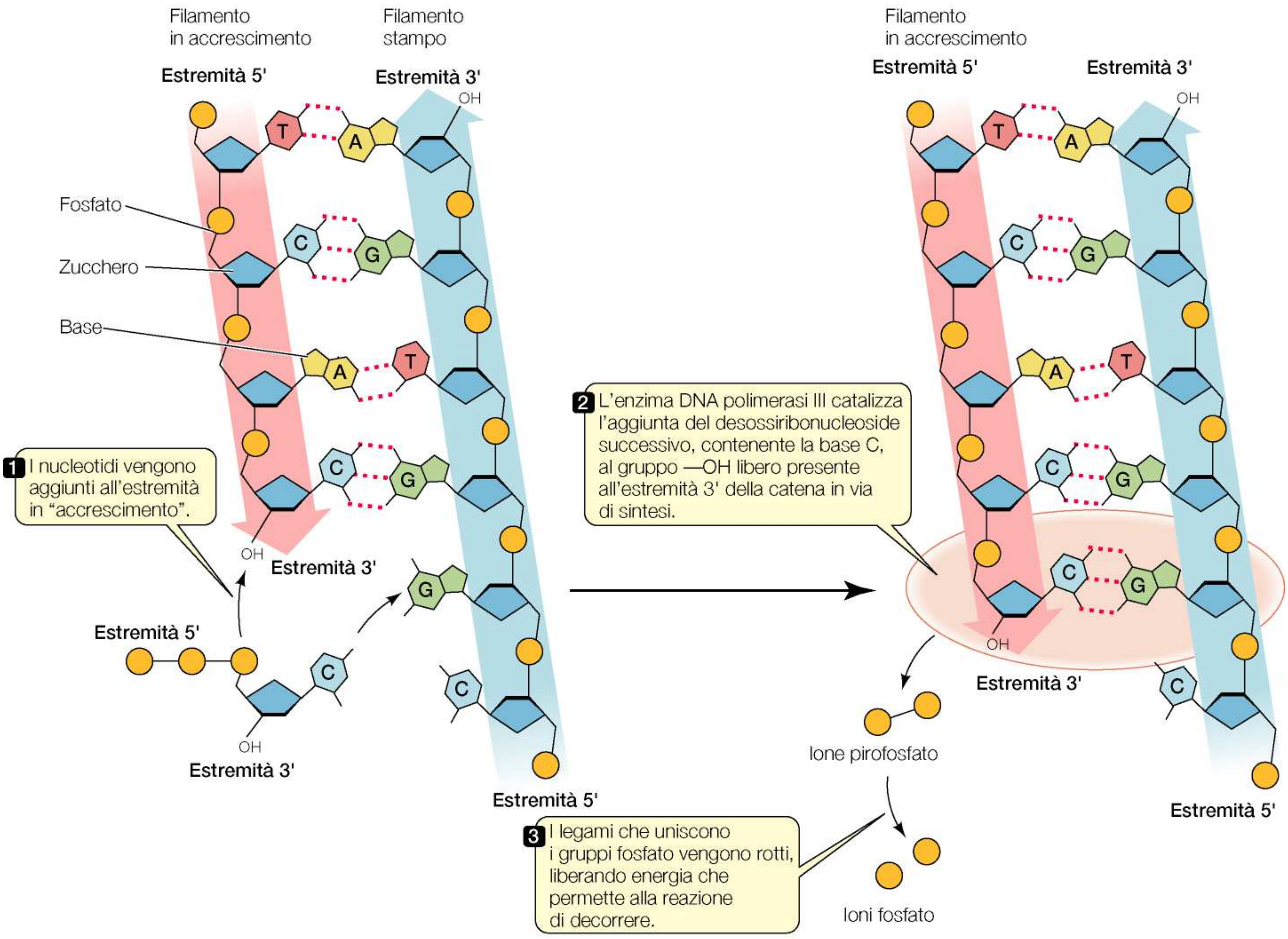
Enzyme	Gene	Function
I	*polA*	major repair enzyme
II	*polB*	minor repair enzyme
III	*polC*	replicase
IV	*dinB*	SOS repair
V	*umuD'$_2$C*	SOS repair

Figure 14.4 Only one DNA polymerase is the replicase. The others participate in repair of damaged DNA.

Table 9.1 Comparison of the Structural and Functional Characteristics of the *E. coli* DNA Polymerases I, II, and III

DNA Polymerase	Polymerization: 5'→3'	Exonuclease: 3'→5'	Exonuclease: 5'→3'	Molecular Weight (daltons)	Molecules per Cell (approximately)	Structural Genes
I	Yes	Yes	Yes	103,000	400	*polA*
II	Yes	Yes	No	90,000	?	*polB*
III	Yes	Yes	No	Core of 130,000, 27,500, and 10,000 subunits; 7 other subunits[a]	10–20	*dnaE*, *dnaQ*, and *holE* for core

[a]Polymerase III consists of a catalytic core of α (alpha: 130,000 Da; *dnaE*), ε (epsilon: 27,500 Da; *dnaQ*; responsible for 3'→5' exonuclease activity), and θ (theta: 10,000 Da; *holE*), and 7 other subunits: τ (tau: 71,000 Da; *dnaX*), γ (gamma: 47,500 Da; *dnaX*), δ (delta: 35,000 Da; *holA*), δ' (delta prime: 33,000 Da; *holB*), χ (chi: 15,000 Da; *holC*), ψ (psi: 12,000 Da; *holD*), and β (beta: 40,600 Da; *dnaN*).



Filamento in accrescimento
Filamento stampo
Estremità 5'
Estremità 3'
OH
T
A
Fosfato
Zucchero
Base
C
G
1 I nucleotidi vengono aggiunti all'estremità in "accrescimento".
OH
Estremità 3'
Estremità 5'
OH
Estremità 3'
Estremità 5'
Filamento in accrescimento
Estremità 5'
Estremità 3'
2 L'enzima DNA polimerasi III catalizza l'aggiunta del desossiribonucleoside successivo, contenente la base C, al gruppo —OH libero presente all'estremità 3' della catena in via di sintesi.
OH
Estremità 3'
Ione pirofosfato
Estremità 5'
3 I legami che uniscono i gruppi fosfato vengono rotti, liberando energia che permette alla reazione di decorrere.
Ioni fosfato

Table 9.1 Comparison of the Structural and Functional Characteristics of the *E. coli* DNA Polymerases I, II, and III

DNA Polymerase	Polymerization: 5'→3'	Exonuclease: 3'→5'	Exonuclease: 5'→3'	Molecular Weight (daltons)	Molecules per Cell (approximately)	Structural Genes
I	Yes	Yes	Yes	103,000	400	*polA*
II	Yes	Yes	No	90,000	?	*polB*
III	Yes	Yes	No	Core of 130,000, 27,500, and 10,000 subunits; 7 other subunits[a]	10–20	*dnaE*, *dnaQ*, and *holE* for core

[a]Polymerase III consists of a catalytic core of α (alpha: 130,000 Da; *dnaE*), ε (epsilon: 27,500 Da; *dnaQ*; responsible for 3'→5' exonuclease activity), and θ (theta: 10,000 Da; *holE*), and 7 other subunits: τ (tau: 71,000 Da; *dnaX*), γ (gamma: 47,500 Da; *dnaX*), δ (delta: 35,000 Da; *holA*), δ' (delta prime: 33,000 Da; *holB*), χ (chi: 15,000 Da; *holC*), ψ (psi: 12,000 Da; *holD*), and β (beta: 40,600 Da; *dnaN*).

