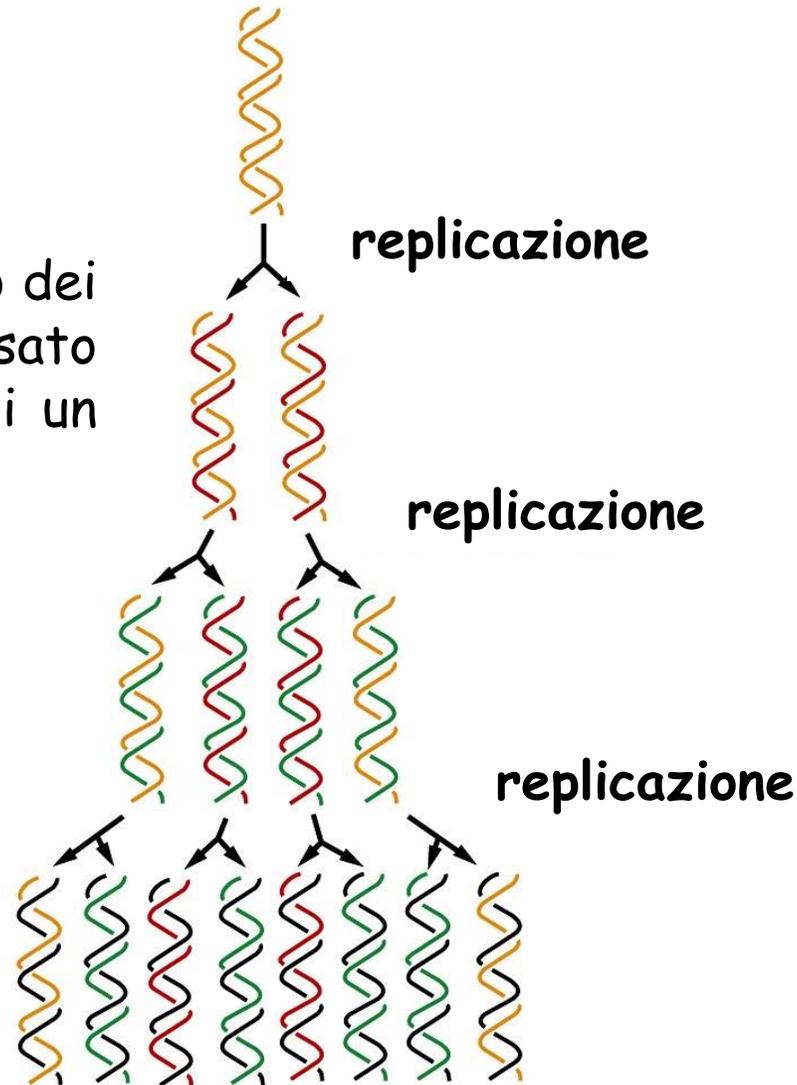


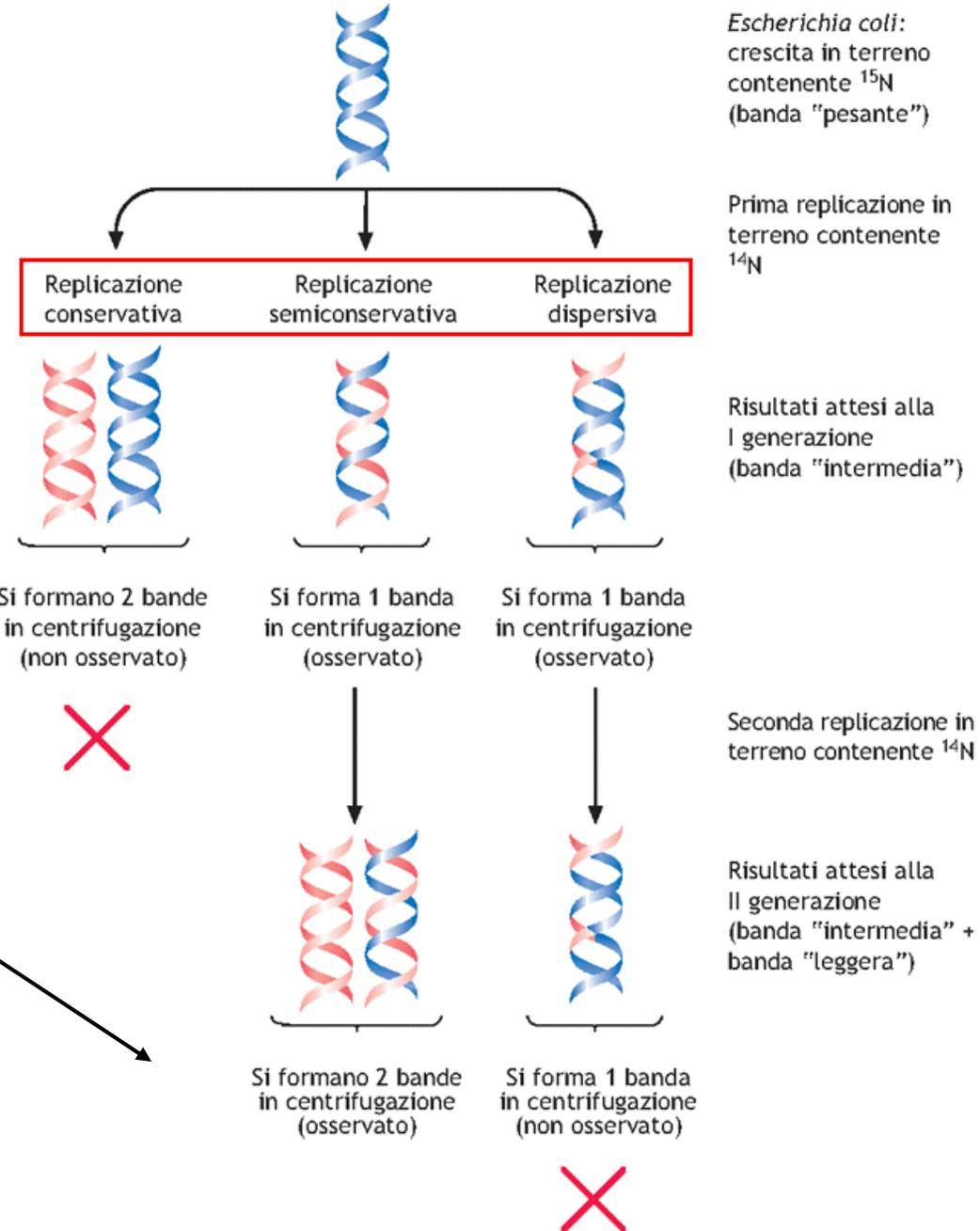
La replicazione del DNA

La natura semiconservativa della replicazione del DNA

In un ciclo di replicazione ciascuno dei due filamenti di DNA viene usato come stampo per la formazione di un filamento complementare di DNA.

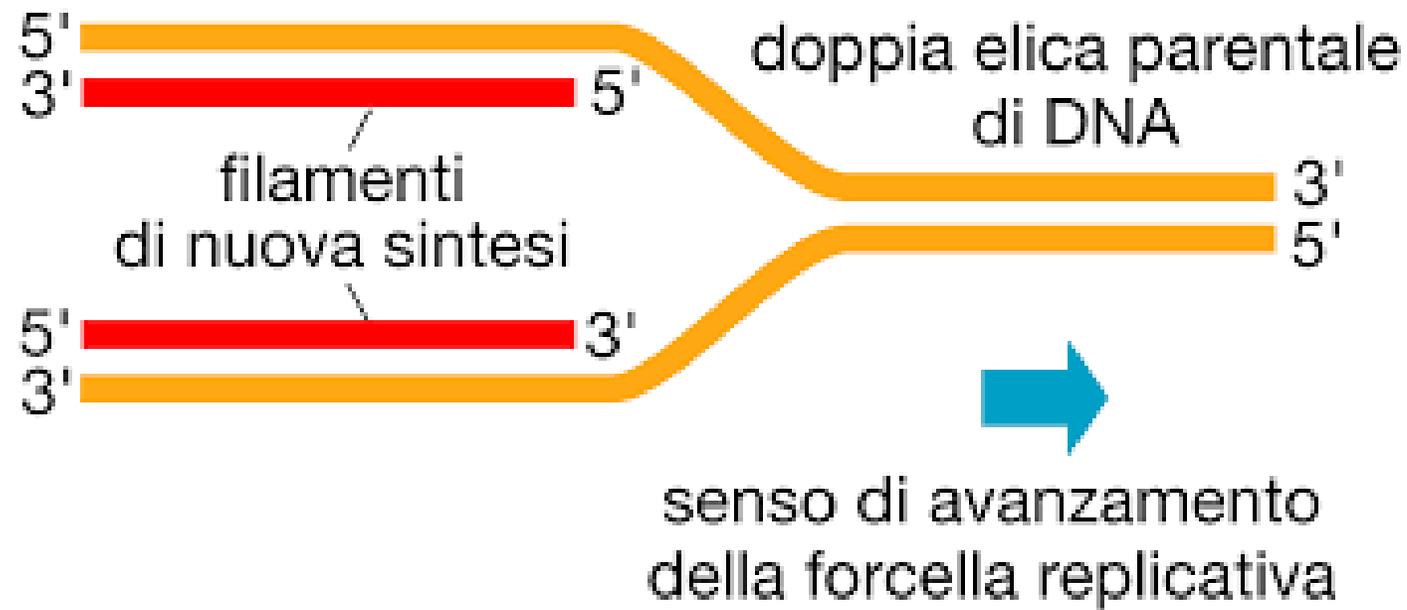


Esperimento di Meselson e Stahl

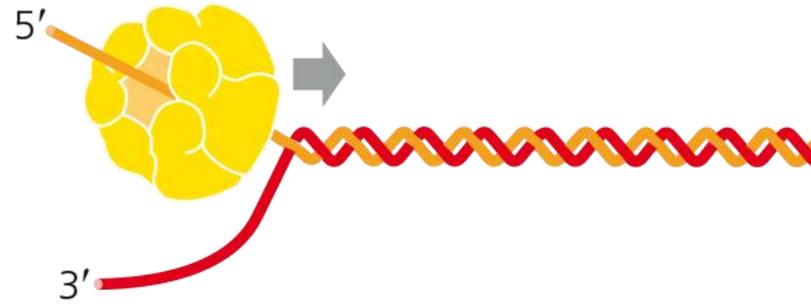


La duplicazione del DNA avviene con un
meccanismo semiconservativo

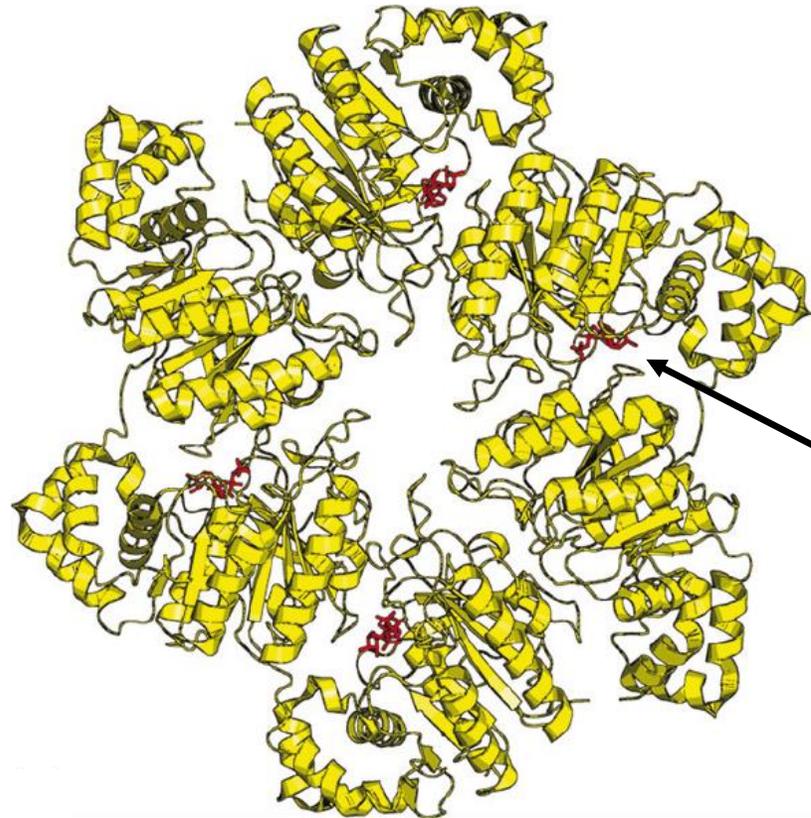
La duplicazione del DNA prevede la formazione di una forcella di replicazione



le DNA elicasi

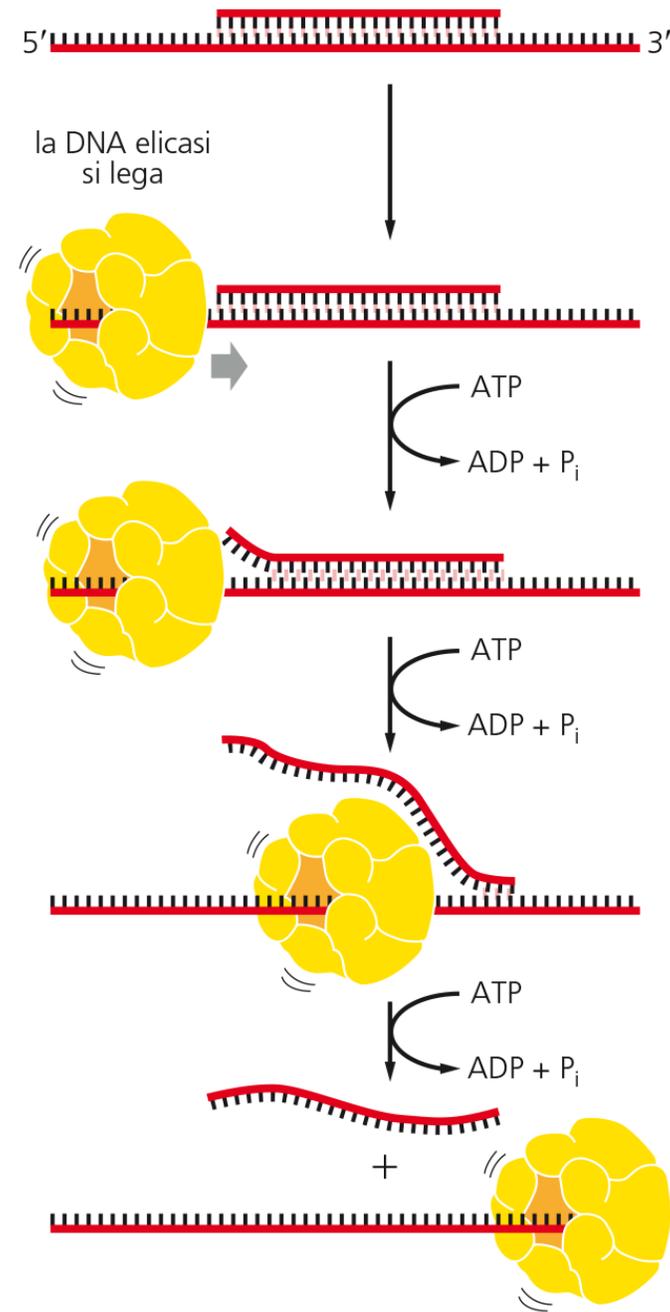


Aprono la doppia elica del DNA davanti alla forcella di replicazione ad una velocità di circa 1000 nucleotidi al secondo.

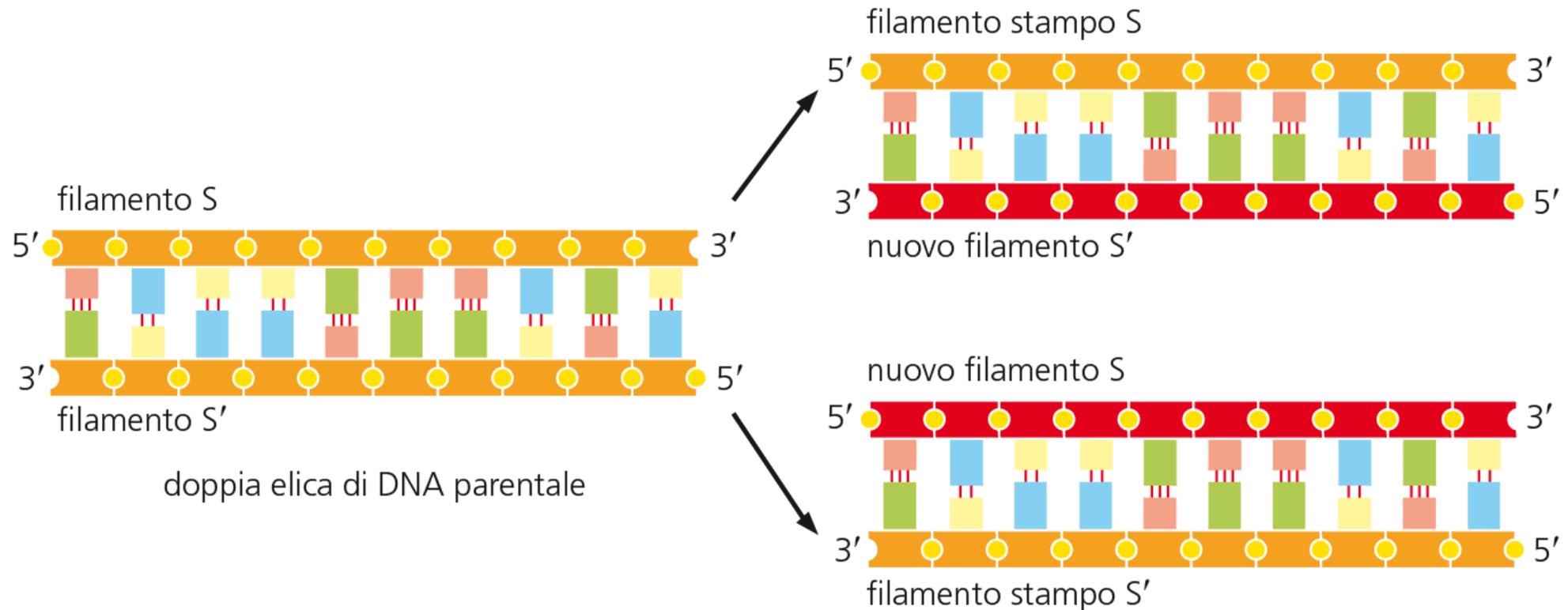


Sito di legame per l'ATP

le DNA elicasi



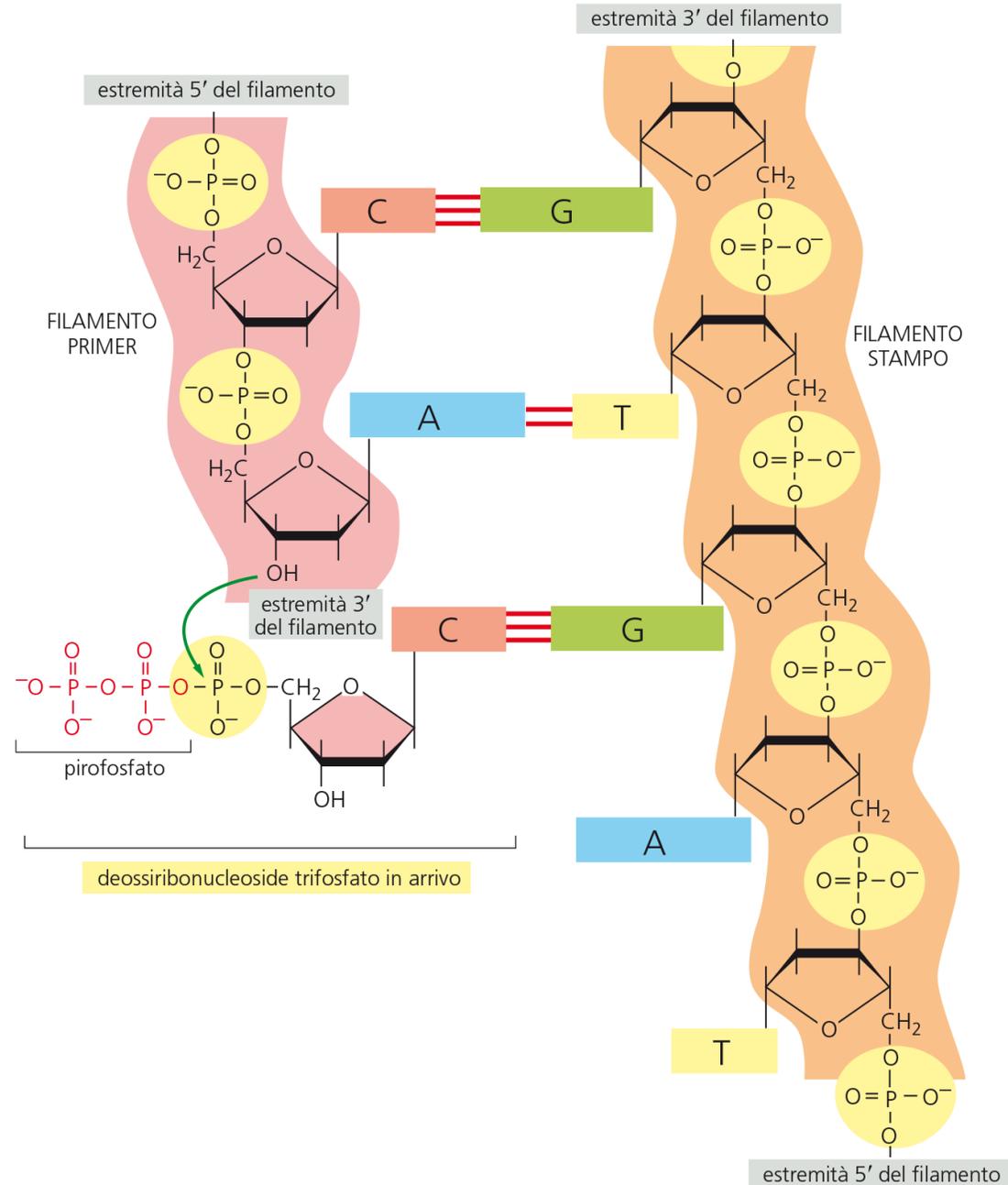
L'appaiamento delle basi è il fondamento della replicazione del DNA