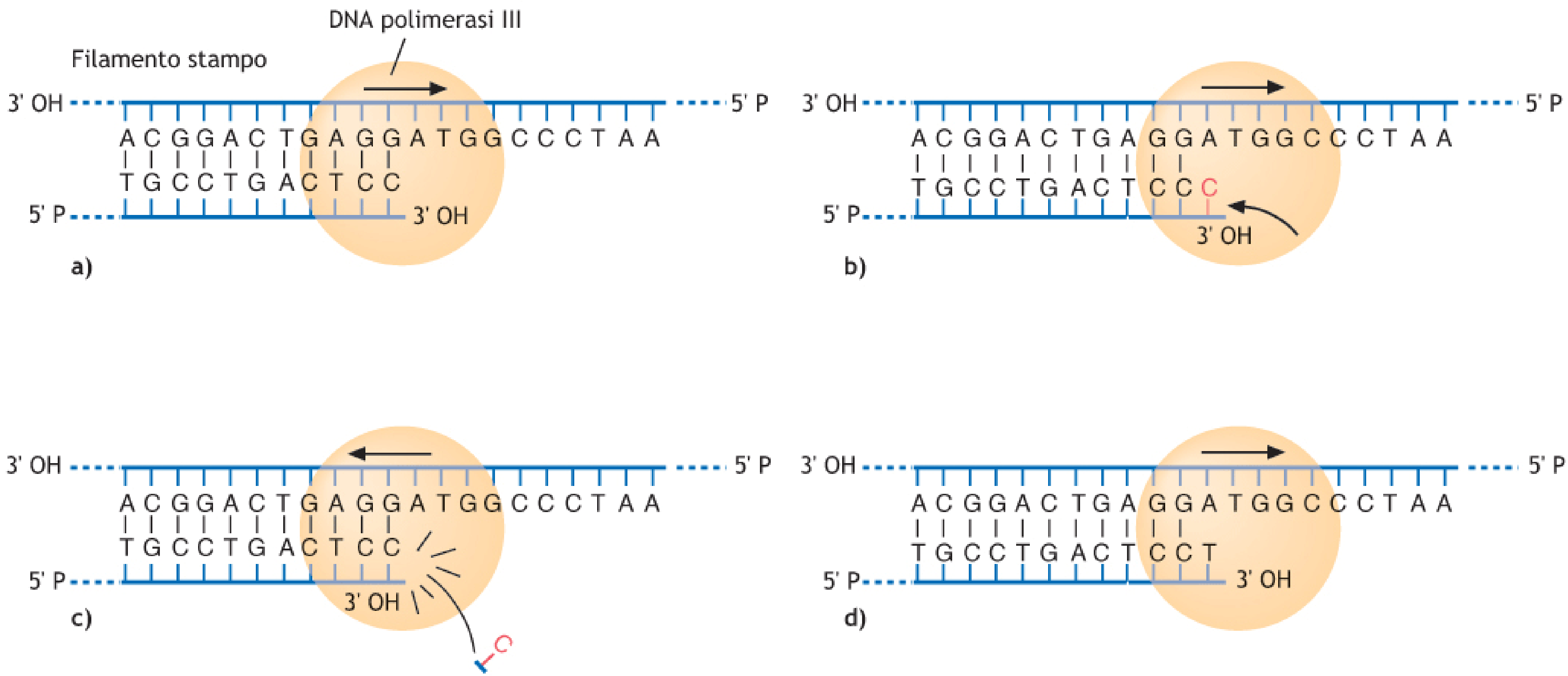
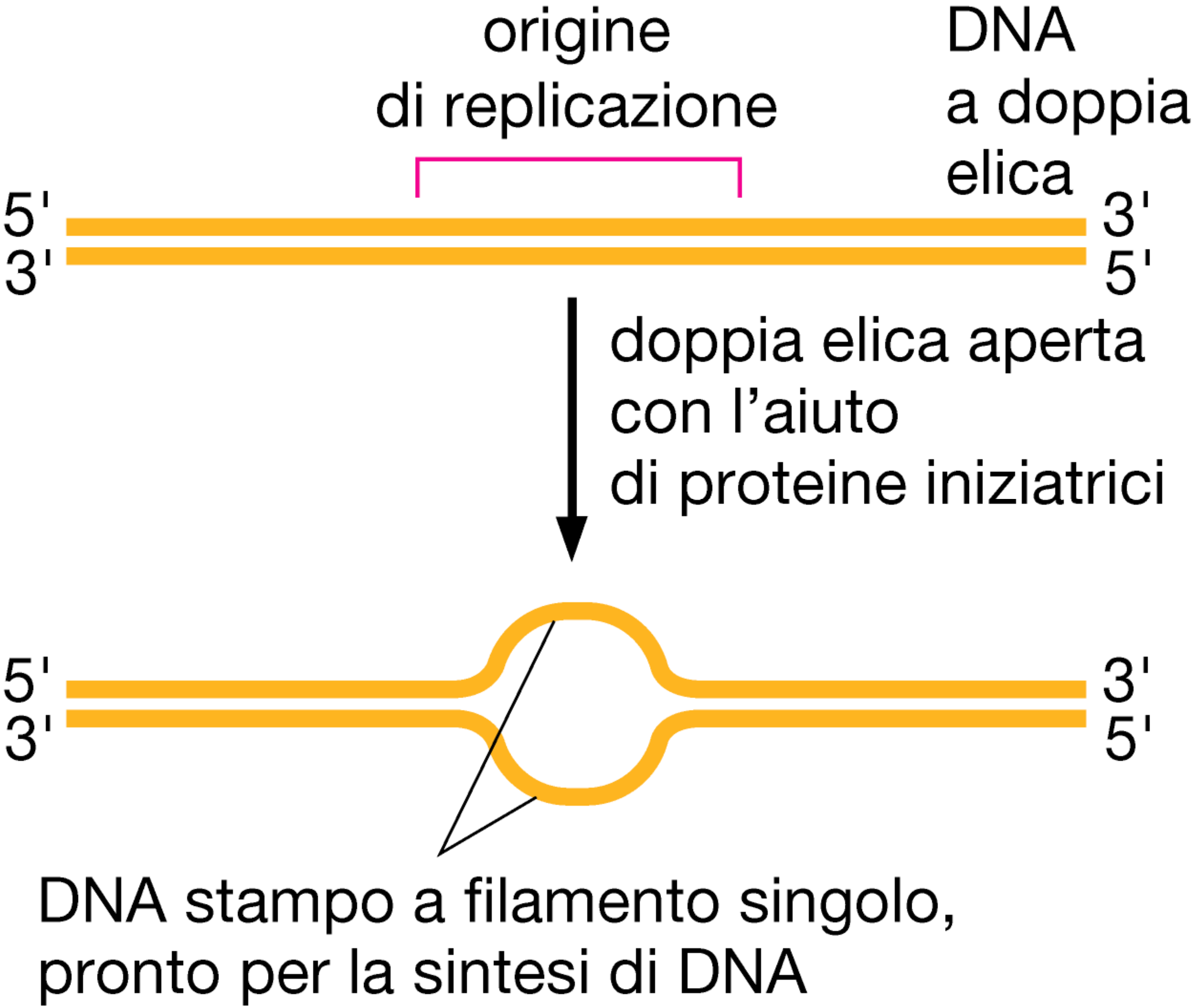