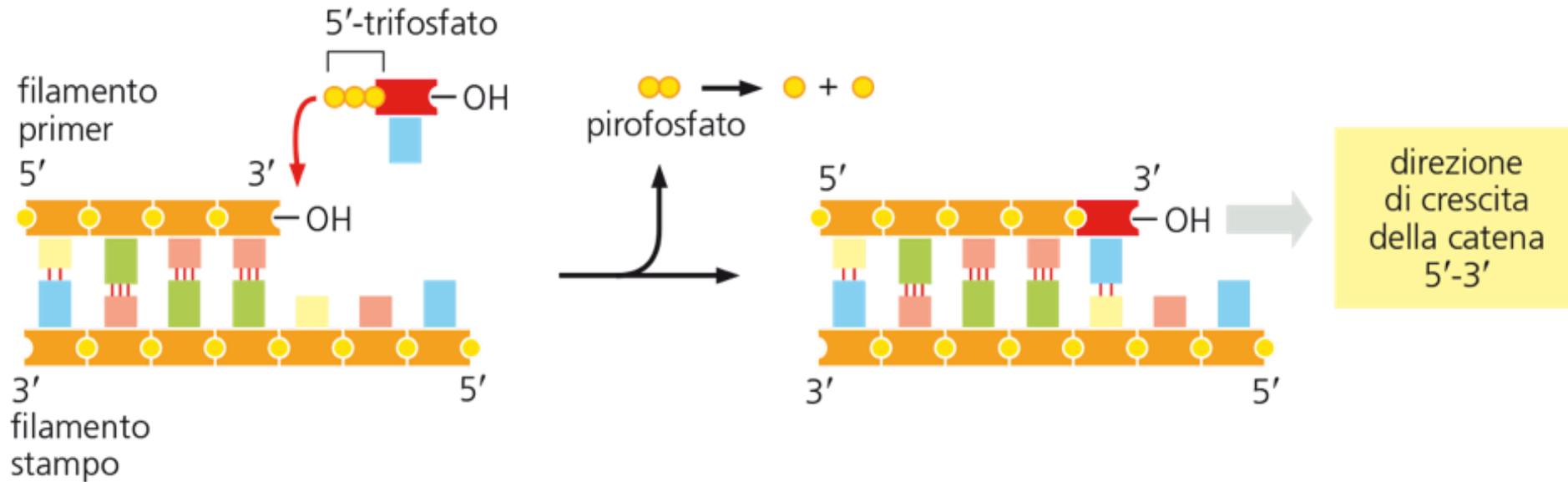
La reazione fondamentale della sintesi del DNA è l'aggiunta di un deossiribonucleotide all'estremità 3' di una catena polinucleotidica nascente



**DNA
polimerasi**



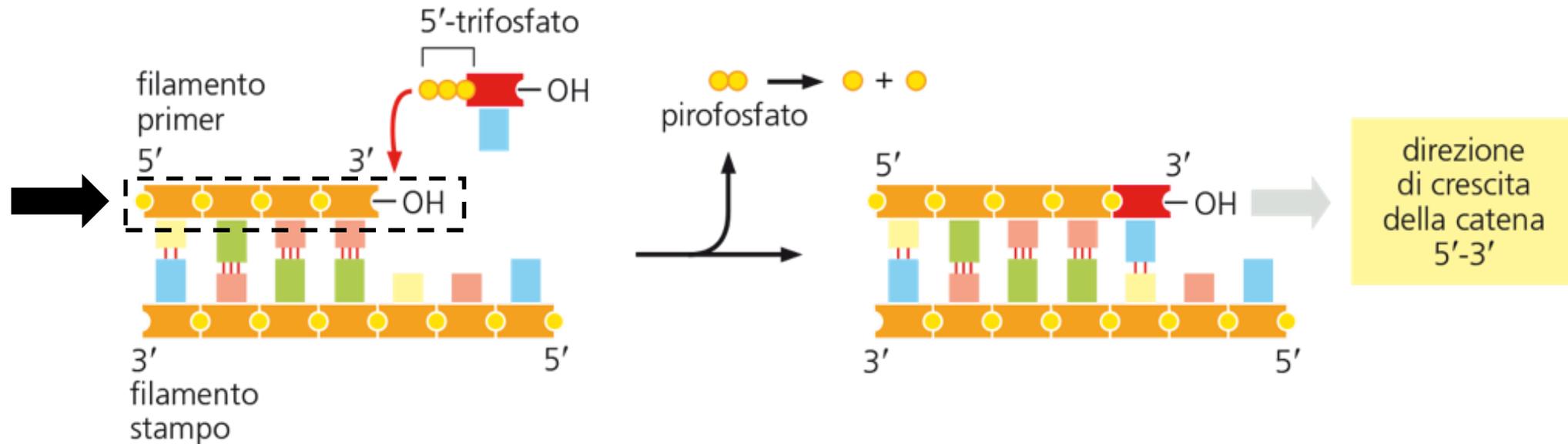
Sintesi di DNA catalizzata dalla DNA polimerasi



Formazione di un legame
fosfodiesterico

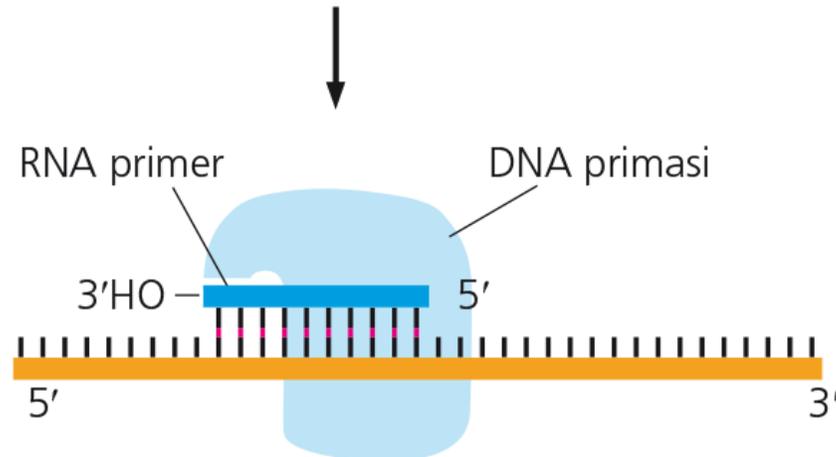
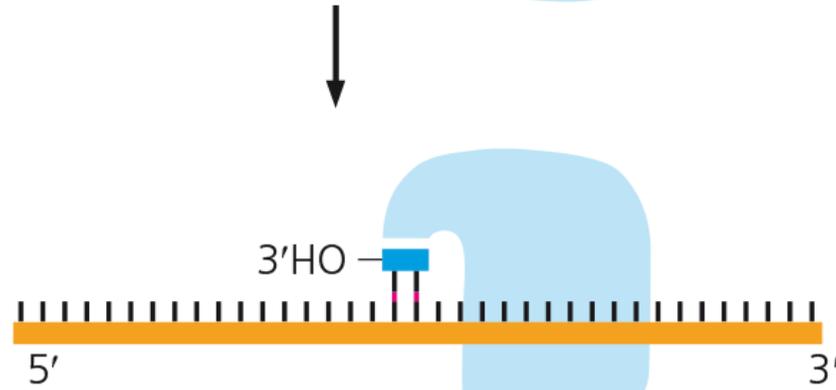
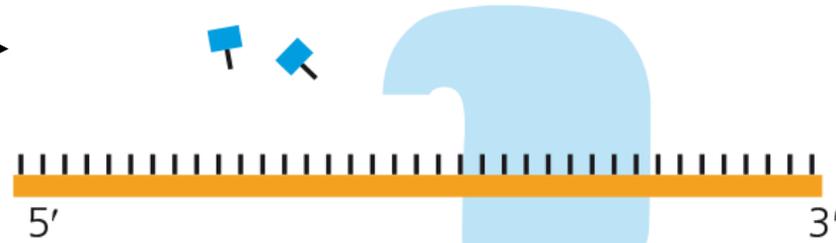
Caratteristica importante della DNA polimerasi:

è primer-dipendente



Sintesi dell' RNA primer: la DNA primasi (RNA polimerasi-DNA dipendente)

Ribonucleotidi
trifosfati

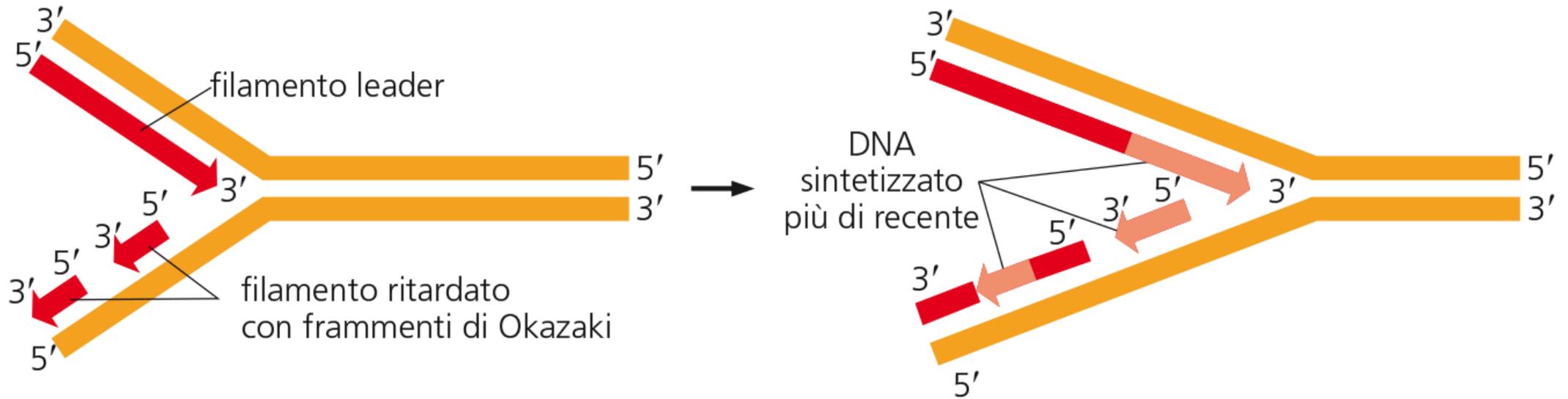


La DNA polimerasi

Attività polimerasica

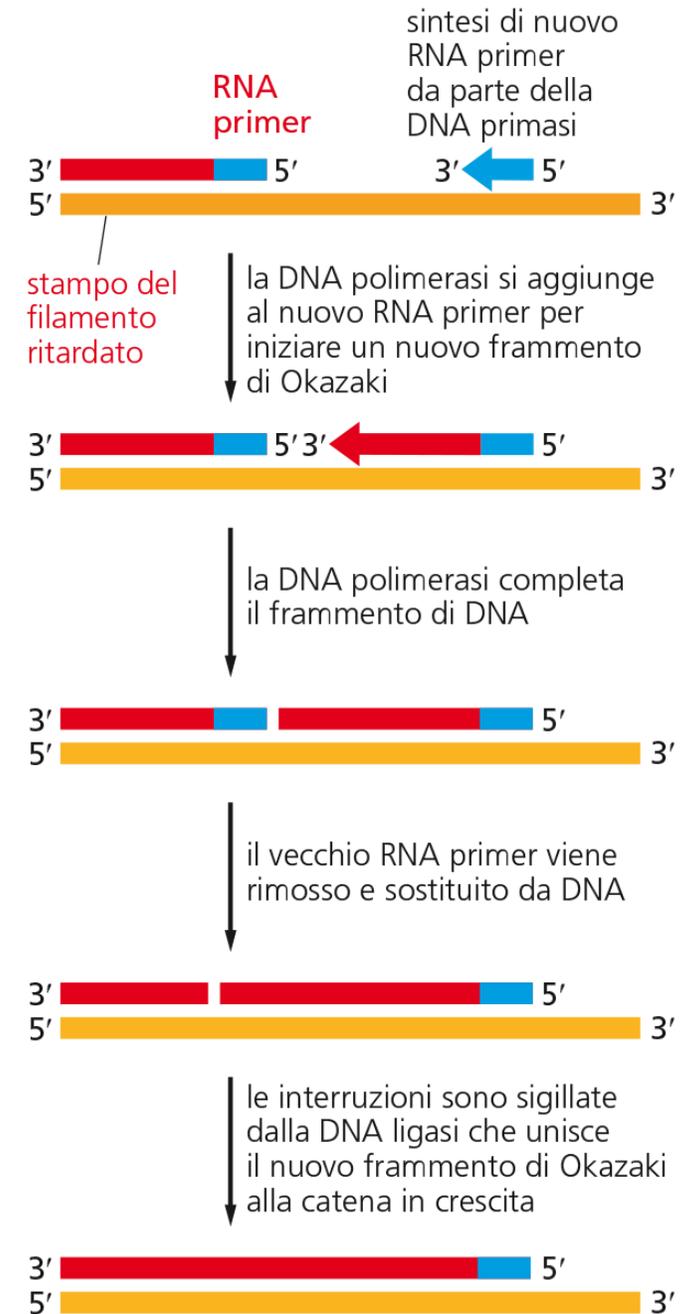


La forcella di replicazione ha una struttura asimmetrica: i frammenti di Okazaki



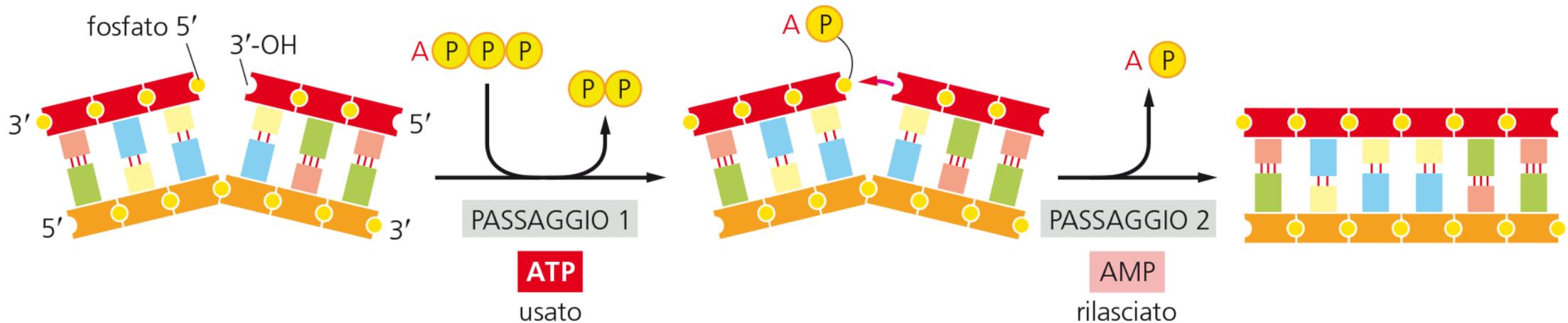
Sintesi dei frammenti di Okazaki sul filamento ritardato

I primers vengono rimossi da un enzima di riparazione del DNA (una **RNAasi H**) che riconosce un filamento di RNA in un'elica RNA/DNA e lo frammenta. Le interruzioni lasciate vengono riempite dalla DNA polimerasi ed unite dalla DNA ligasi.



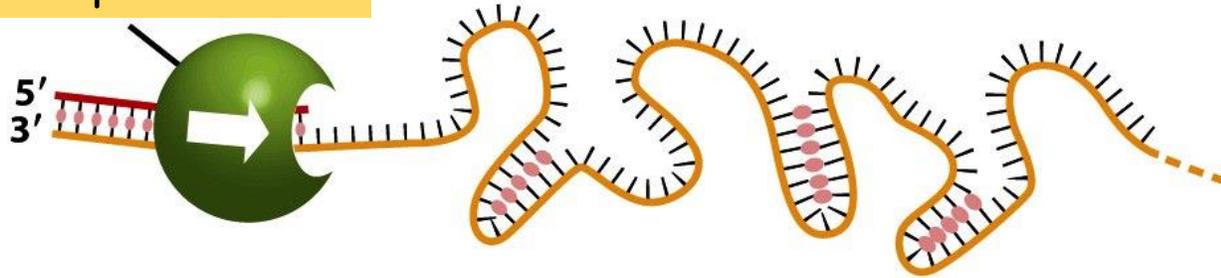
La DNA ligasi

Lega fra loro i frammenti di Okazaki dopo che sono stati distrutti i primers



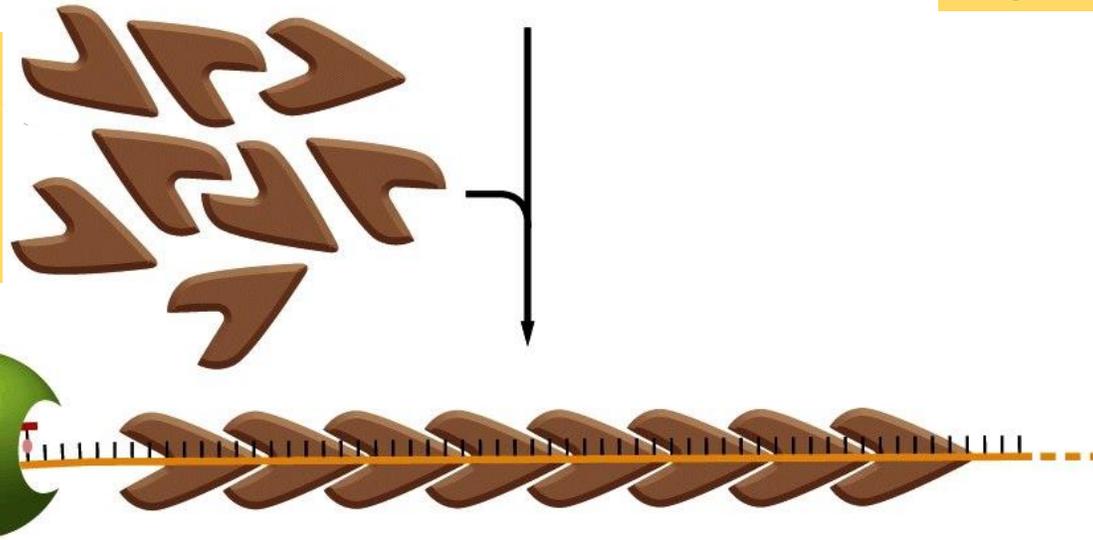
Le proteine che legano il DNA a singolo filamento