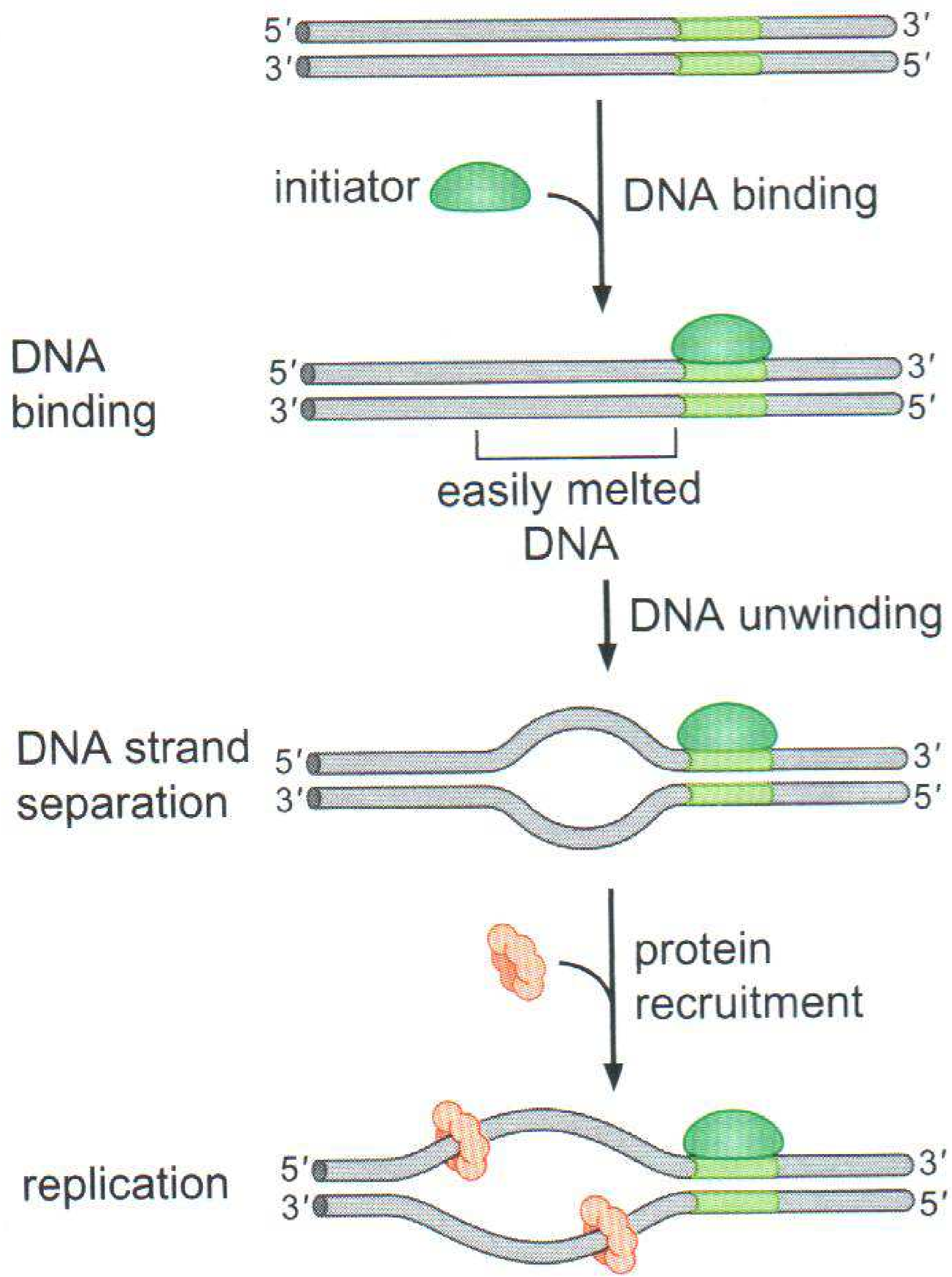
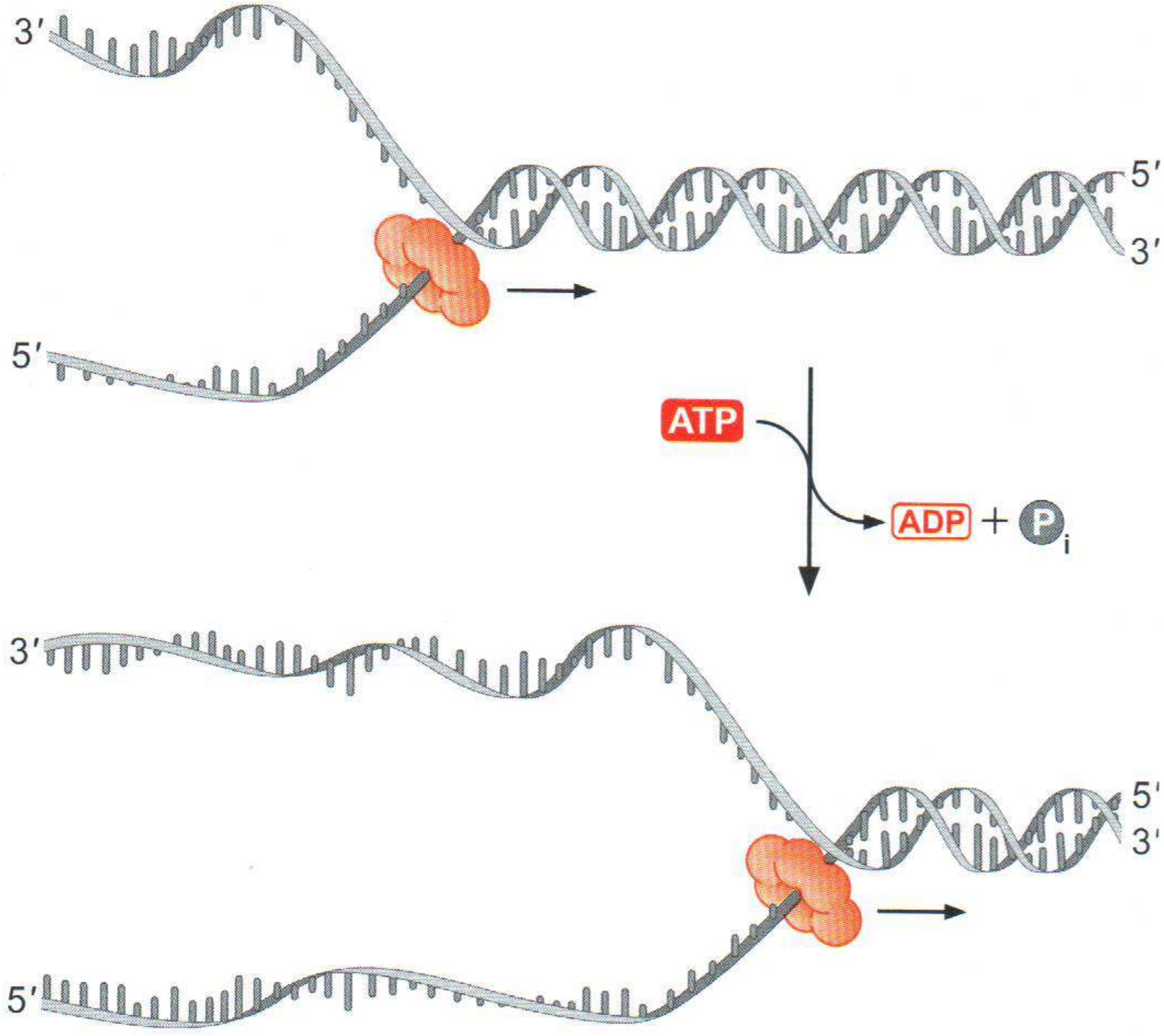