DNA polimerasi



Regione a singolo filamento di DNA con brevi regioni a forcina

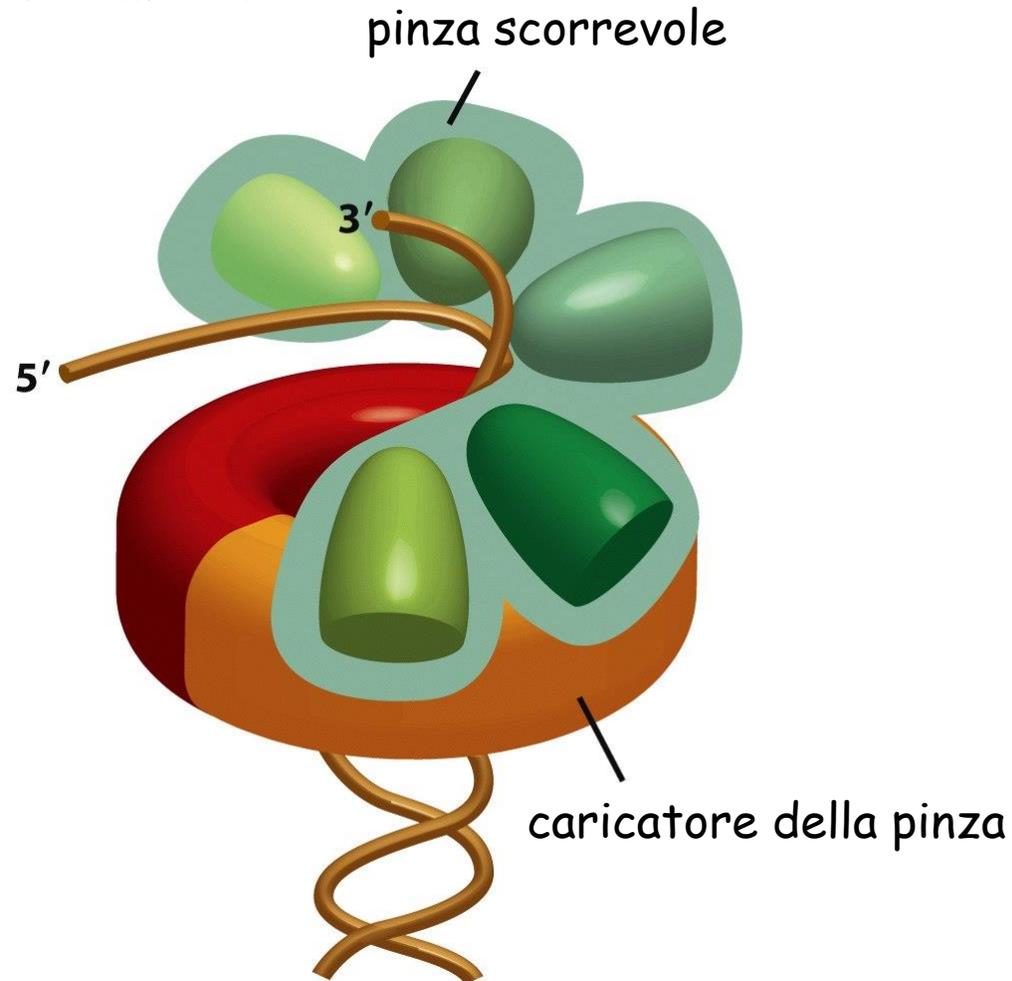
Monomeri di proteine che legano il singolo filamento di DNA



il legame cooperativo delle proteine raddrizza la regione della catena

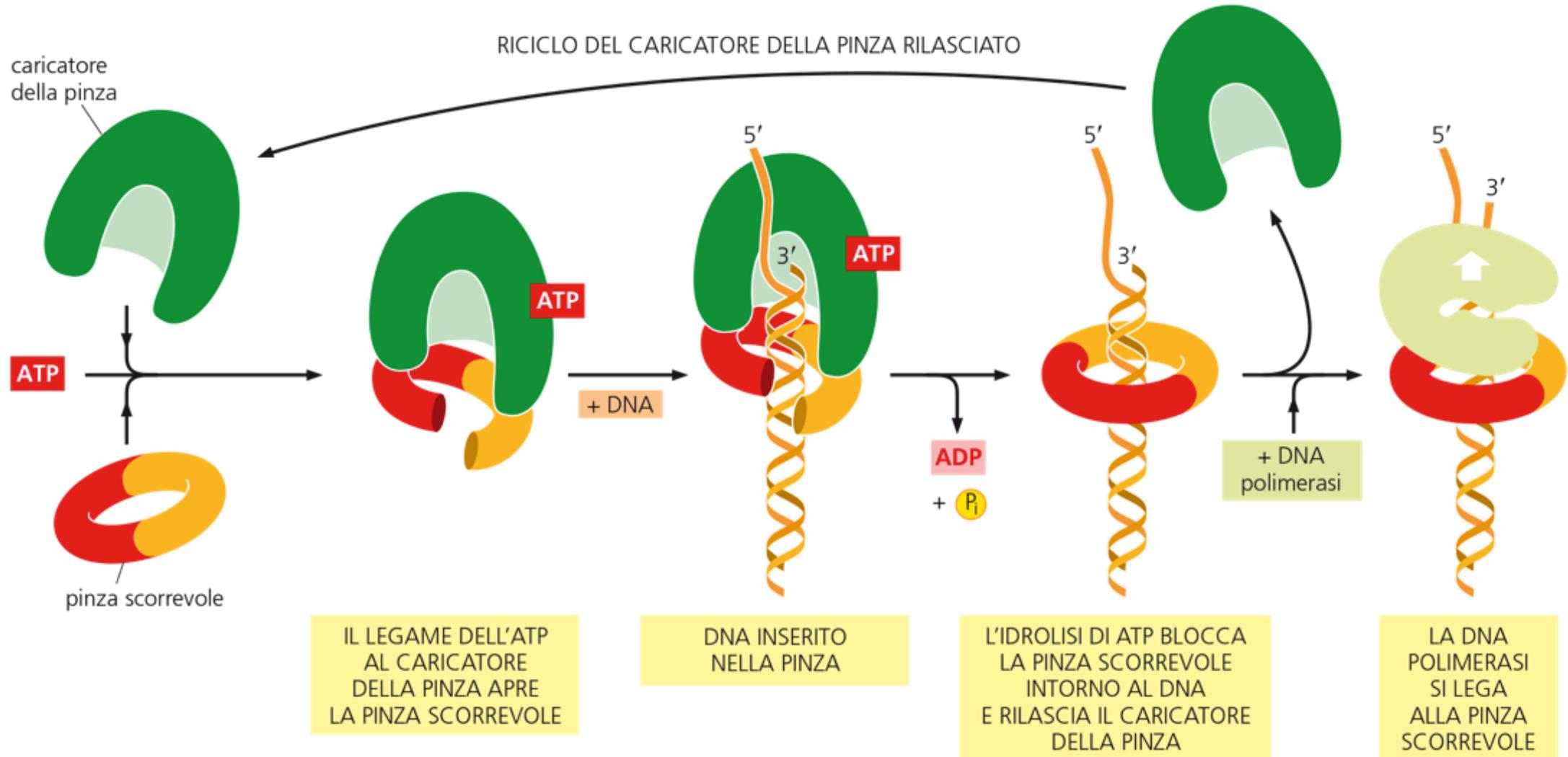
La pinza scorrevole

Tiene la DNA polimerasi associata al DNA a singolo filamento e la rilascia quando incontra un doppio filamento di DNA (frammenti di Okazaki) sul filamento ritardato



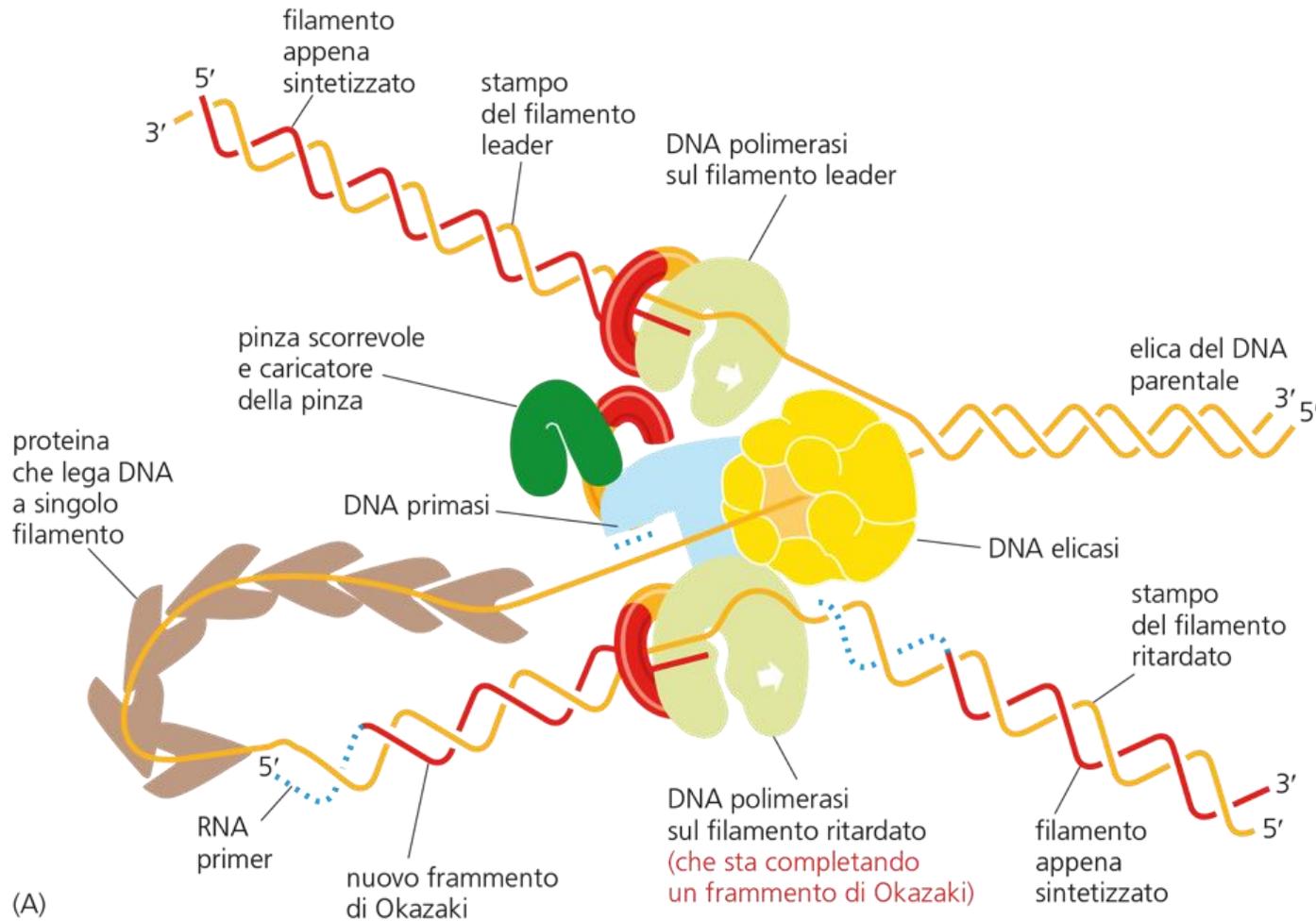
La pinza scorrevole

Incrementa la processività della DNA polimerasi

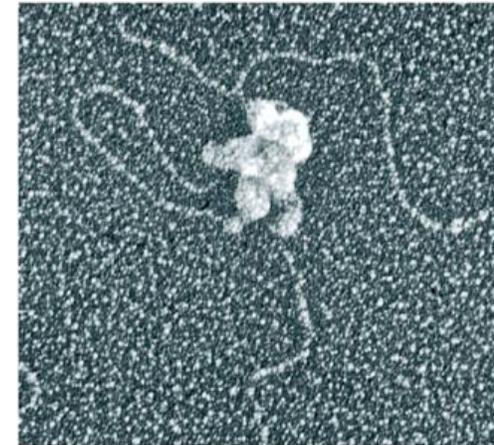


Il modello cosiddetto a "trombone" per coordinare le due DNA polimerasi a livello di una forca replicativa

La replicazione del filamento guida e del filamento in ritardo in *E. coli* è svolta da due DNA polimerasi che lavorano insieme come parti di un unico complesso



(A)

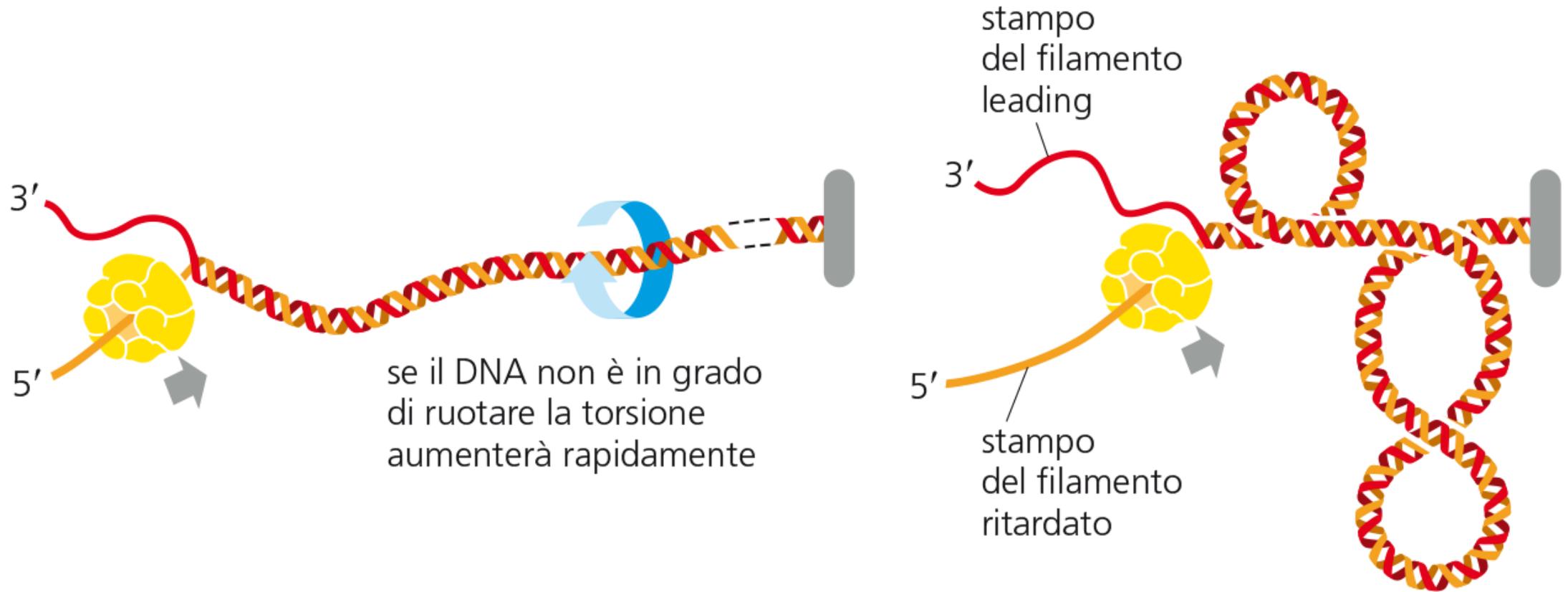


(B)

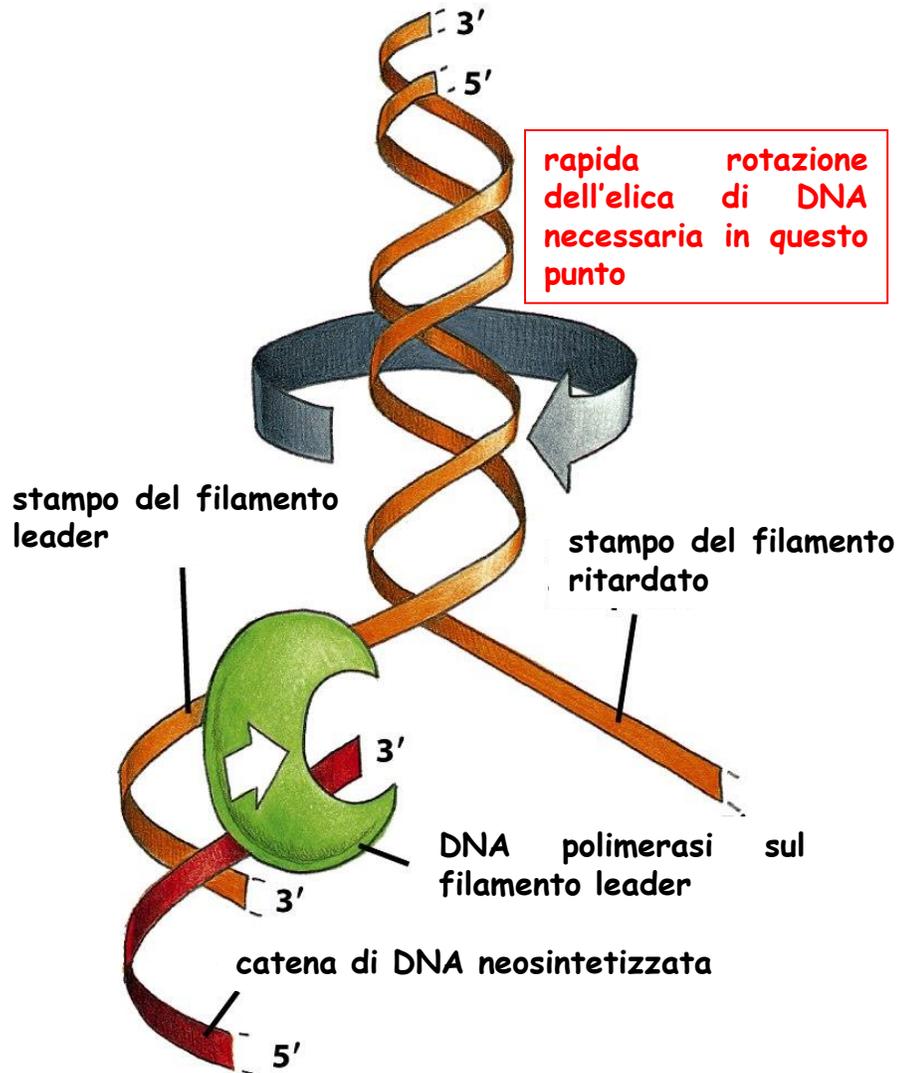


(C)