FIGURA 4.13 **a)** L'enzima sintetizza dall'estremo 5′P all'estremo 3′OH. **b)** Viene aggiunto un nucleotide errato. **c)** L'enzima innesca l'attività esonucleasica 3′OH → 5′P. **d)** L'enzima riprende la sua attività polimerasica.

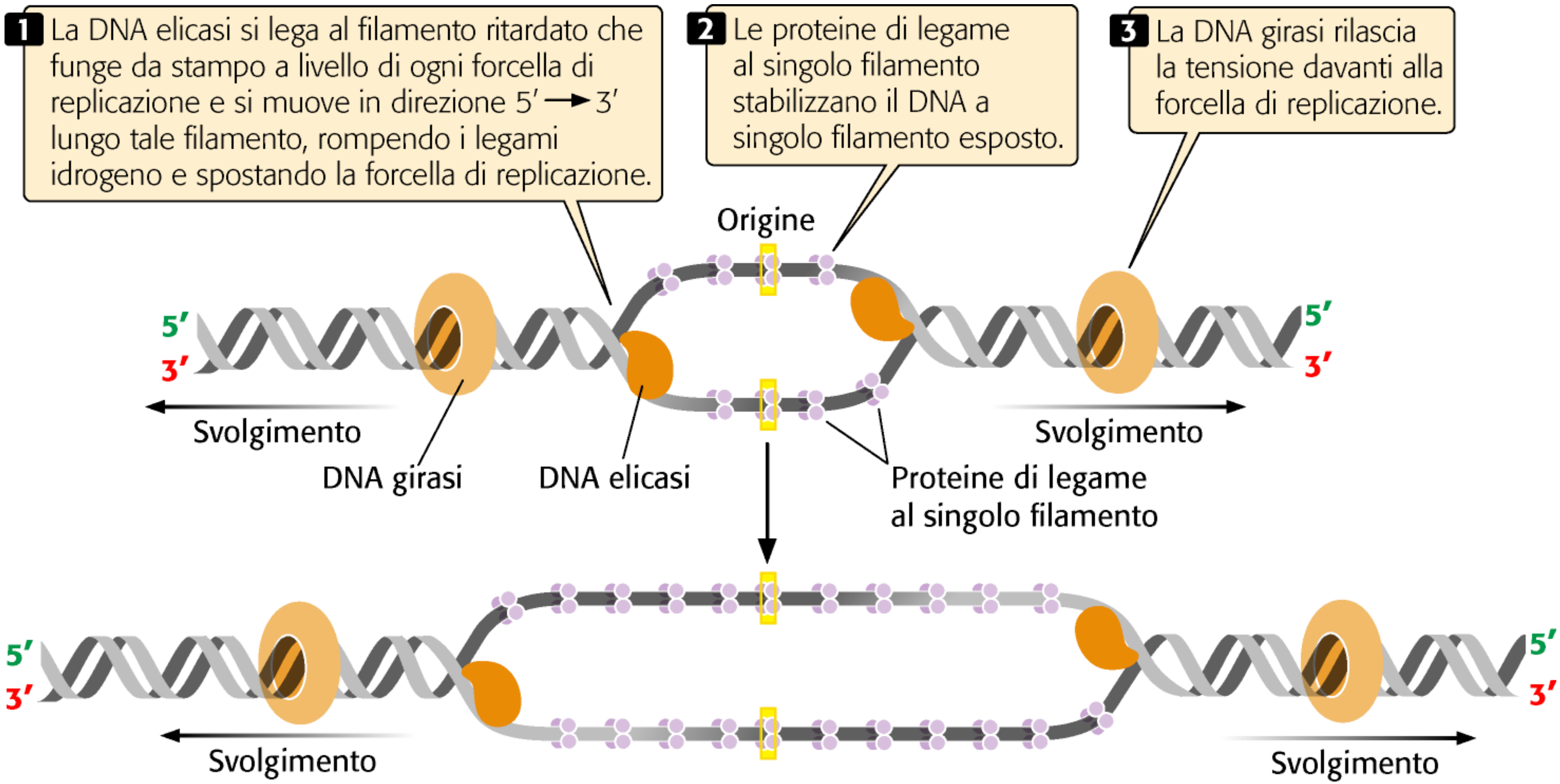
Fase di Inizio

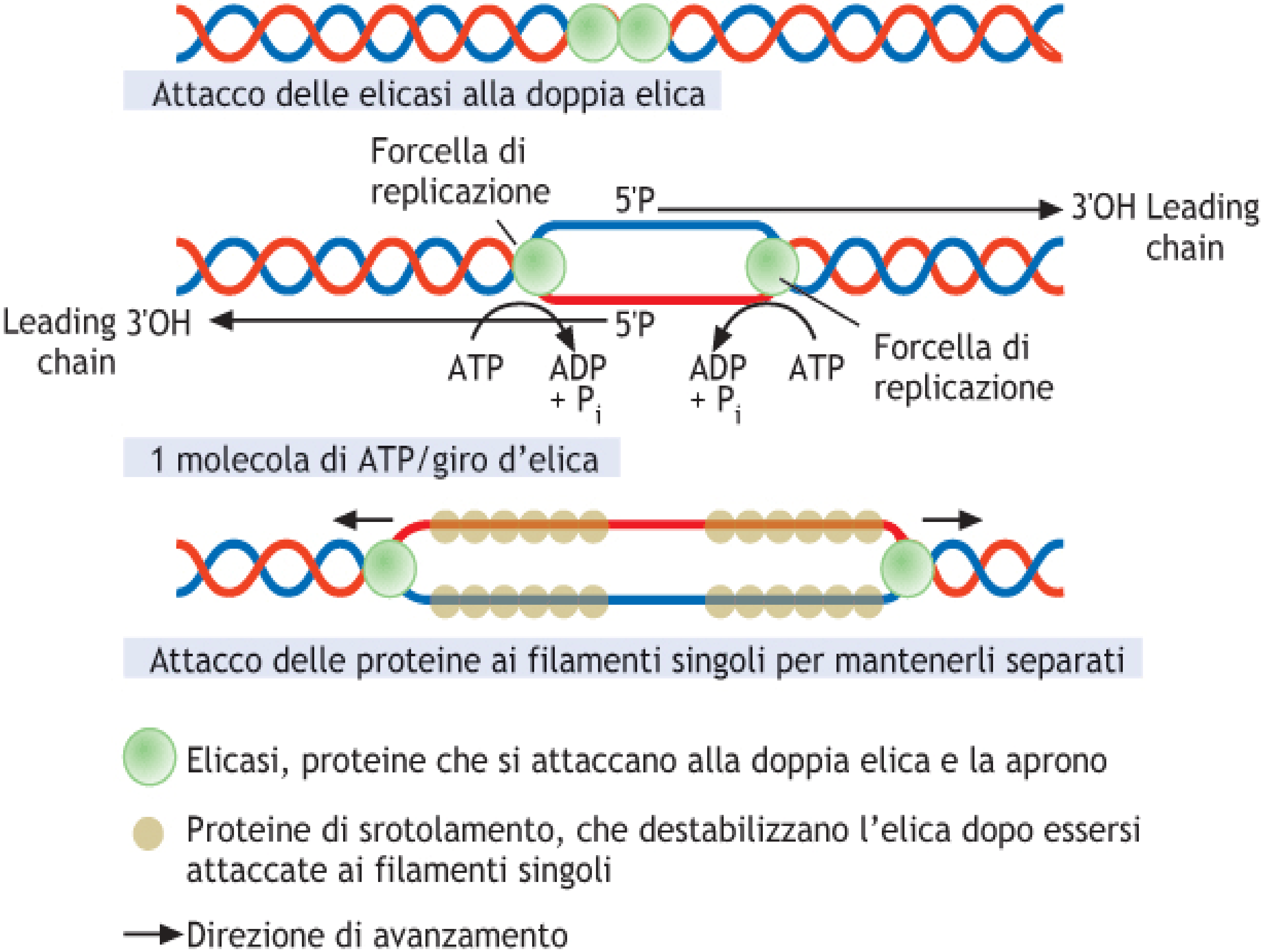

origine
di replicazione
DNA
a doppia
elica
5'
3'
3'
5'
doppia elica aperta
con l'aiuto
di proteine iniziatrici
5'
3'
3'
5'
DNA stampo a filamento singolo,
pronto per la sintesi di DNA


5′
3′
3′
5′
initiator
DNA binding
DNA
binding
5′
3′
3′
5′
easily melted
DNA
DNA unwinding
DNA strand
separation
5′
3′
3′
5′
protein
recruitment
replication
5′
3′
3′
5′

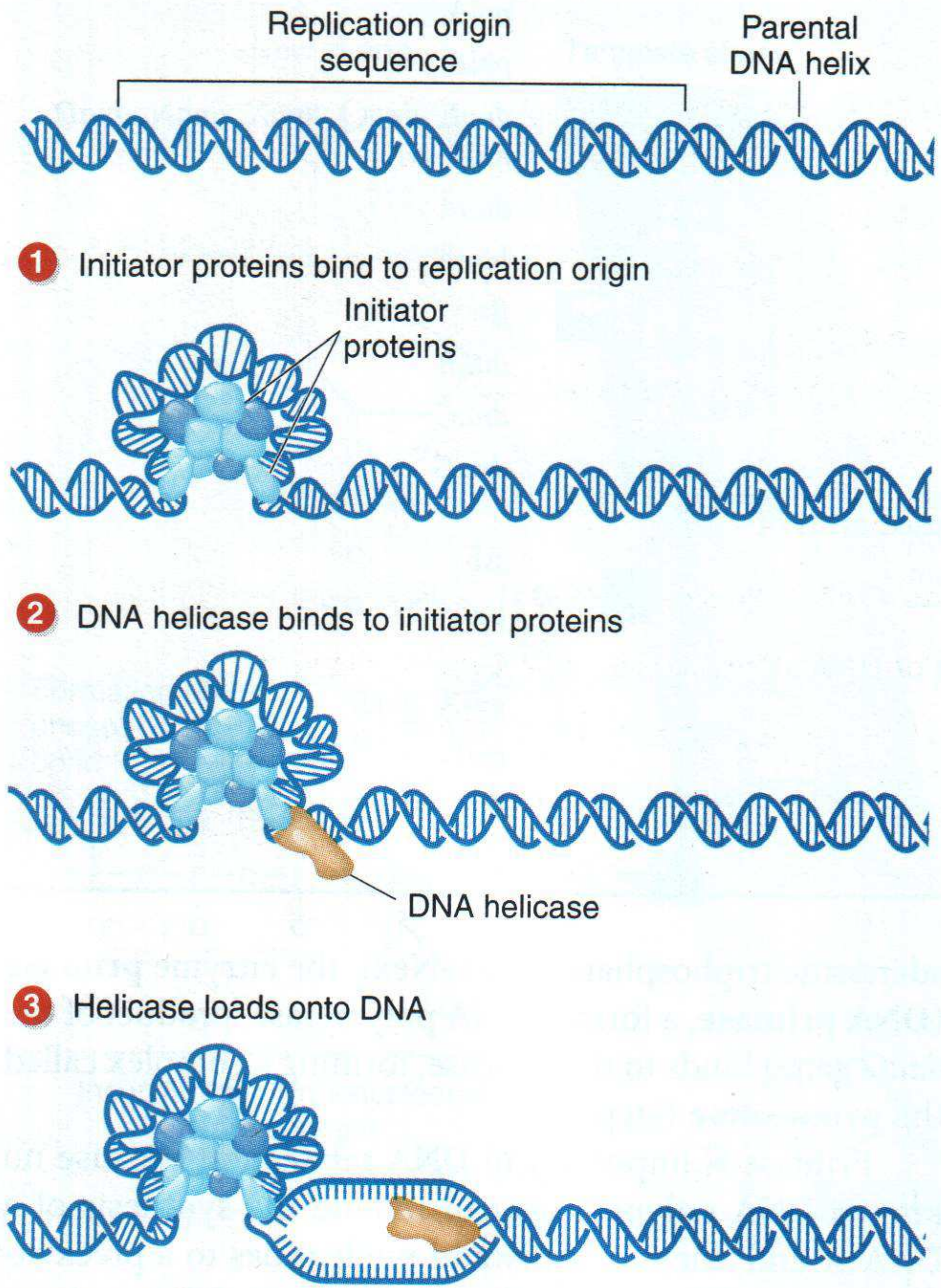


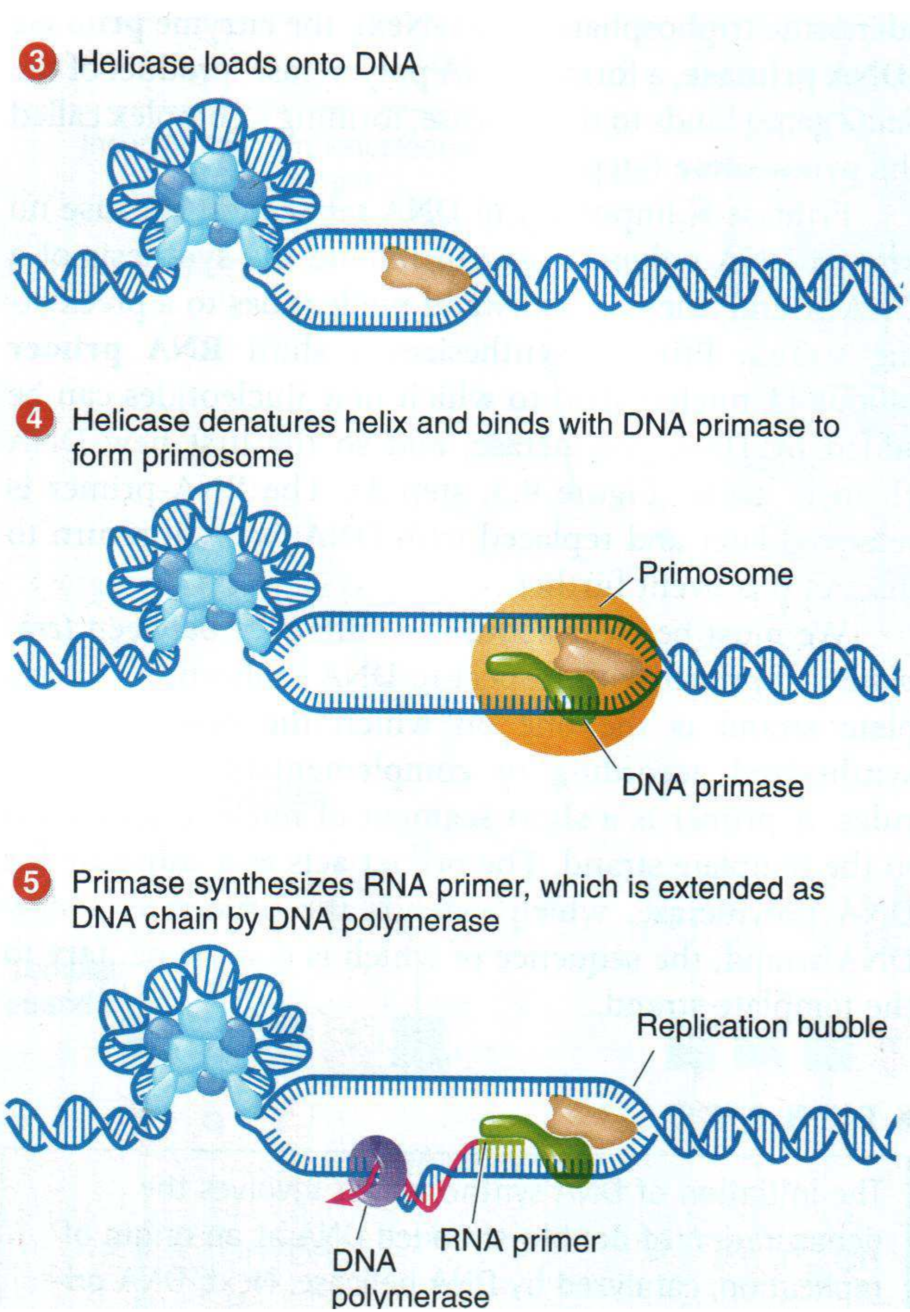
3′
5′
3′
5′
ATP
ADP + P i
3′
5′
3′
5′


1 La DNA elicasi si lega al filamento ritardato che funge da stampo a livello di ogni forcella di replicazione e si muove in direzione 5′ → 3′ lungo tale filamento, rompendo i legami idrogeno e spostando la forcella di replicazione.
2 Le proteine di legame al singolo filamento stabilizzano il DNA a singolo filamento esposto.
3 La DNA girasi rilascia la tensione davanti alla forcella di replicazione.
Origine
5′
3′
5′
3′
Svolgimento
Svolgimento
DNA girasi
DNA elicasi
Proteine di legame al singolo filamento
5′
3′
5′
3′
Svolgimento
Svolgimento



Attacco delle elicasi alla doppia elica
Forcella di replicazione
5'P
3'OH Leading chain
Leading 3'OH chain
5'P
ATP
ADP + P_i
ADP + P_i
ATP
Forcella di replicazione
1 molecola di ATP/giro d'elica
Attacco delle proteine ai filamenti singoli per mantenerli separati
Elicasi, proteine che si attaccano alla doppia elica e la aprono
Proteine di srotolamento, che destabilizzano l'elica dopo essersi attaccate ai filamenti singoli
Direzione di avanzamento

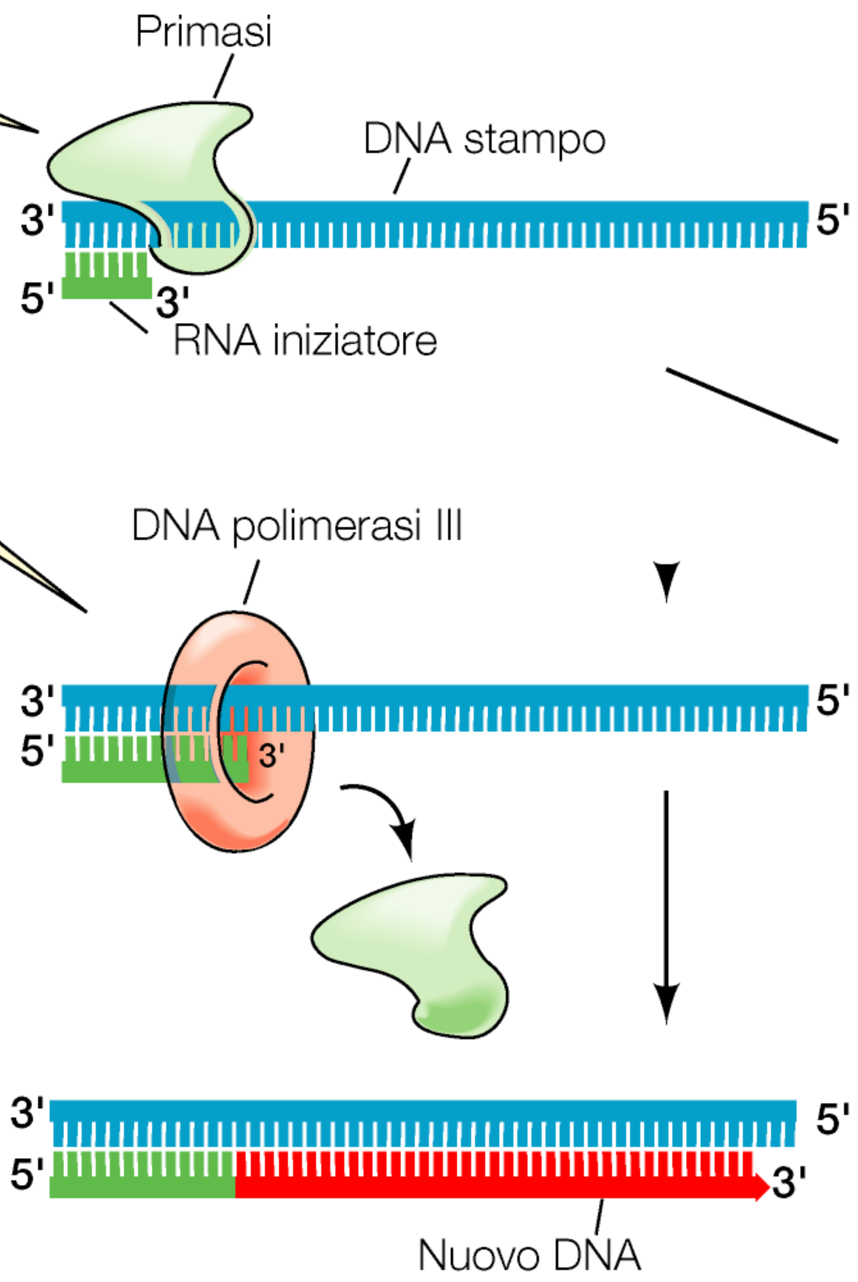

Replication origin sequence
Parental DNA helix
1 Initiator proteins bind to replication origin
Initiator proteins
2 DNA helicase binds to initiator proteins
DNA helicase
3 Helicase loads onto DNA