Il procedere della forcella di replicazione



Il procedere della forcella di replicazione



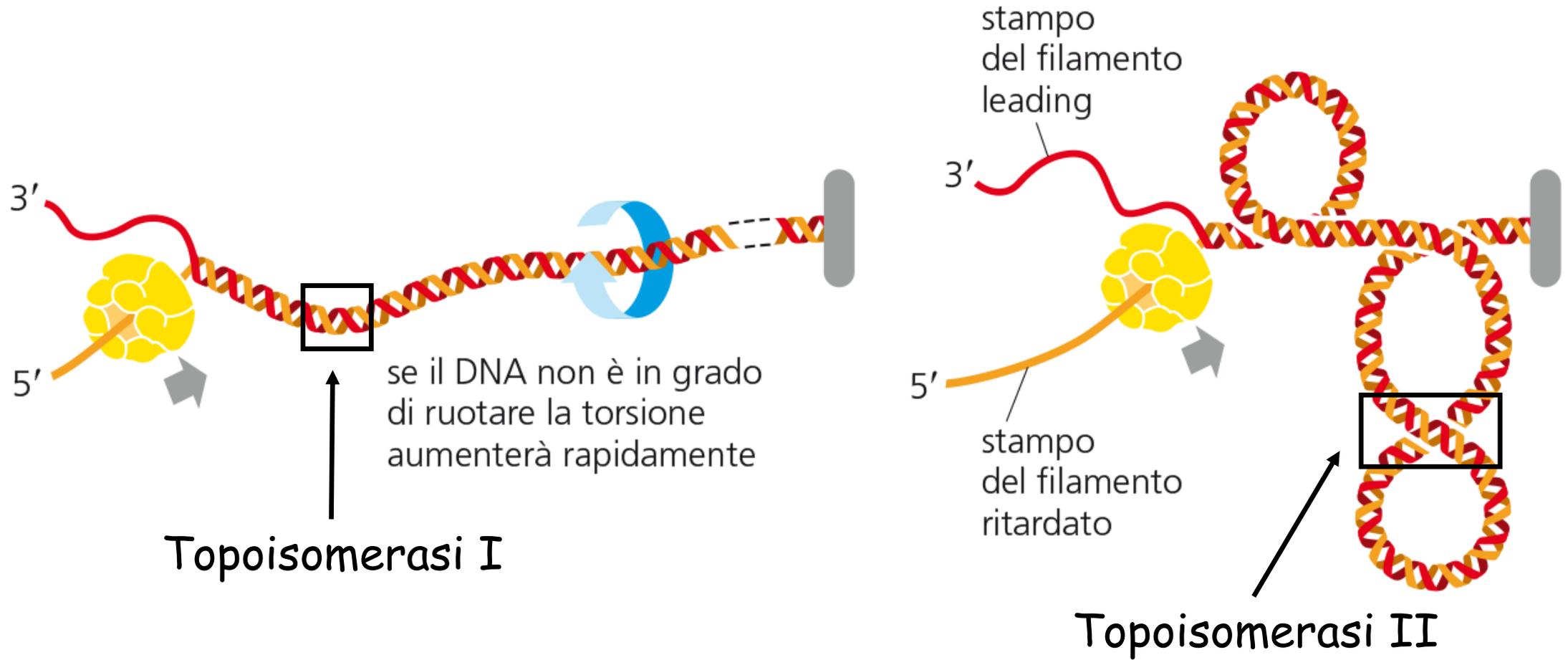
sarebbe necessaria troppa energia



DNA Topoisomerasi

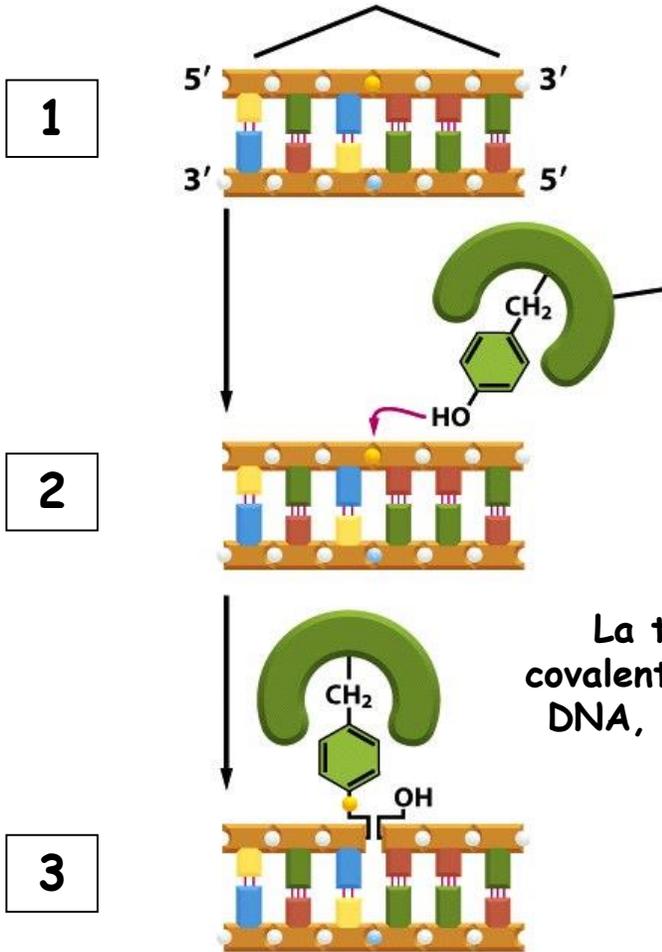
Interagisce con un gruppo fosfato nel DNA rompendo temporaneamente un legame fosfodiesterico

Il procedere della forcella di replicazione



Le DNA topoisomerasi I

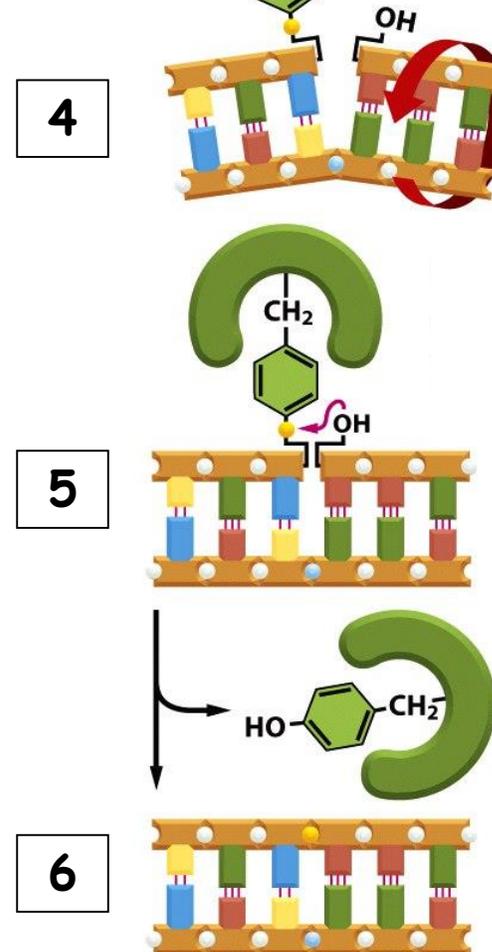
Un'estremità della doppia elica di DNA non può ruotare rispetto all'altra estremità



Topoisomerasi di tipo I con la tirosina nel sito attivo

La topoisomerasi I si lega covalentemente ad un fosfato nel DNA, rompendo così un legame fosfodiesterico

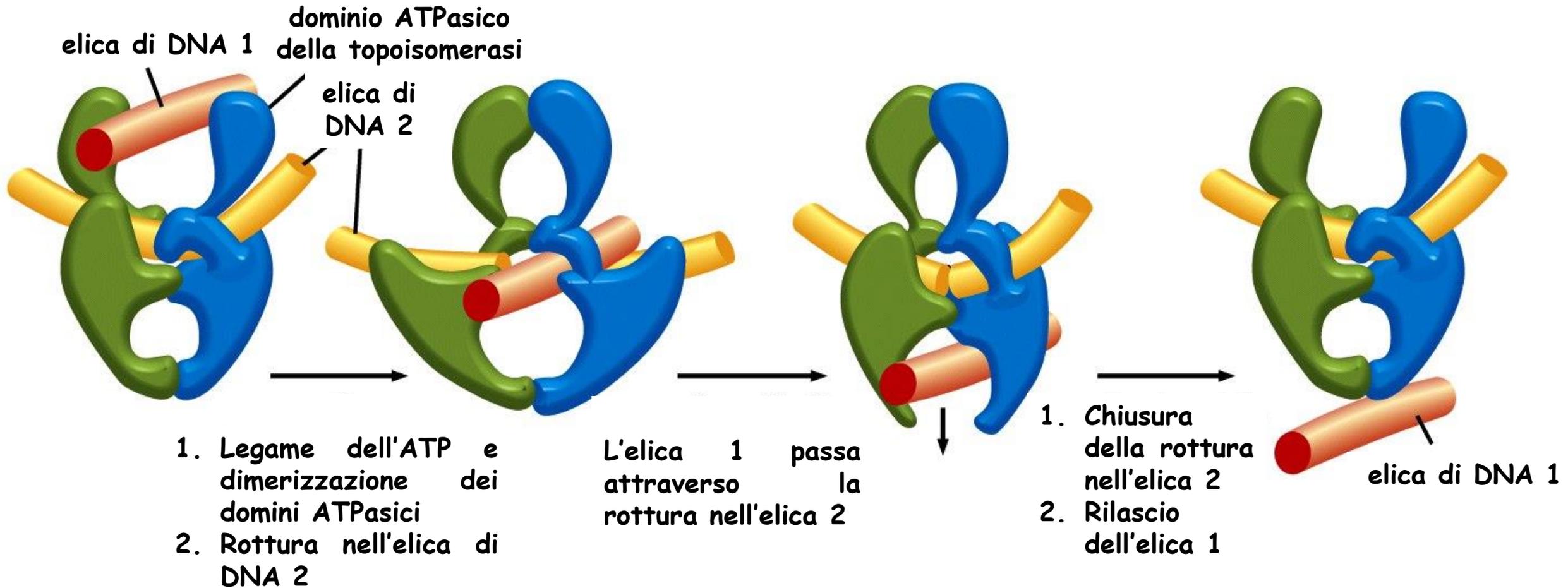
Le due estremità del DNA possono ora ruotare l'una rispetto all'altra, rilasciando la tensione accumulata



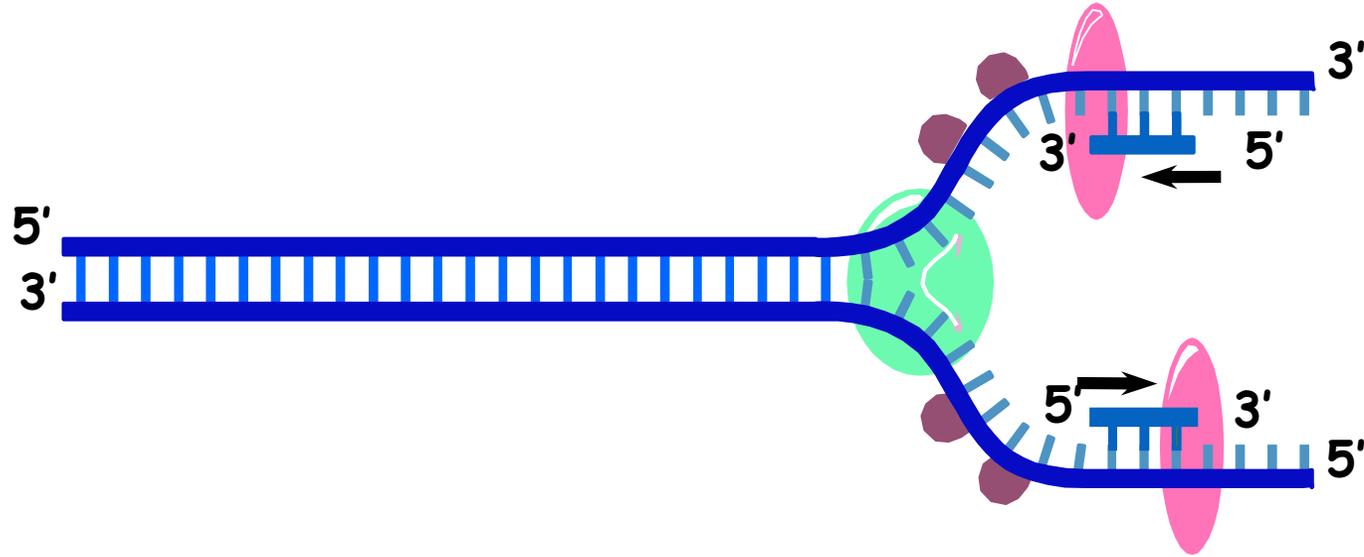
L'energia del legame fosfodiesterico originale è conservata nel legame fosfotirosinico, rendendo la reazione reversibile

La riformazione spontanea del legame fosfodiesterico rigenera sia l'elica del DNA che la DNA topoisomerasi I

Le DNA topoisomerasi II



Replication

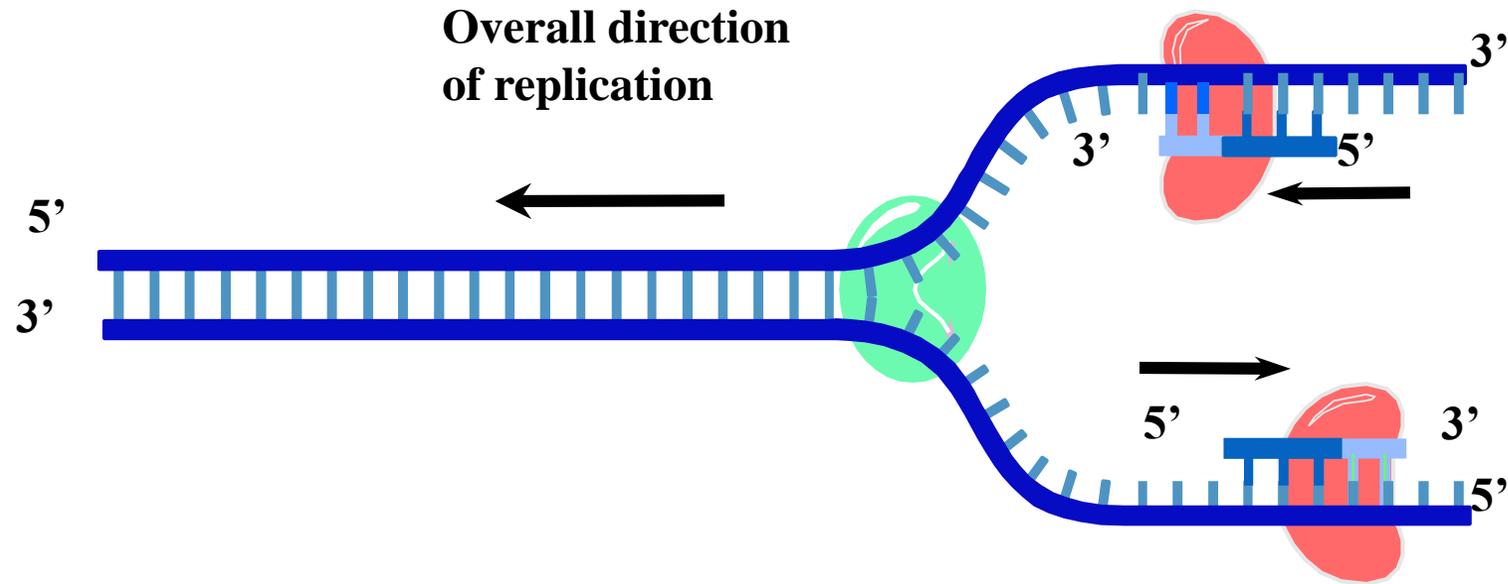


Helicase protein binds to DNA sequences called origins and unwinds DNA strands.

Binding proteins prevent single strands from rewinding.

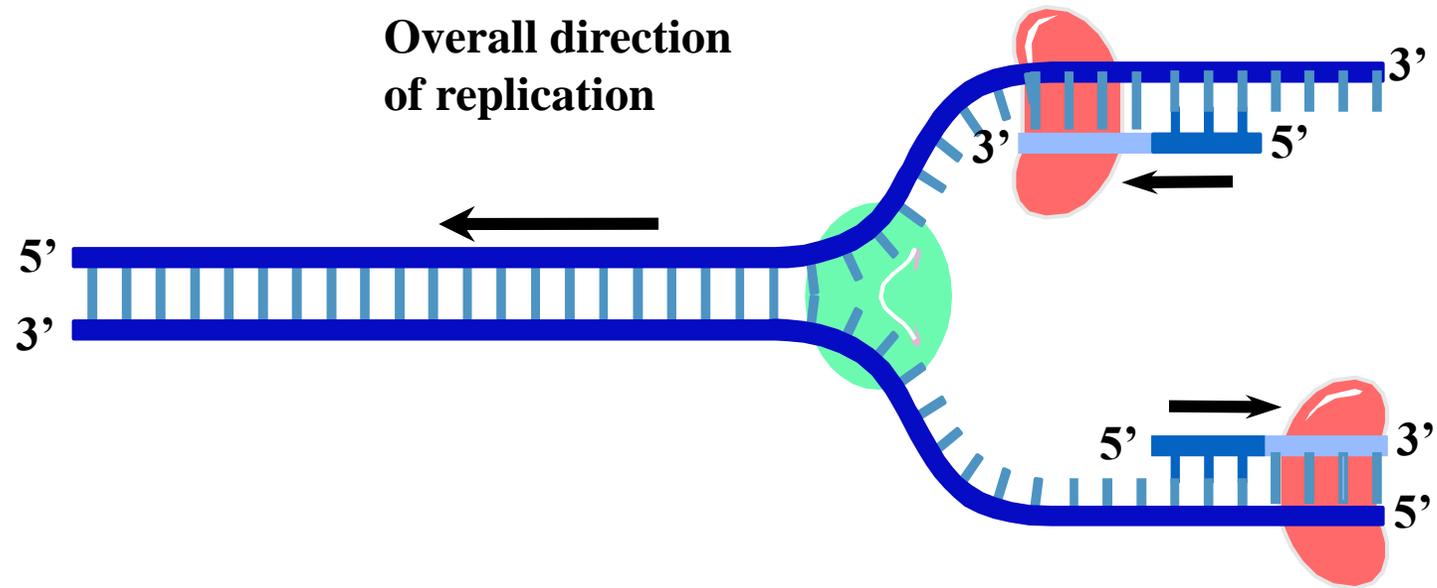
Primase protein makes a short segment of RNA complementary to the DNA, a primer.

Replication



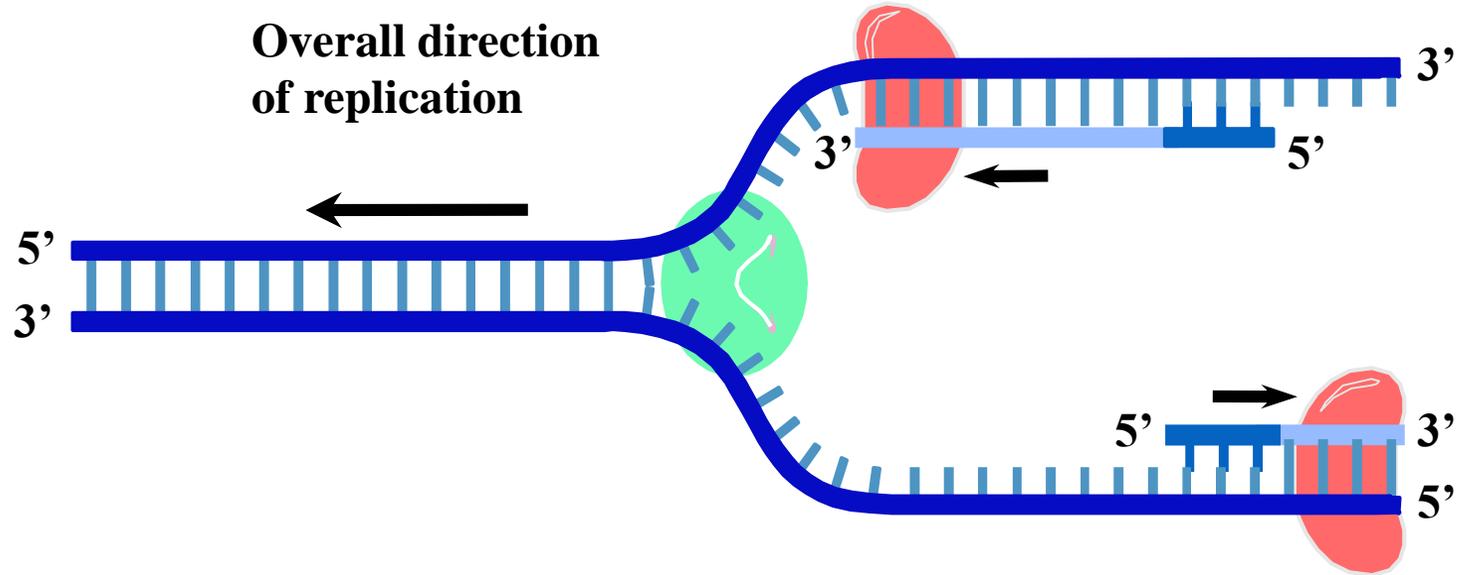
DNA polymerase III enzyme adds DNA nucleotides to the RNA primer.