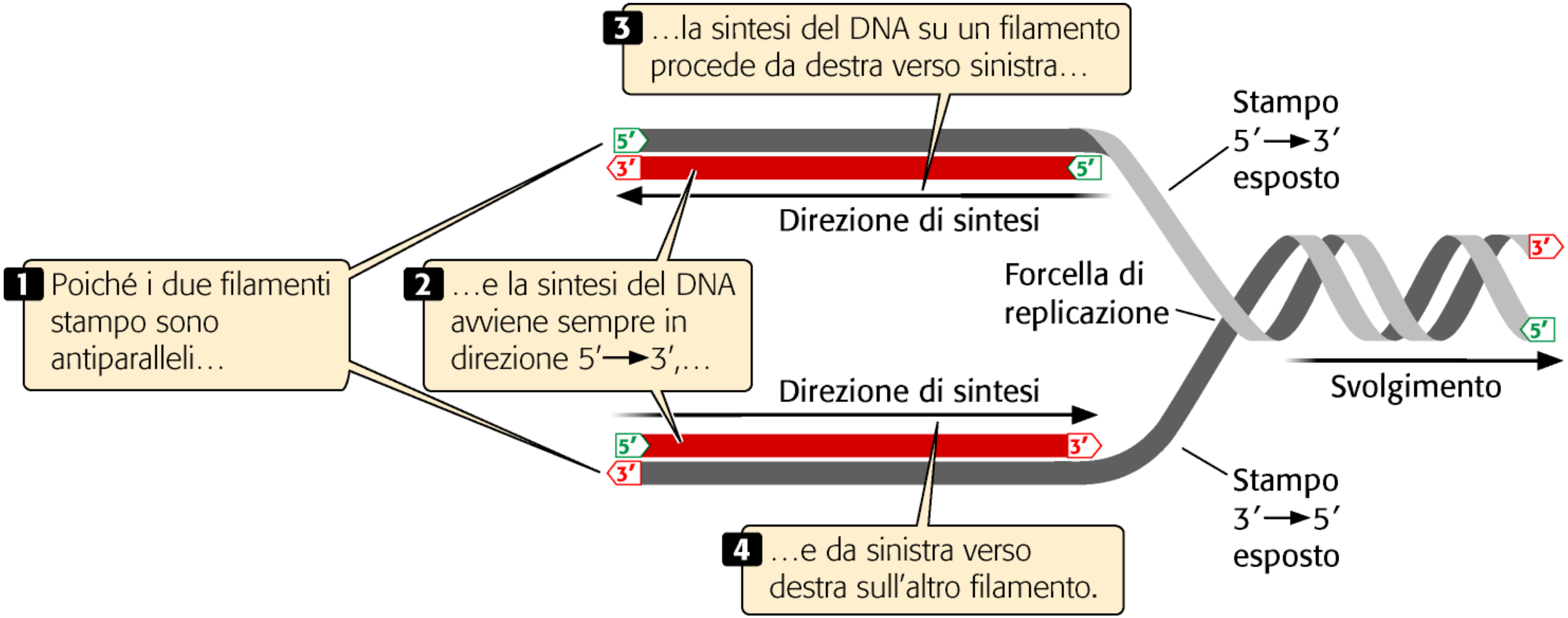
3 Helicase loads onto DNA
4 Helicase denatures helix and binds with DNA primase to form primosome
Primosome
DNA primase
5 Primase synthesizes RNA primer, which is extended as DNA chain by DNA polymerase
Replication bubble
RNA primer
DNA polymerase

1 La primasi si lega al filamento stampo e sintetizza un RNA iniziatore.

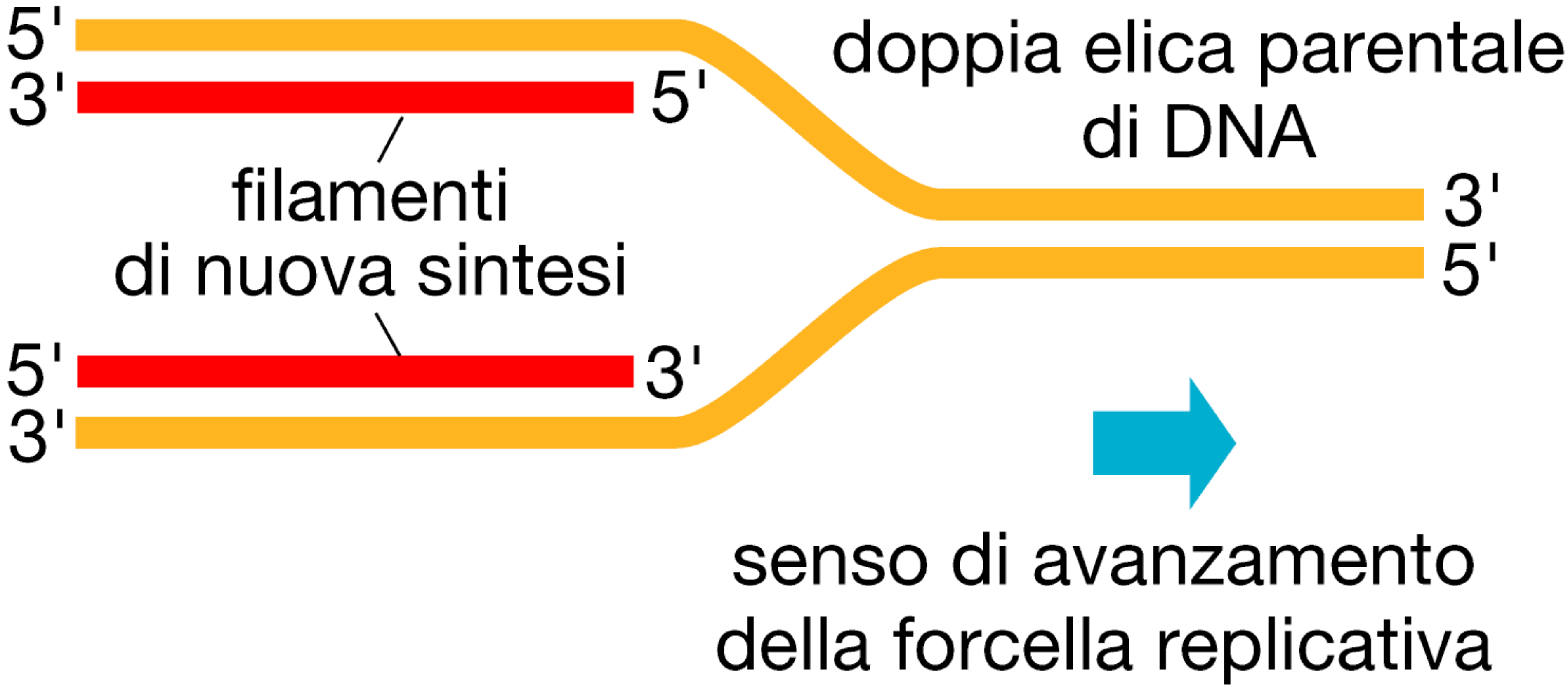
2 Quando l'iniziatore è stato completato, la primasi viene rilasciata. La DNA polimerasi si lega e inizia a catalizzare la sintesi di nuovo DNA.

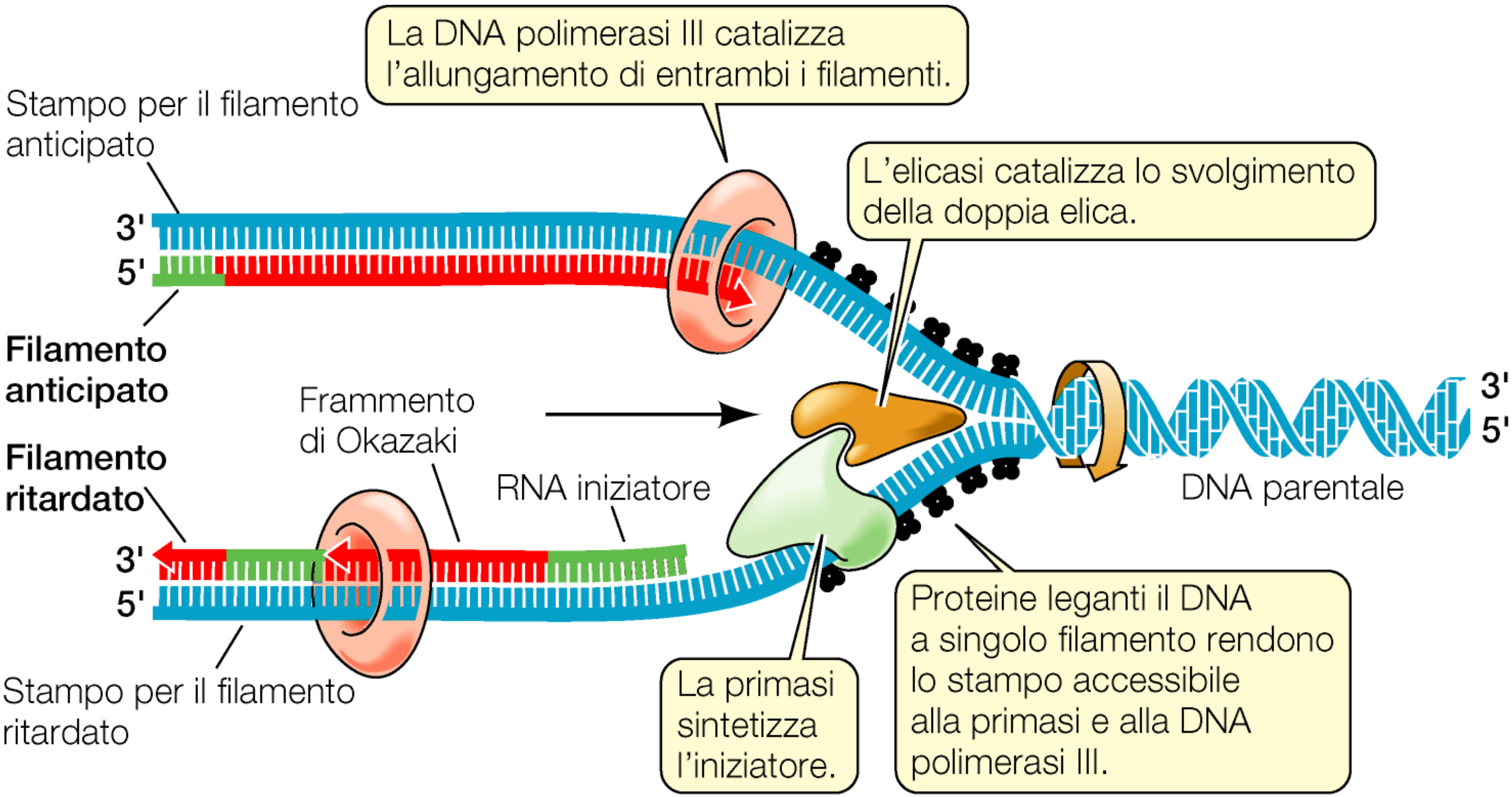


Fase di Elongazione

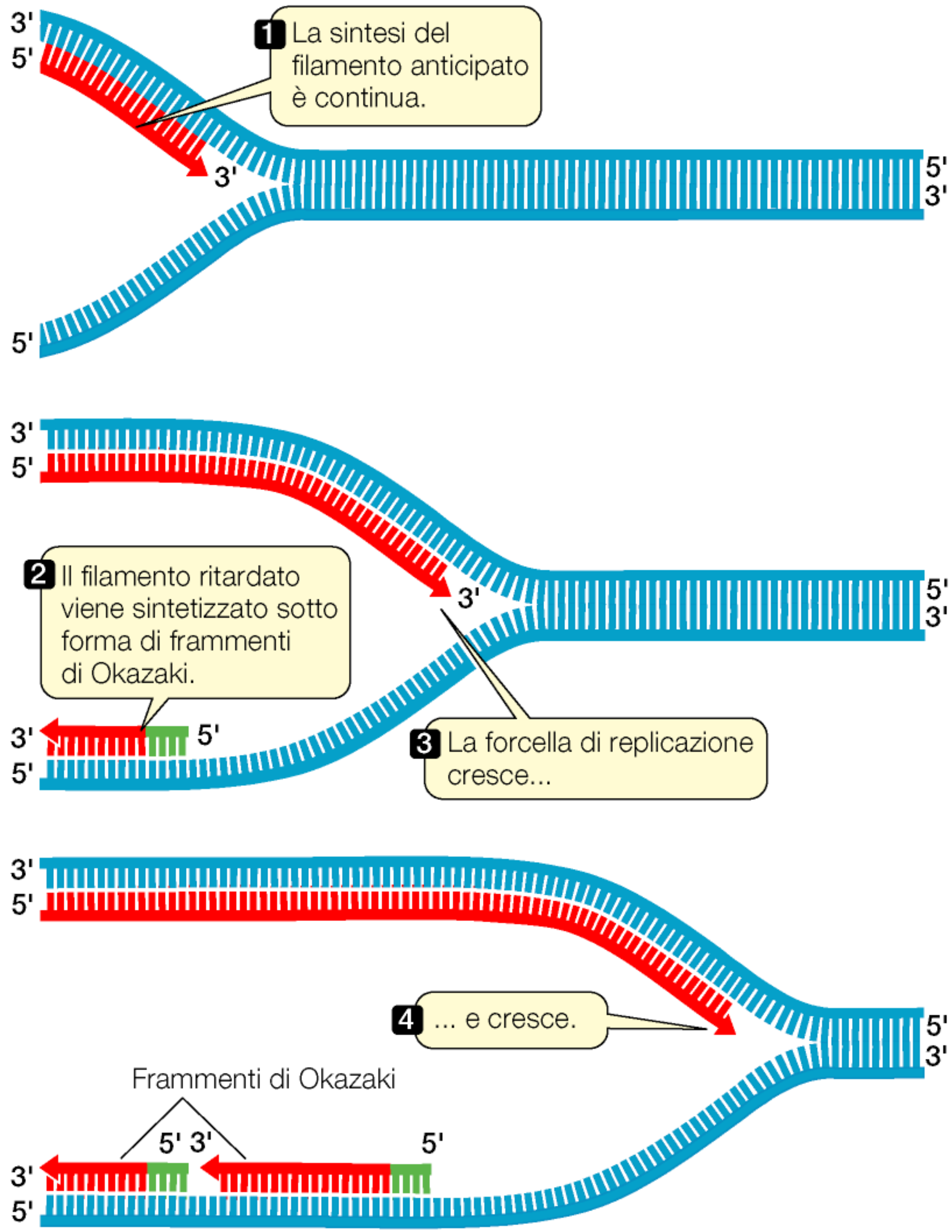


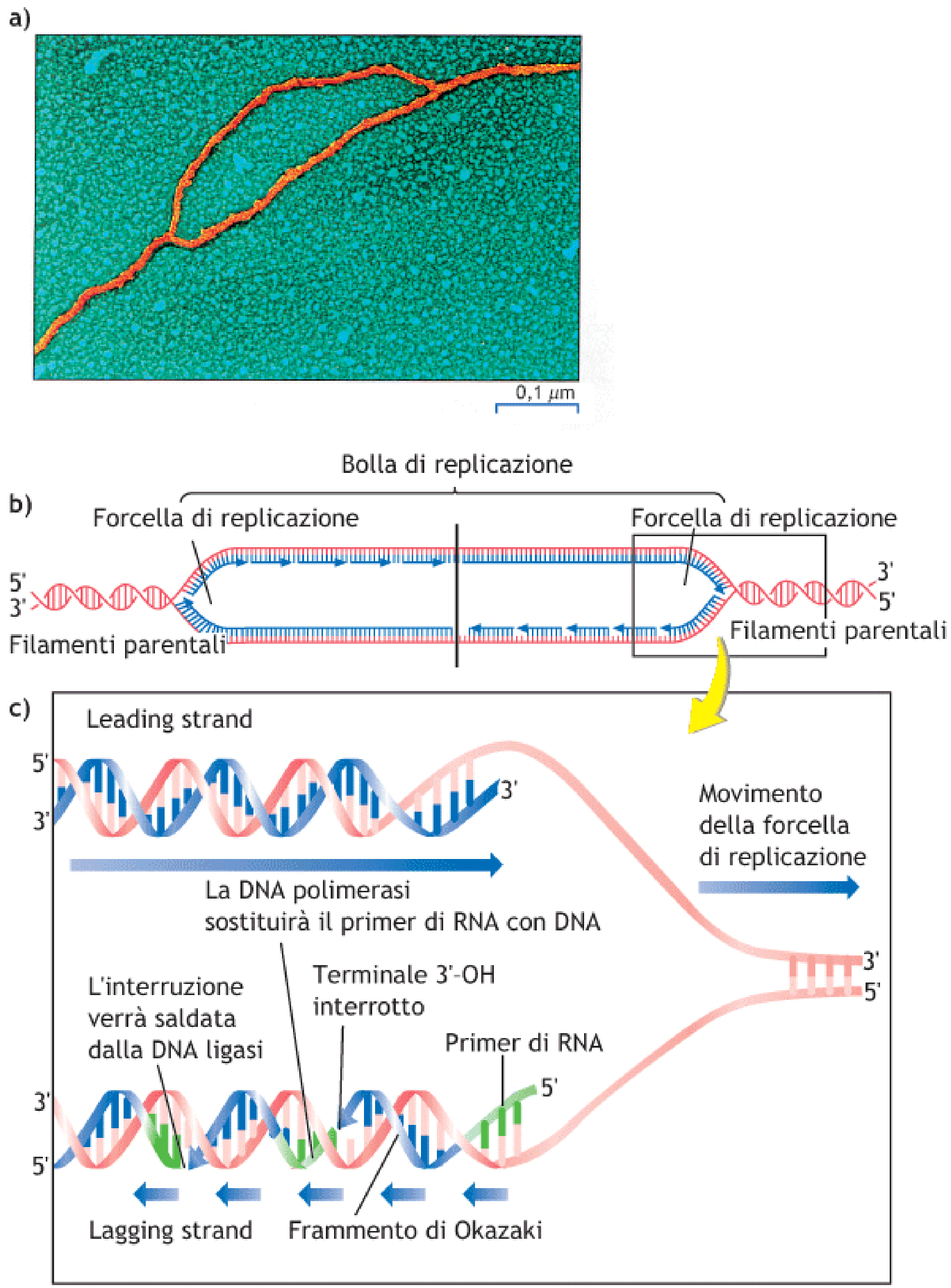
3 ...la sintesi del DNA su un filamento procede da destra verso sinistra...
Stampo 5′→3′ esposto
5′
3′
5′
Direzione di sintesi
1 Poiché i due filamenti stampo sono antiparalleli...
2 ...e la sintesi del DNA avviene sempre in direzione 5′→3′,...
Forcella di replicazione
3′
5′
Svolgimento
Direzione di sintesi
5′
3′
3′
Stampo 3′→5′ esposto
4 ...e da sinistra verso destra sull'altro filamento.


5'
3'
5'
filamenti
di nuova sintesi
5'
3'
3'
doppia elica parentale
di DNA
3'
5'
senso di avanzamento
della forcella replicativa

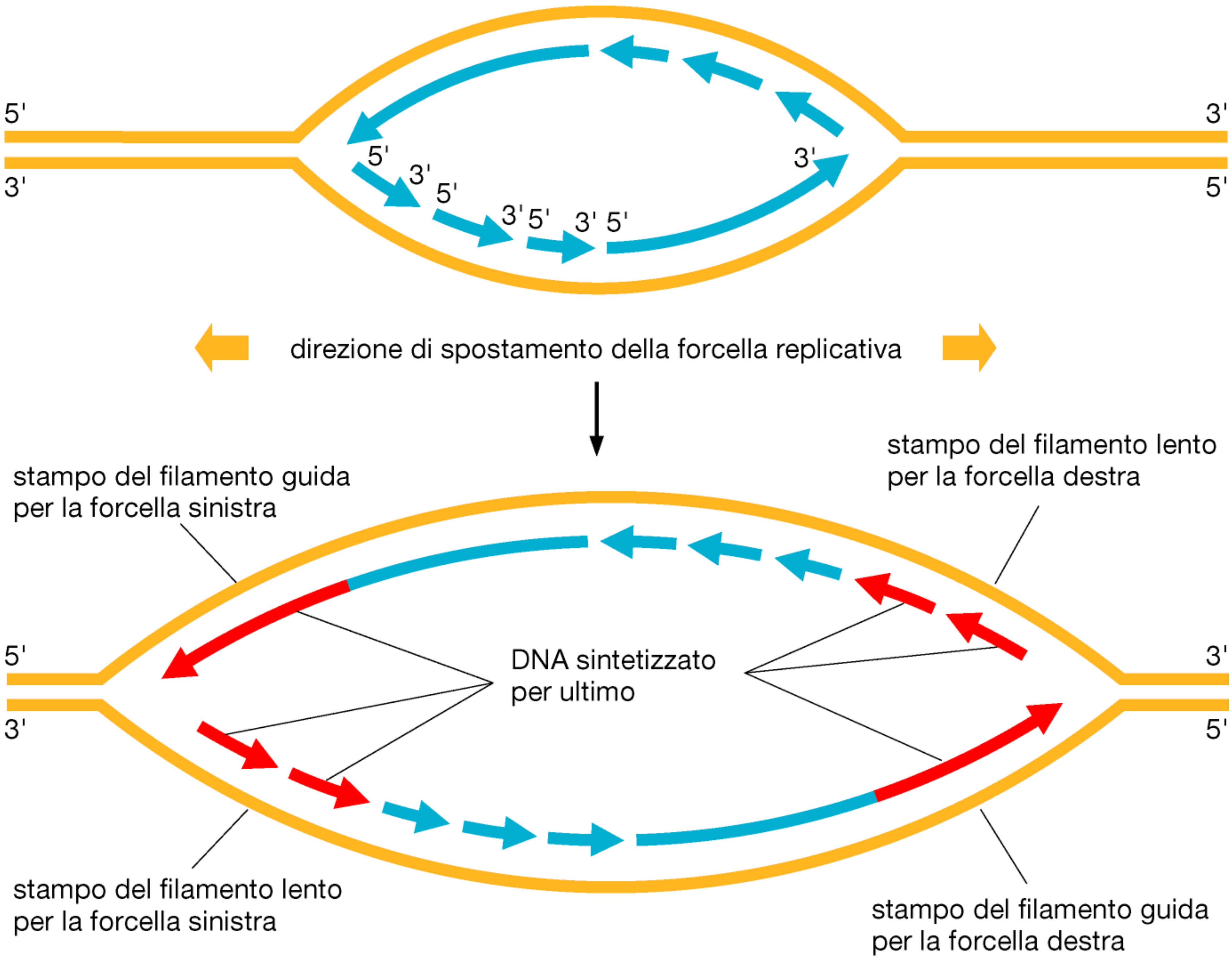


La DNA polimerasi III catalizza l'allungamento di entrambi i filamenti.
Stampo per il filamento anticipato
L'elicasi catalizza lo svolgimento della doppia elica.
3'
5'
Filamento anticipato
Frammento di Okazaki
Filamento ritardato
RNA iniziatore
DNA parentale
3'
5'
3'
5'
Stampo per il filamento ritardato
La primasi sintetizza l'iniziatore.