Replication



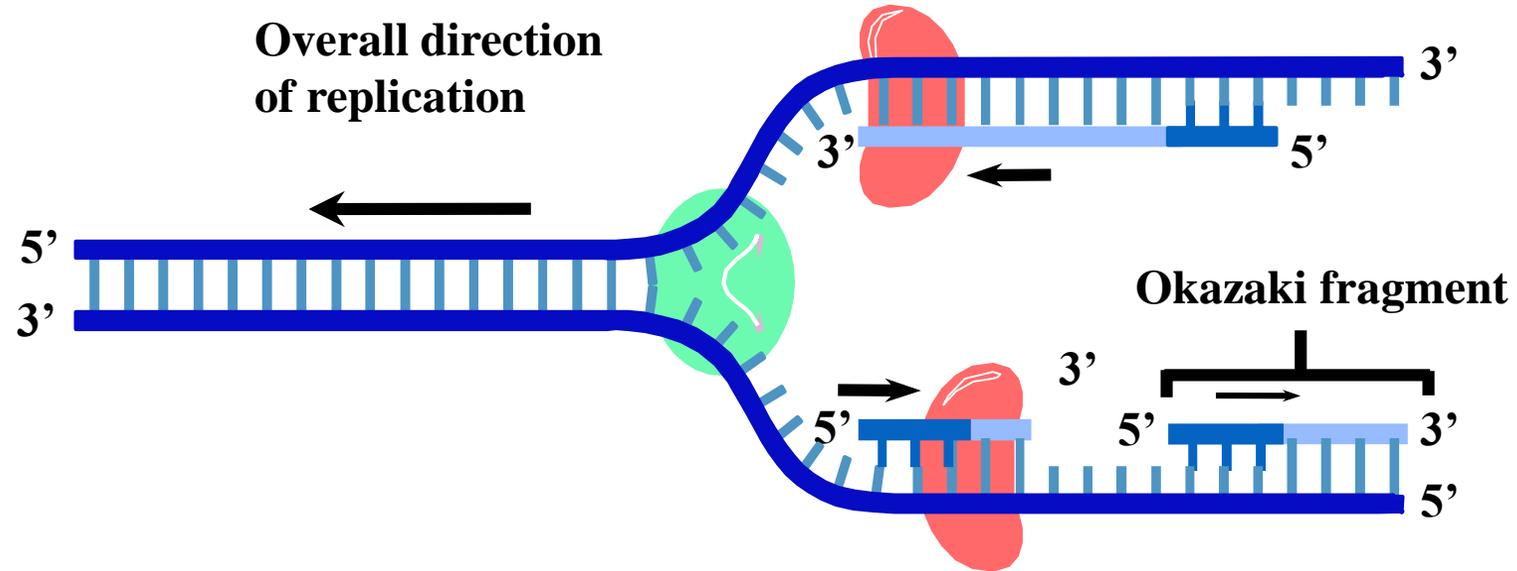
DNA polymerase proofreads bases added and replaces incorrect nucleotides.

Replication



Leading strand synthesis continues in a 5' to 3' direction.

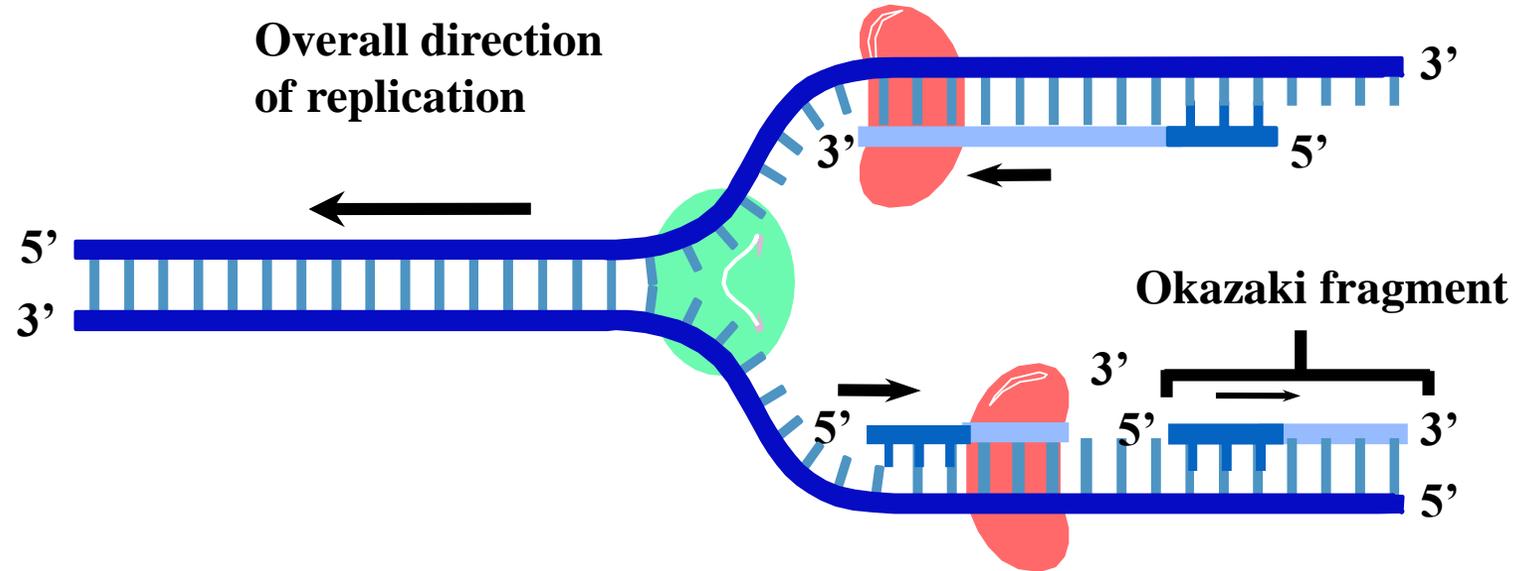
Replication



Leading strand synthesis continues in a 5' to 3' direction.

Discontinuous synthesis produces 5' to 3' DNA segments called Okazaki fragments.

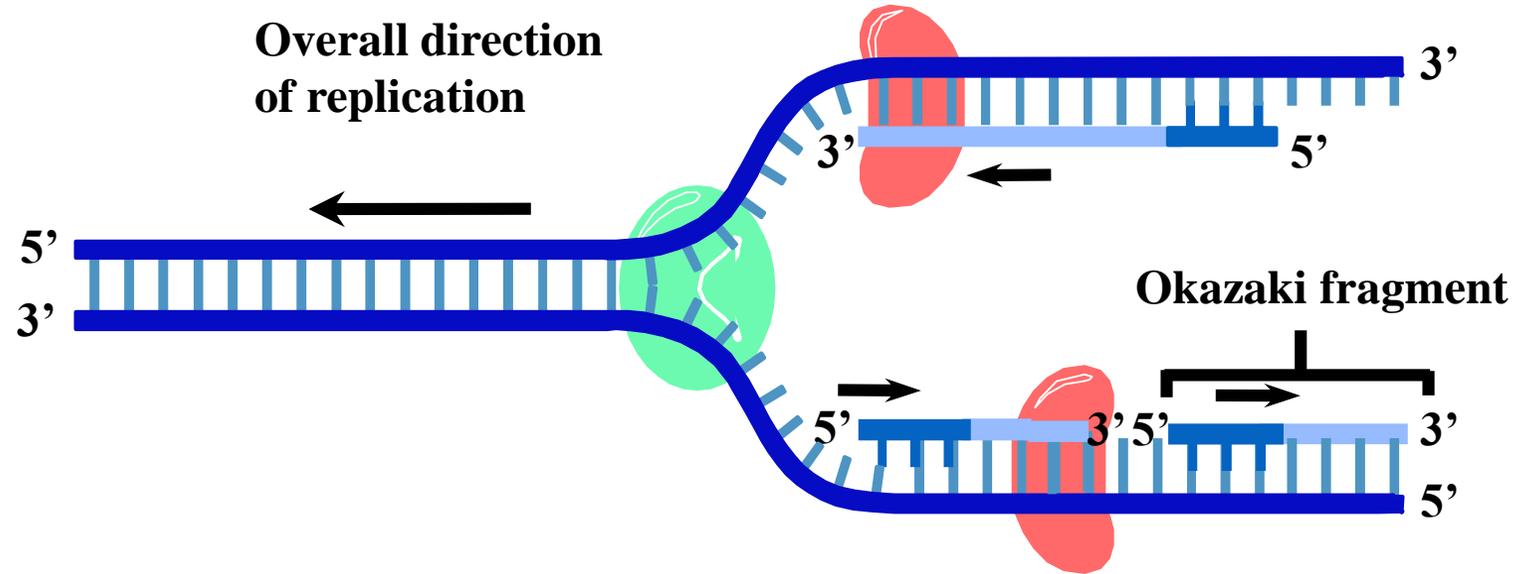
Replication



Leading strand synthesis continues in a 5' to 3' direction.

Discontinuous synthesis produces 5' to 3' DNA segments called Okazaki fragments.

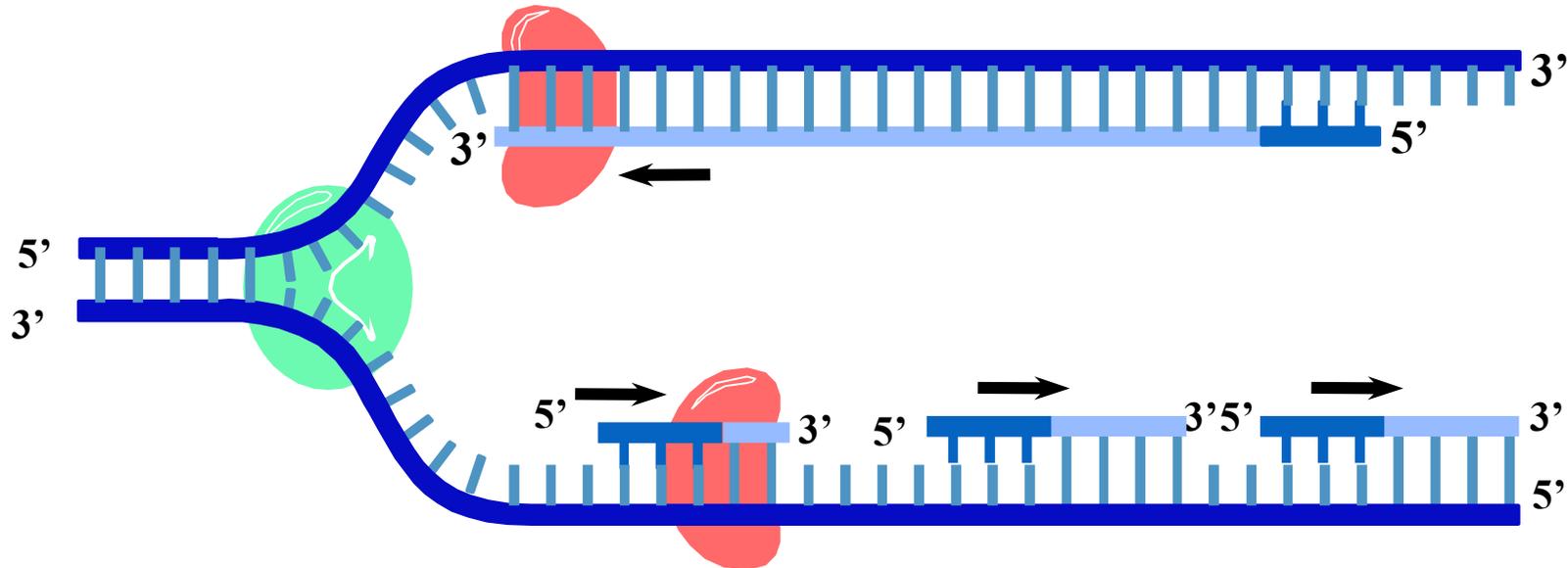
Replication



Leading strand synthesis continues in a 5' to 3' direction.

Discontinuous synthesis produces 5' to 3' DNA segments called Okazaki fragments.

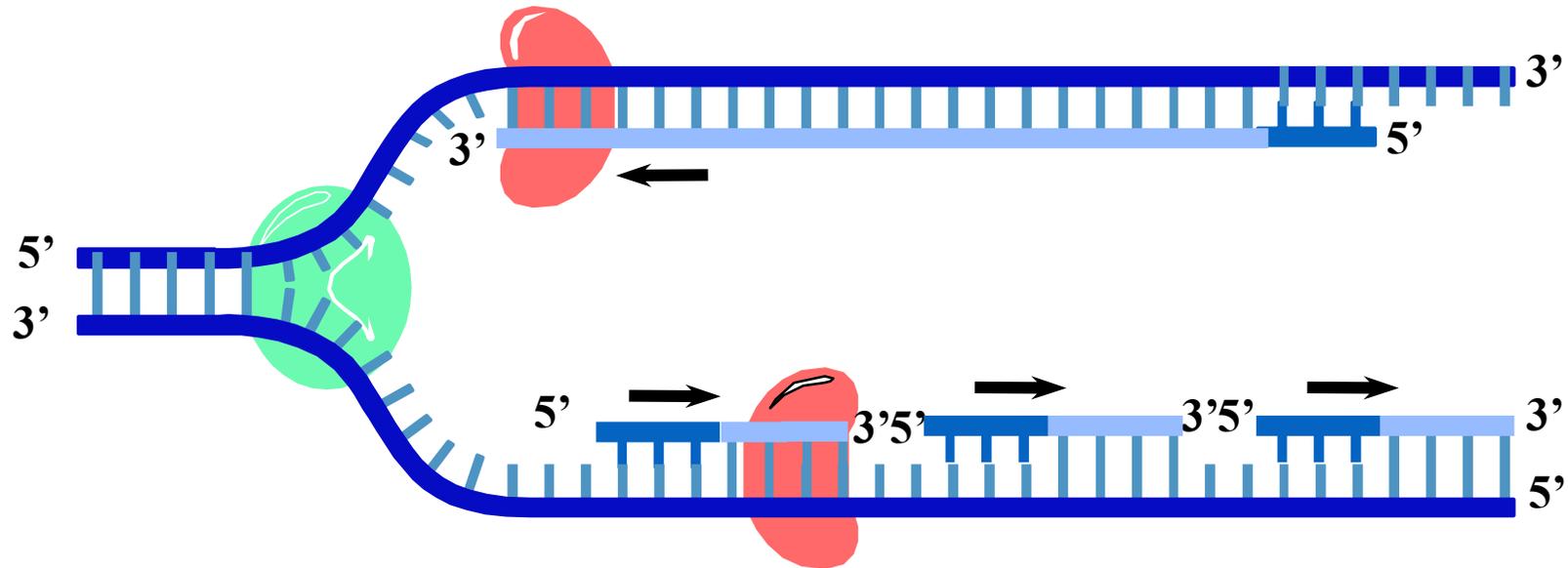
Replication



Leading strand synthesis continues in a 5' to 3' direction.

Discontinuous synthesis produces 5' to 3' DNA segments called Okazaki fragments.

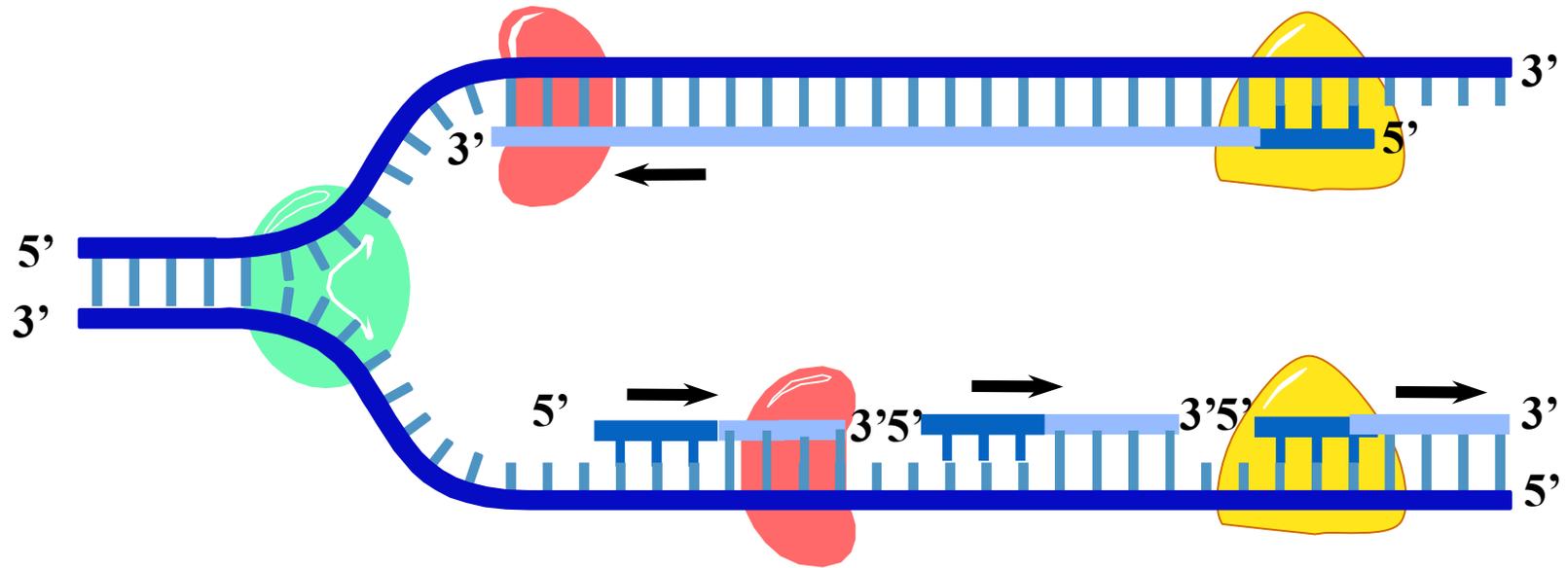
Replication



Leading strand synthesis continues in a 5' to 3' direction.

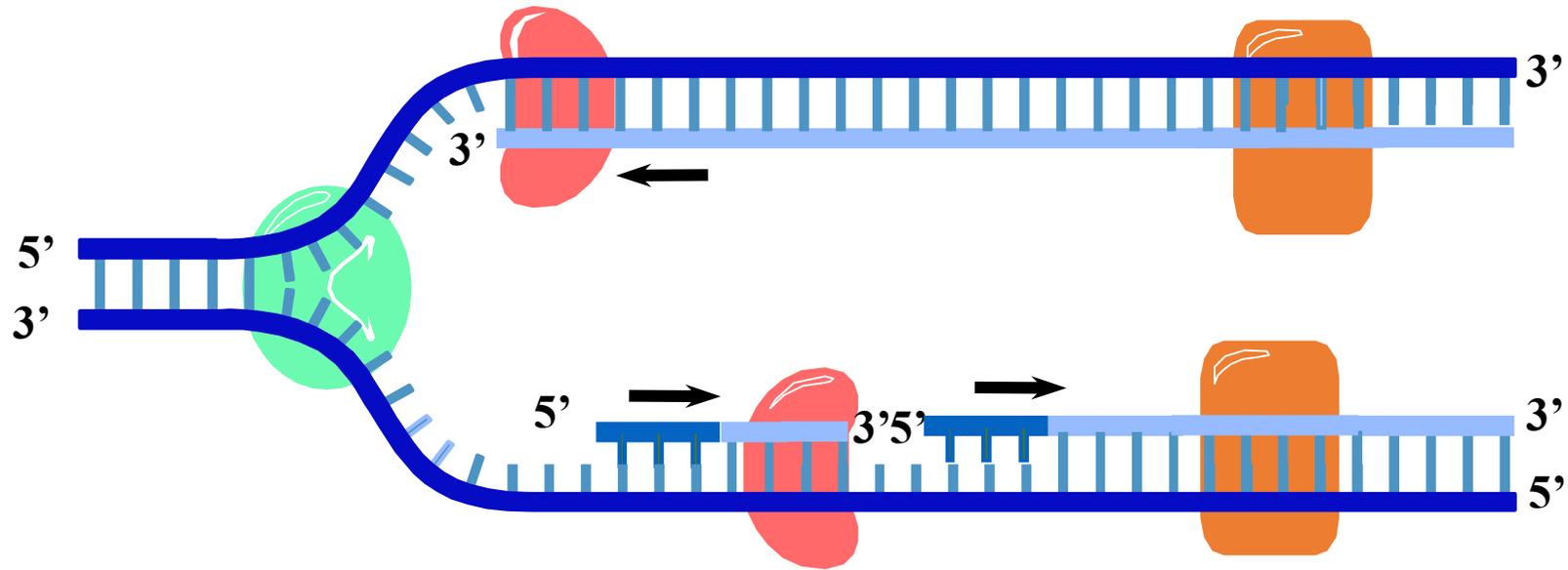
Discontinuous synthesis produces 5' to 3' DNA segments called Okazaki fragments.

Replication



RNA primers are removed.

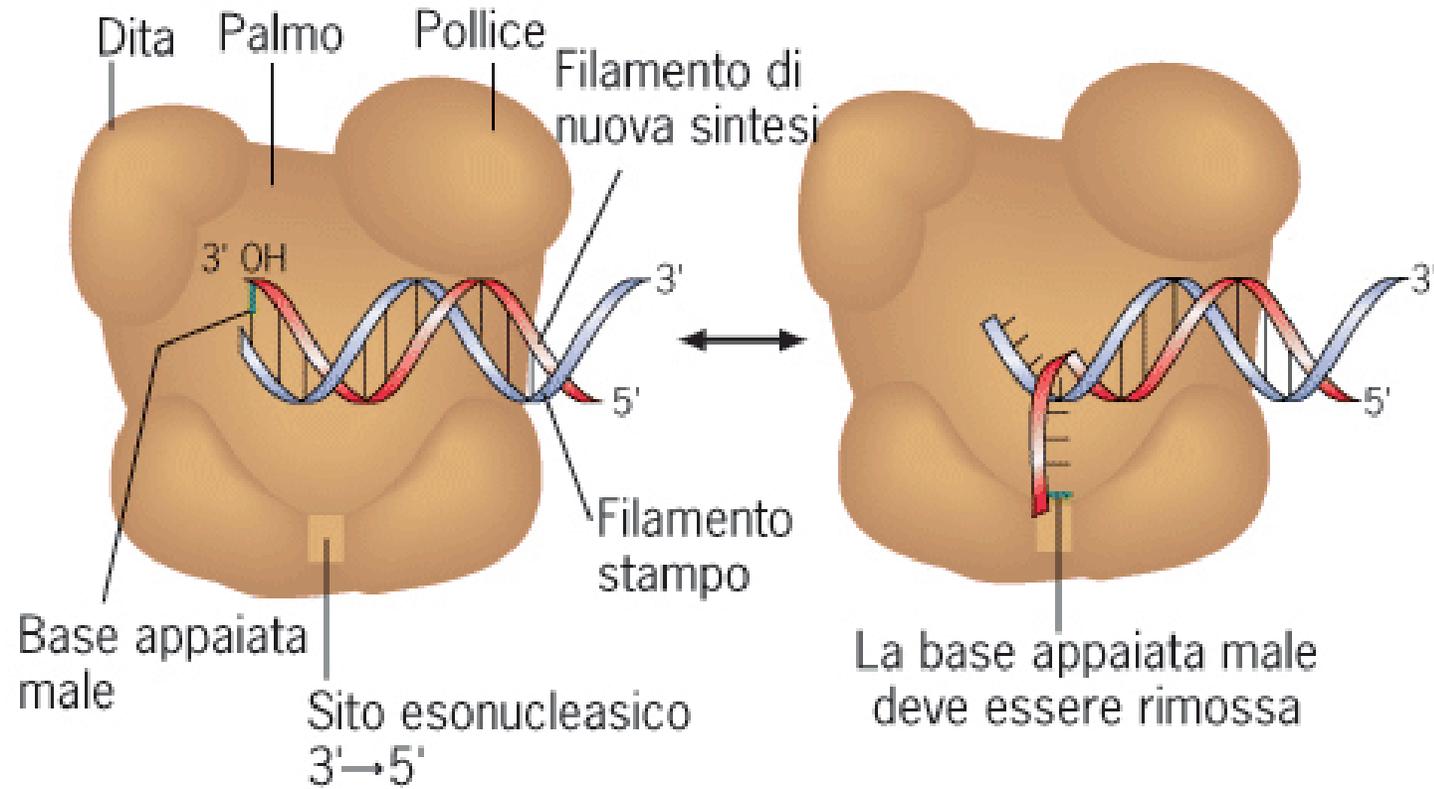
Replication



Polymerase activity of **DNA polymerase I** fills the gaps.
Ligase forms bonds between sugar-phosphate backbone.

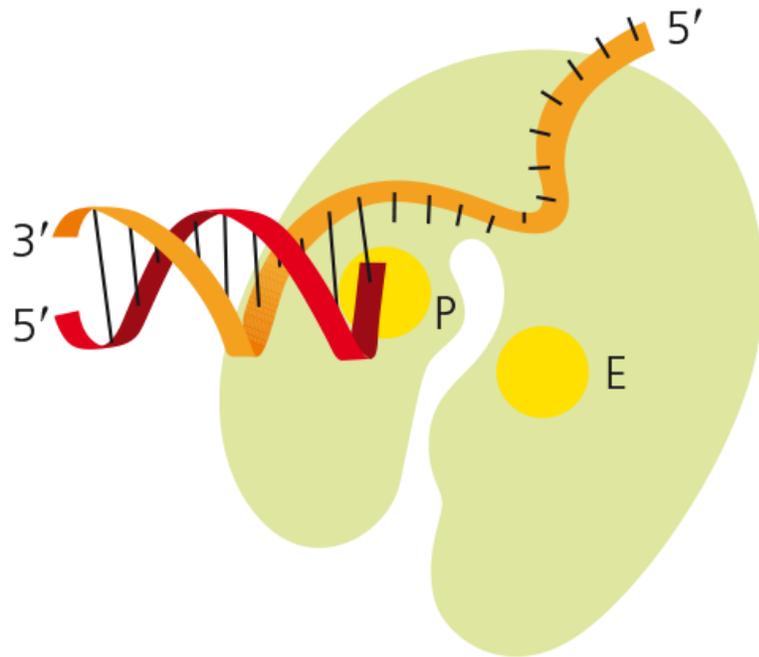
La DNA polimerasi

Attività di correzione di "bozze"

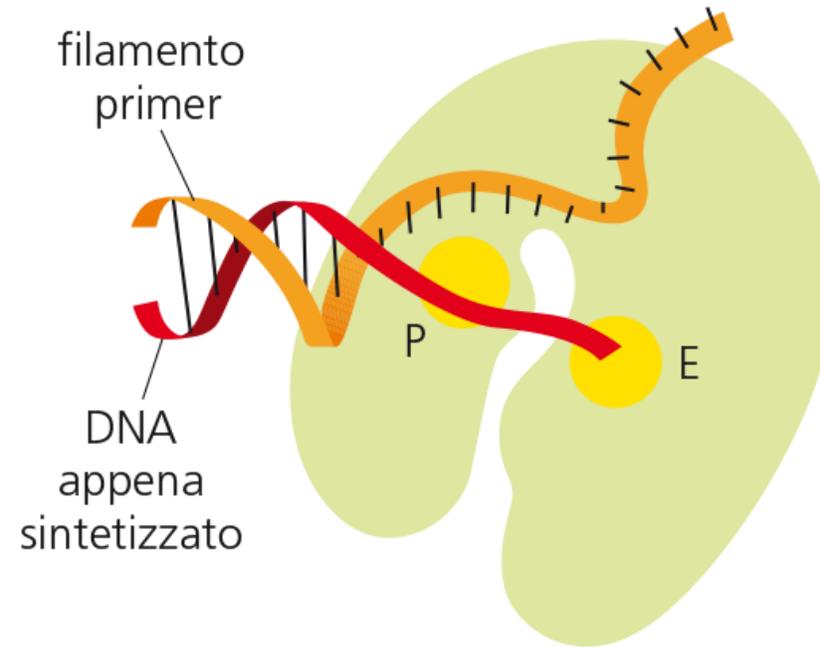


La DNA polimerasi

Attività di correzione di "bozze"
direzione 3'-OH, 5'-P



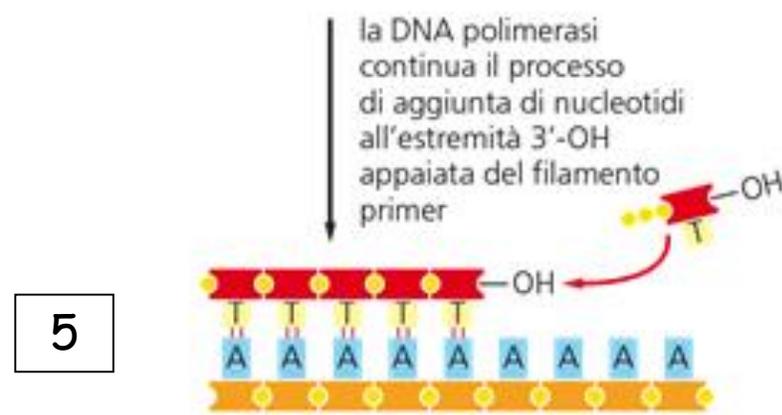
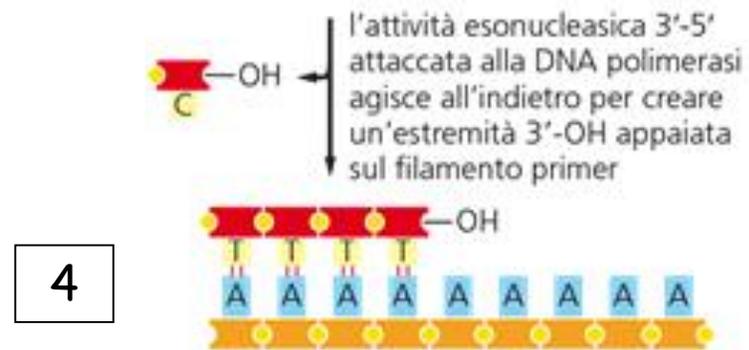
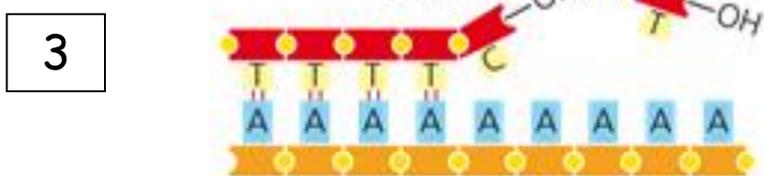
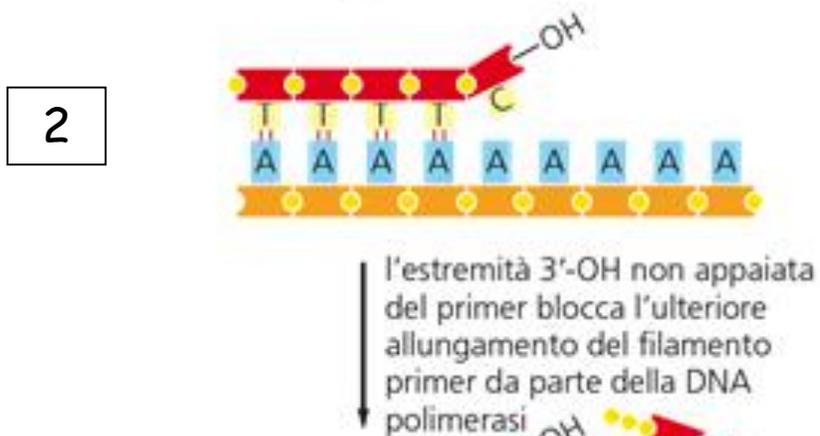
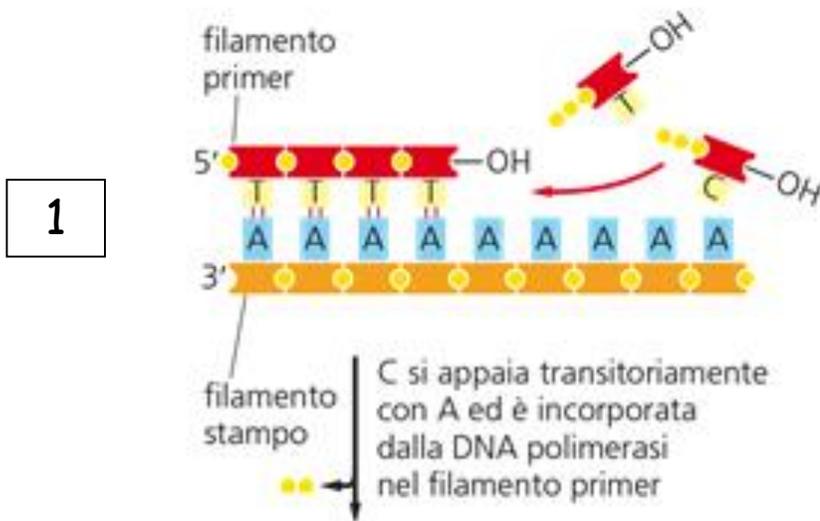
POLIMERIZZAZIONE



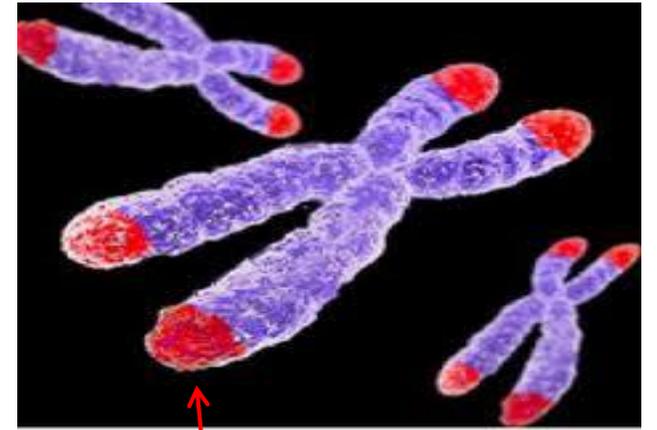
CORREZIONE

Il nucleotide corretto ha un'affinità maggiore di quello non corretto con la DNA polimerasi ed è favorito dal punto di vista energetico

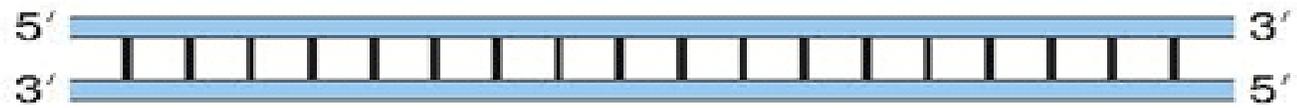
Correzione esonucleotidica delle "bozze" da parte della DNA polimerasi durante la replicazione del DNA



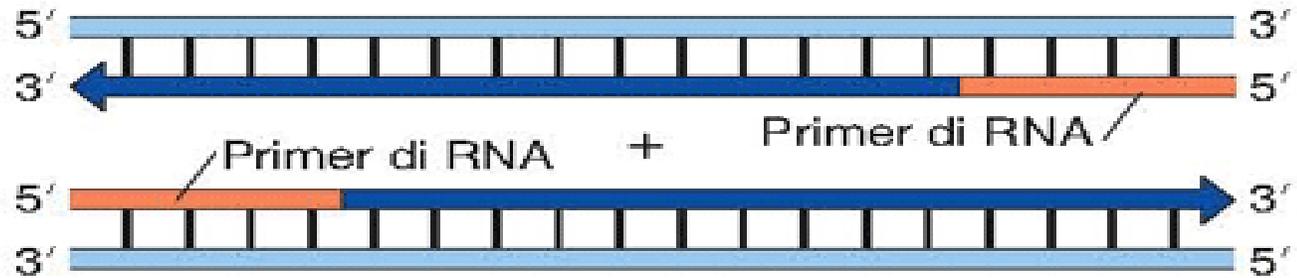
Eucarioti: il problema della replicazione dei telomeri. I telomeri sono le estremita' dei cromosomi costituite da sequenze non codificanti ripetute molte volte.



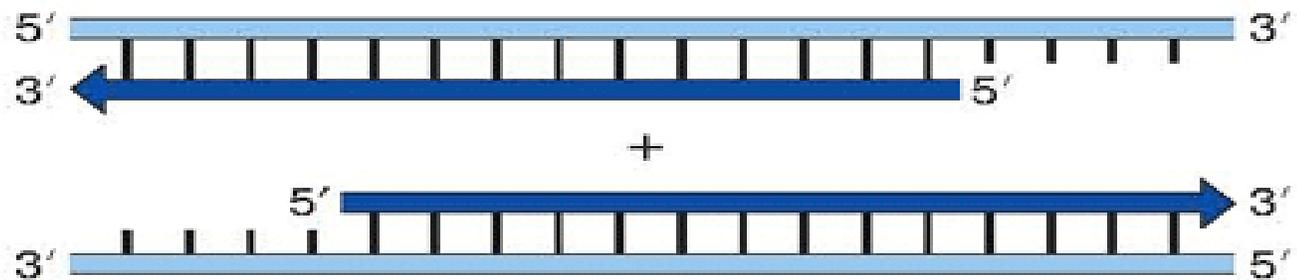
↑
telomero



↓ Replicazione del DNA



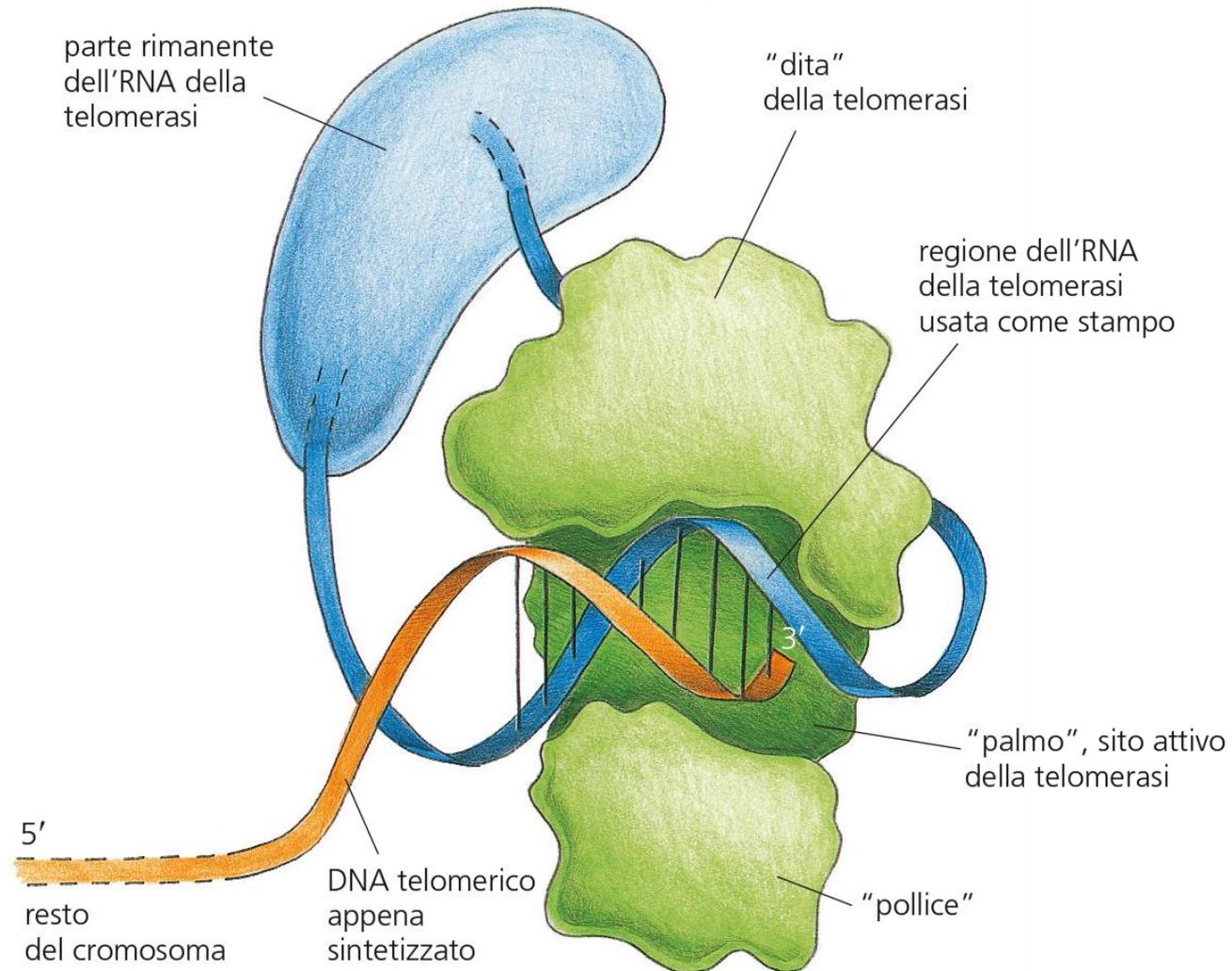
↓ Rimozione del primer



↑ Chi riempie la regione lasciata libera dal primer?