Proteine leganti il DNA a singolo filamento rendono lo stampo accessibile alla primasi e alla DNA polimerasi III.


3'
5'
1 La sintesi del filamento anticipato è continua.
3'
5'
3'
5'
3'
5'
2 Il filamento ritardato viene sintetizzato sotto forma di frammenti di Okazaki.
3'
5'
3'
5'
3'
5'
3 La forcella di replicazione cresce...
3'
5'
4 ... e cresce.
5'
3'
Frammenti di Okazaki
5' 3'
5'
3'
5'



a)
0,1 μm
b)
Bolla di replicazione
Forcella di replicazione
Forcella di replicazione
5'
3'
3'
5'
Filamenti parentali
Filamenti parentali
c)
Leading strand
5'
3'
3'
Movimento
della forcella
di replicazione
La DNA polimerasi
sostituirà il primer di RNA con DNA
3'
5'
L'interruzione
verrà saldata
dalla DNA ligasi
Terminale 3'-OH
interrotto
Primer di RNA
5'
3'
5'
Lagging strand
Frammento di Okazaki


5'
3'
5'
3'
5'
3'
3'
5'
3'
5'
3'
5'
3'
5'
direzione di spostamento della forcella replicativa
stampo del filamento guida
per la forcella sinistra
stampo del filamento lento
per la forcella destra
5'
3'
DNA sintetizzato
per ultimo
3'
5'
stampo del filamento lento
per la forcella sinistra
stampo del filamento guida
per la forcella destra