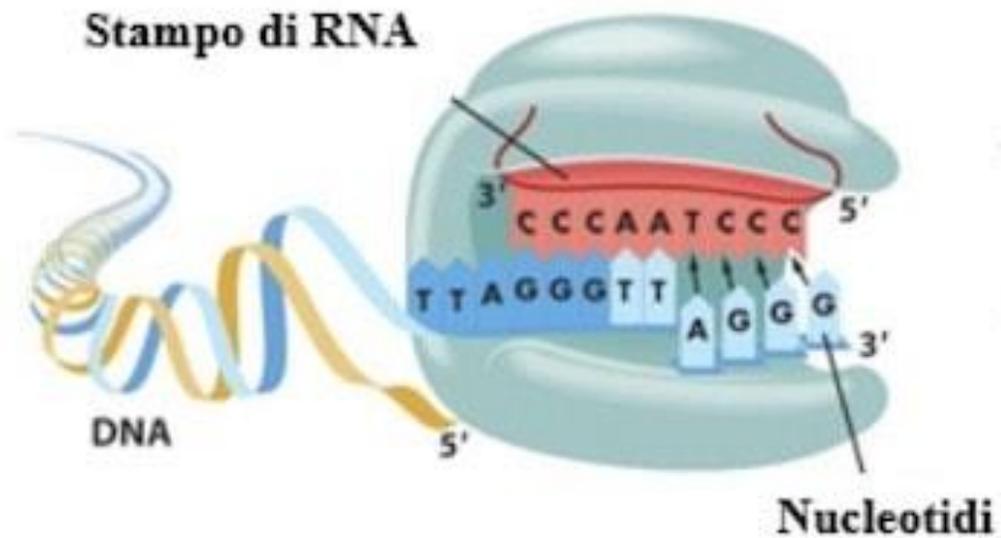
- 1 DNA despiralizzato di un cromosoma eucariotico prima della replicazione.
- 2 Quando avviene la replicazione del DNA, l'estremità 5' di ciascun filamento neosintetizzato contiene un breve segmento di RNA che ha funzionato da primer sul filamento lagging.
- 3 La rimozione del primer di RNA al 5' produce molecole di DNA con estremità 5' più corte rispetto al cromosoma di partenza, poiché non è possibile innescare la sintesi dell'ultimo segmento al 5'.

La duplicazione delle estremità dei cromosomi: l'attività della telomerasi



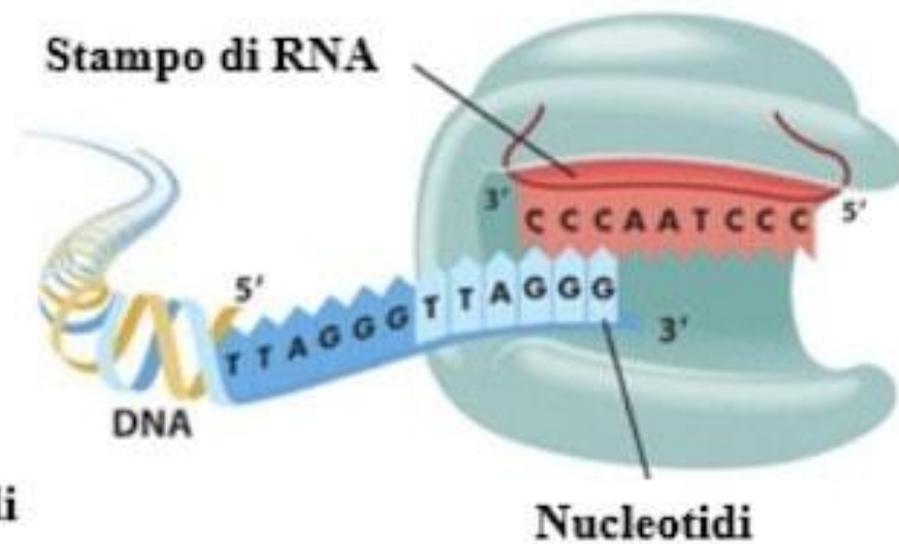
(a) Allungamento **Telomerasi**

Stampo di RNA

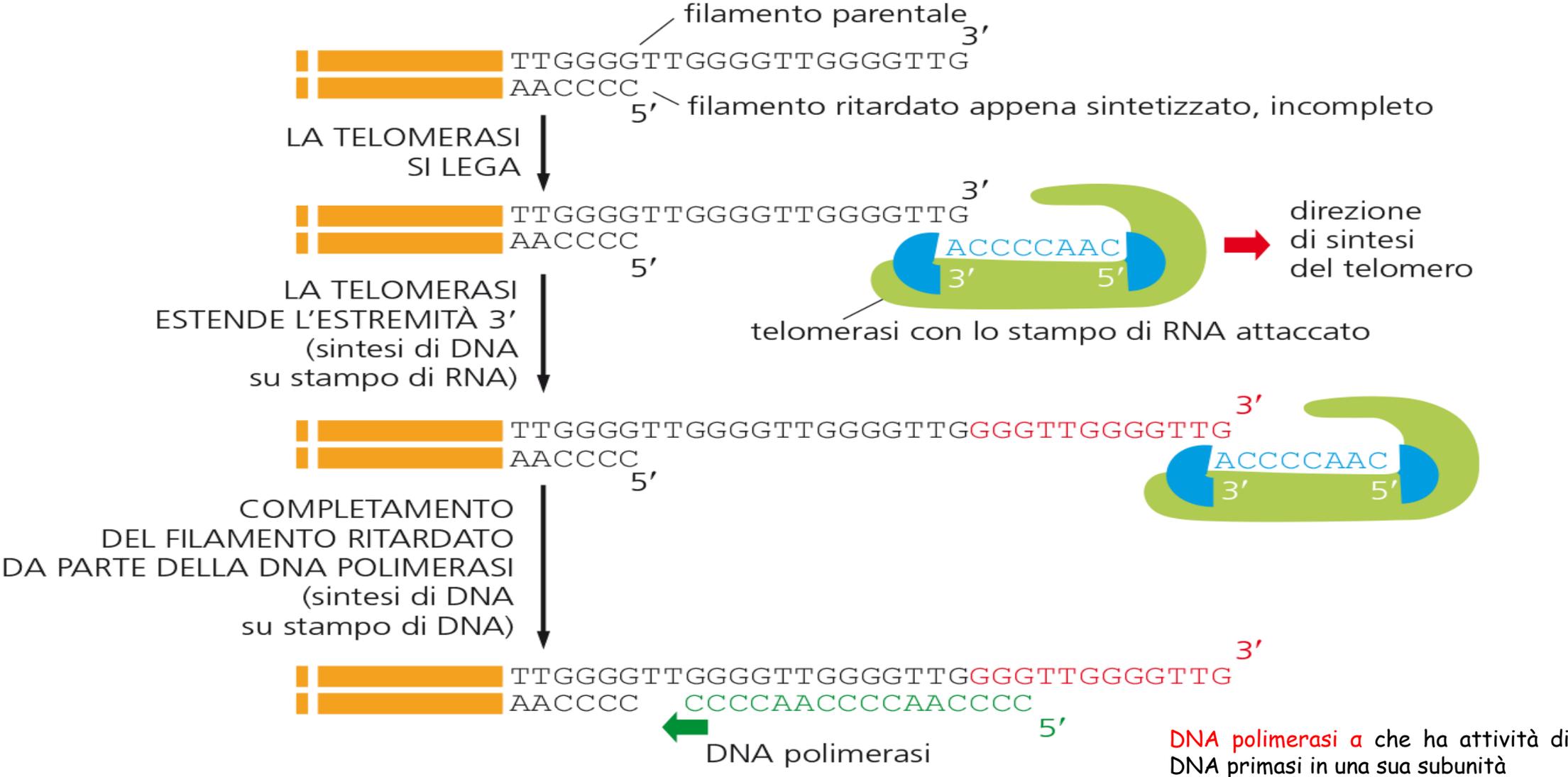


(b) Traslocazione **Telomerasi**

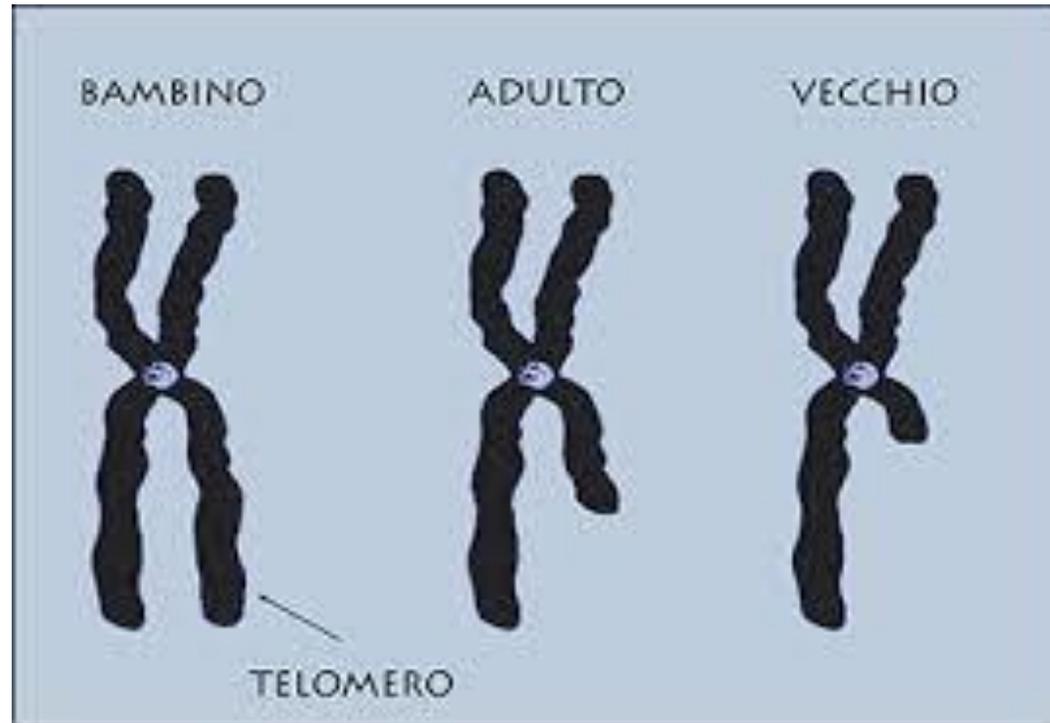
Stampo di RNA



La replicazione del telomero

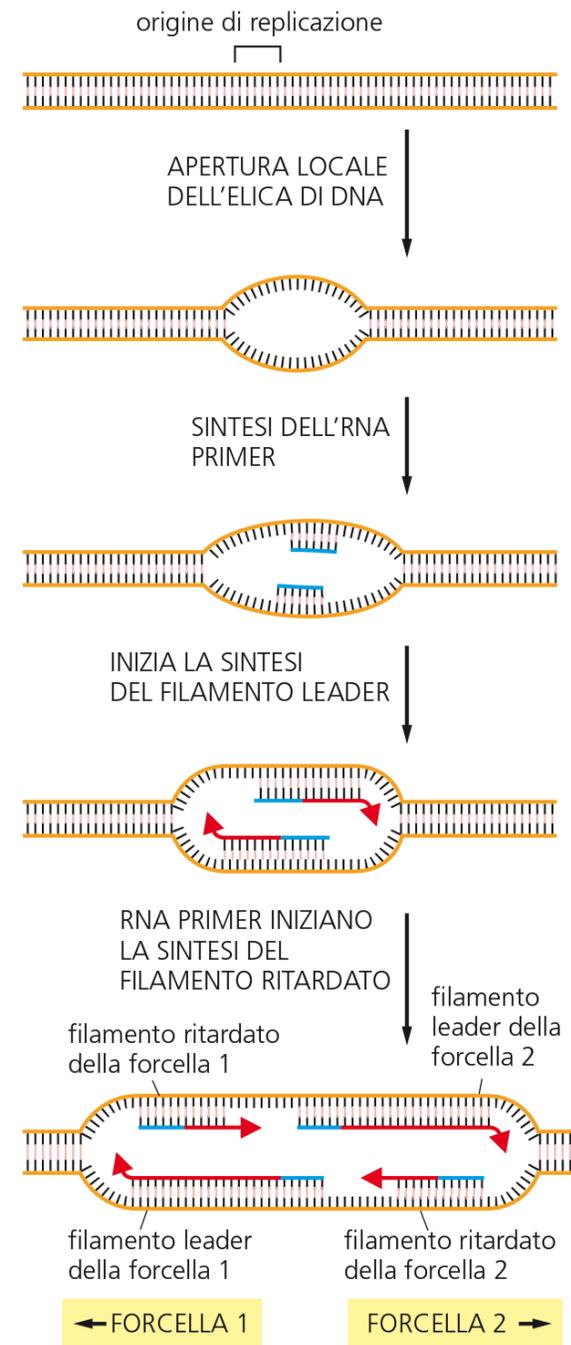


La duplicazione delle estremità dei cromosomi: l'attività della telomerasi

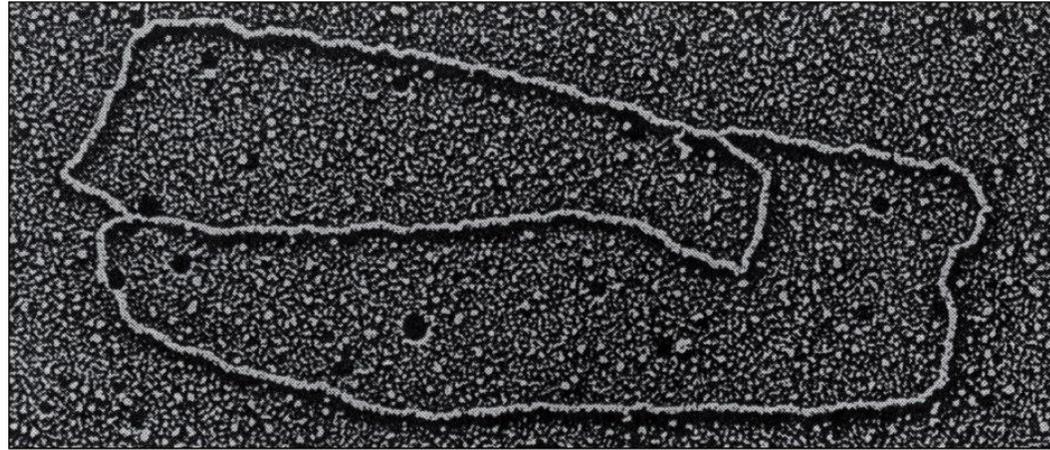


Se la telomerasi è
inattiva i telomeri si
accorciano

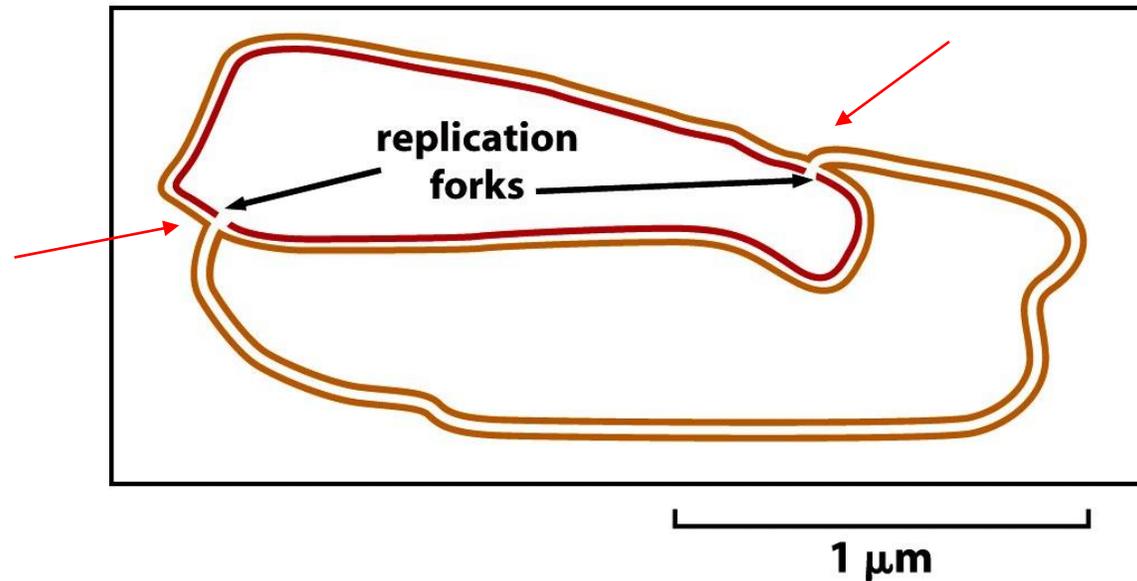
La sintesi del DNA inizia alle origini di replicazione



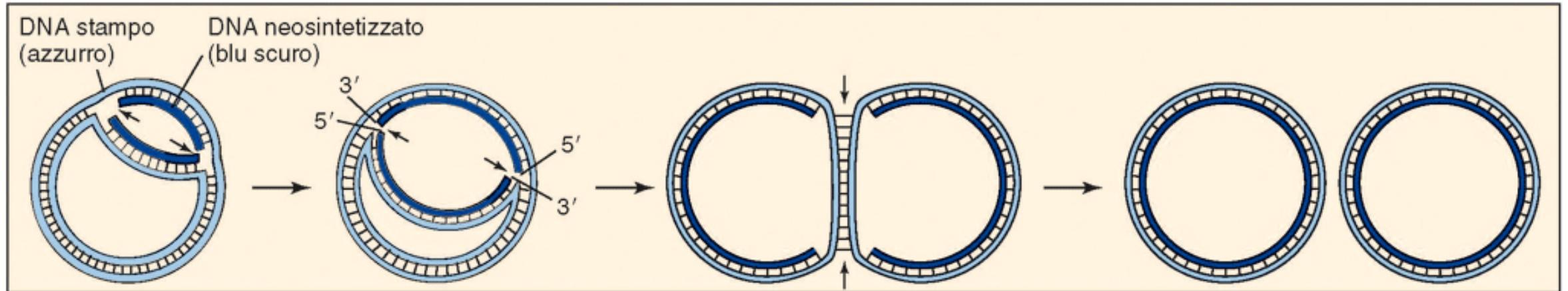
La sintesi del DNA comincia a livello della forcella di replicazione



Si forma una nuova
struttura a forma di Y

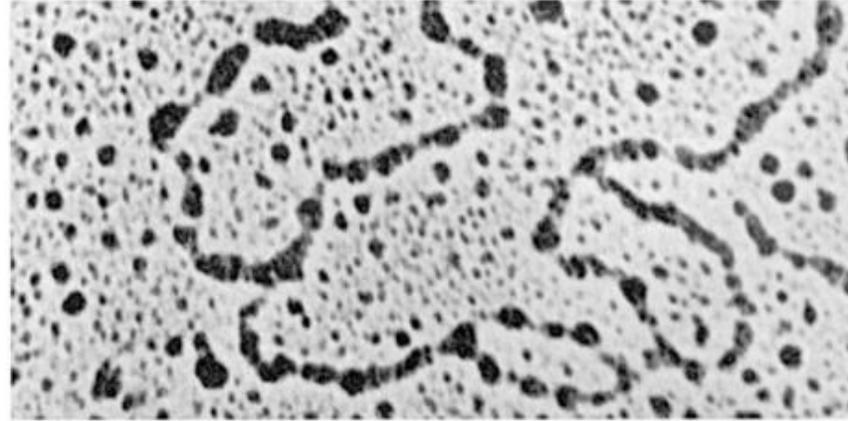
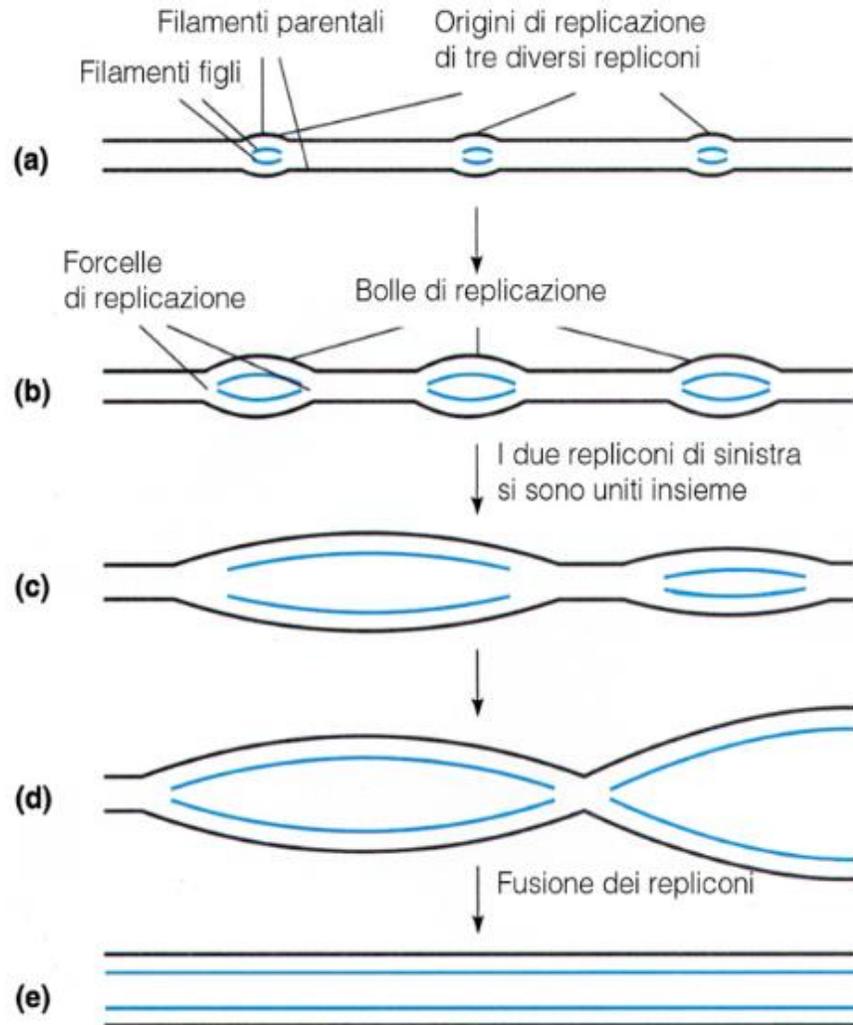


I cromosomi batterici hanno in genere una singola origine di replicazione del DNA



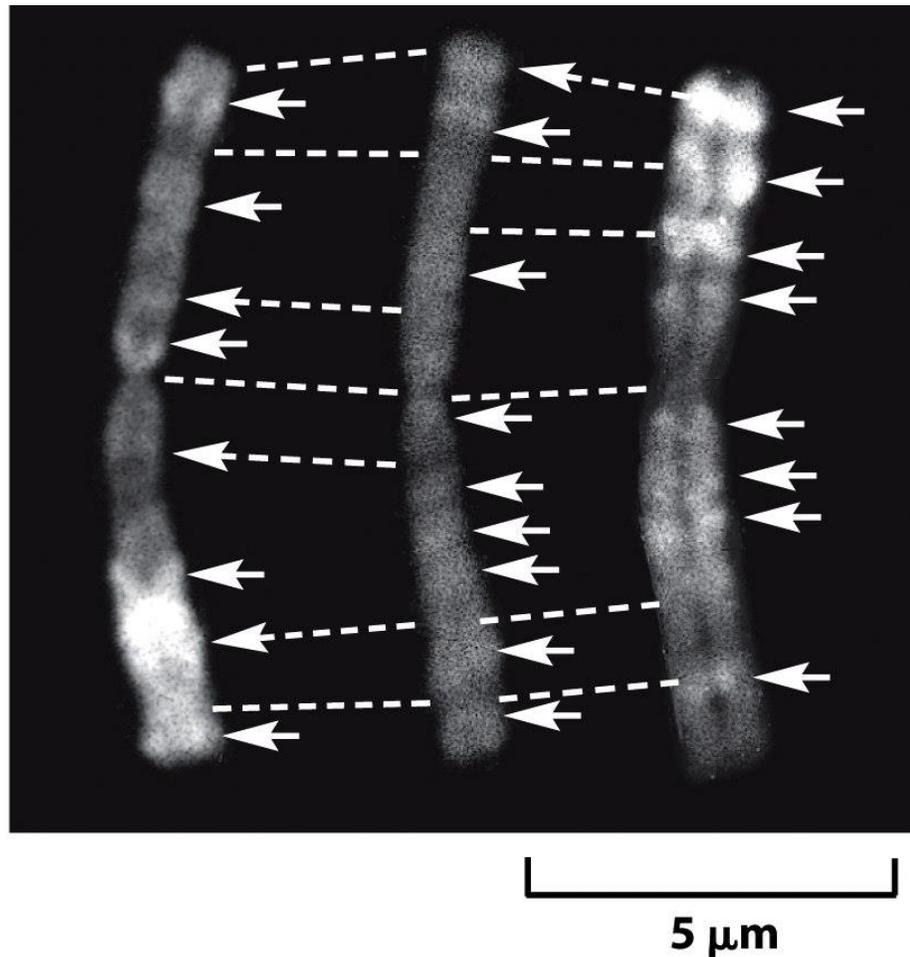
(a) Il cromosoma circolare di *E. coli* ha una unica origine di replicazione. La sintesi del DNA inizia in quel punto e procede in entrambe le direzioni, con la formazione di due forche di replicazione (*freccette nere*) che percorrono il cerchio ed infine si incontrano. DNA stampo (azzurro).

I cromosomi eucariotici contengono origini multiple di replicazione



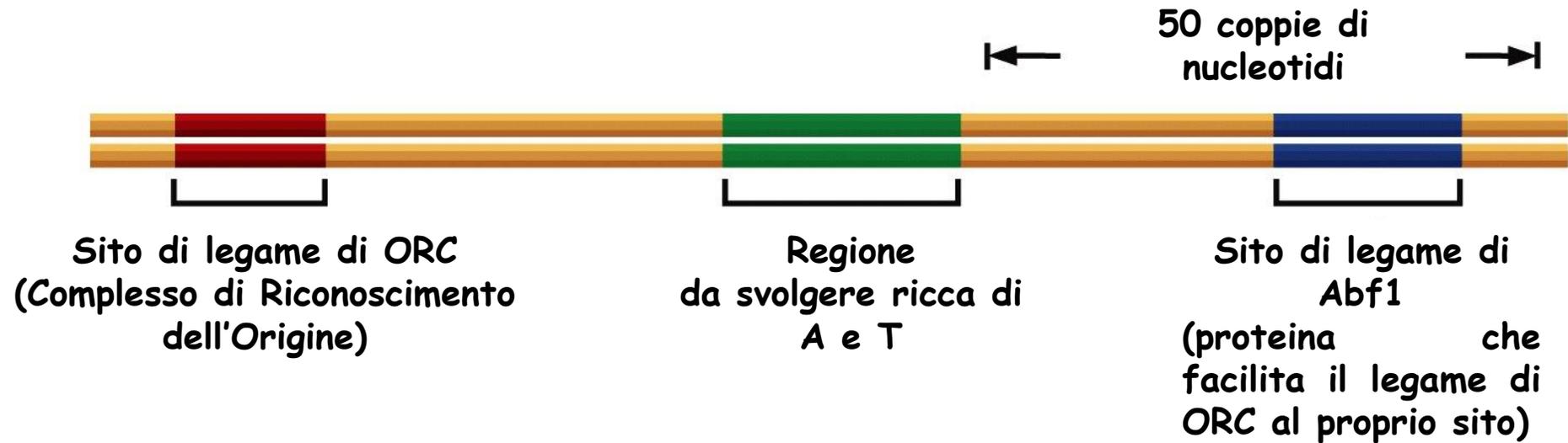
Regioni diverse dello stesso cromosoma si replicano in momenti distinti della fase S

iniziale intermedia tardiva
0-2 ore 3-5 ore 6-8 ore

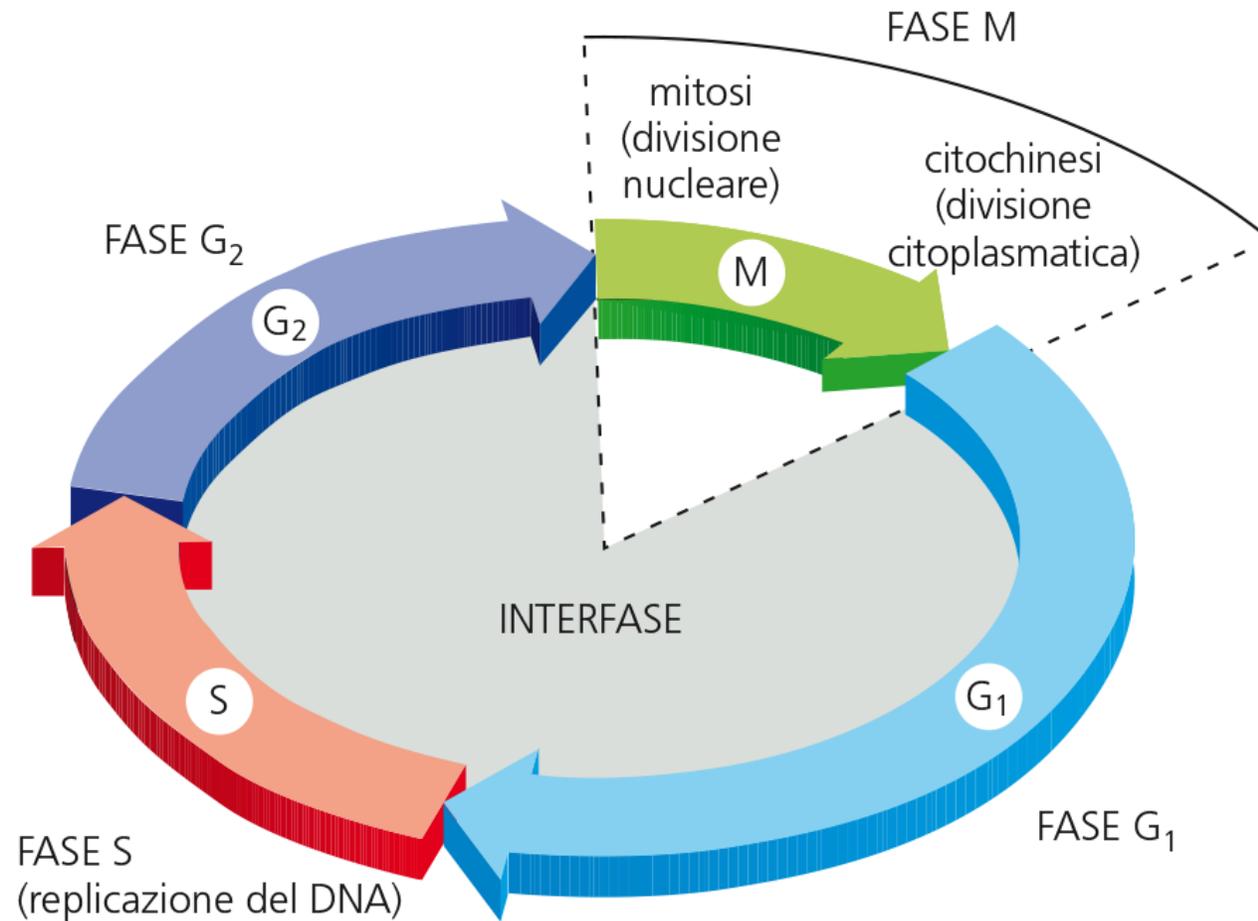


Le numerose origini di
replicazione non sono attivate
tutte contemporaneamente

Struttura del punto di origine di replicazione del DNA negli eucarioti



La replicazione del DNA avviene soltanto durante la fase S del ciclo cellulare

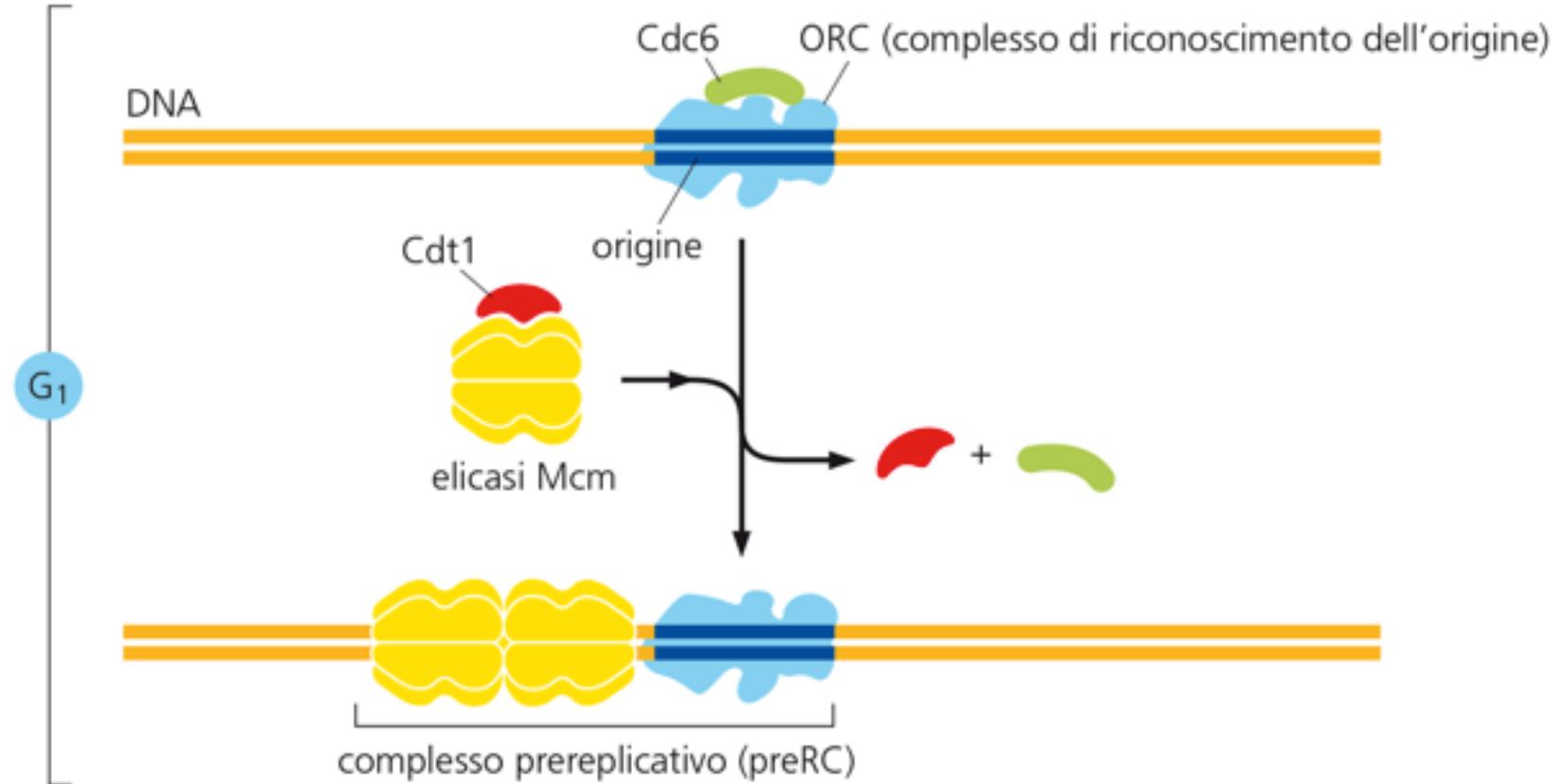


Il ciclo cellulare viene regolato da proteine chiamate **ciclina** che si associano con enzimi chiamati **cinasi-dipendenti dalle ciclina** (CDK). Formano un complesso enzimatico attivo che fosforila numerosi substrati.

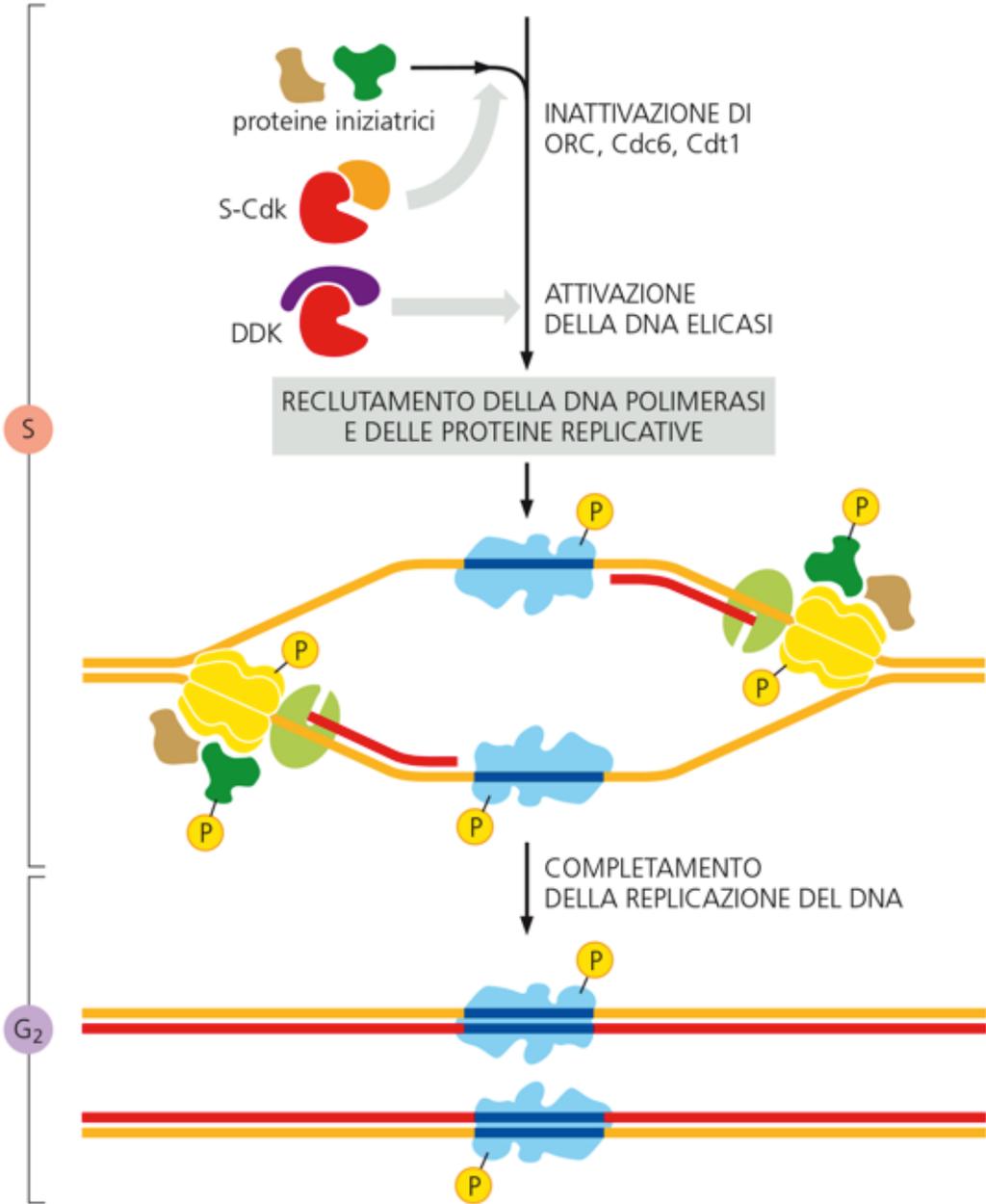


Meccanismo di inizio della replicazione del DNA negli eucarioti

Assicura che ciascuna origine di replicazione sia attivata una volta soltanto per ciclo cellulare

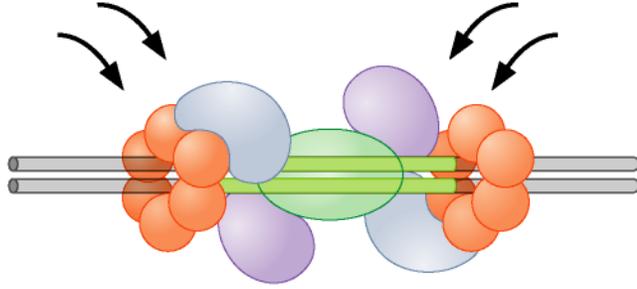


Meccanismo di inizio della replicazione del DNA negli eucarioti

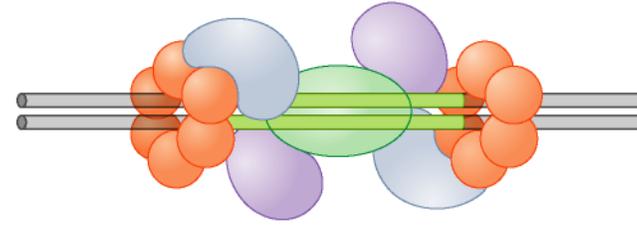


bassa attività
della Cdk

formazione del complesso pre-RC

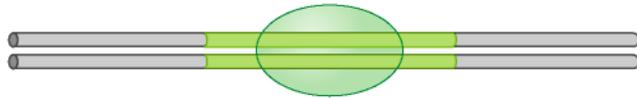


compleso pre-RC **non** attivo



alta attività della Cdk

formazione del complesso pre-RC inibita



attivazione del complesso pre-RC

