

AVVERTENZA

Il presente materiale didattico è messo a disposizione degli studenti per facilitare la comprensione degli argomenti trattati nel corso delle lezioni e lo studio individuale

Non sostituisce il libro di testo che rappresenta lo strumento fondamentale per lo studio della **Biochimica generale e molecolare**

Le immagini utilizzate sono tratte dal libro di testo consigliato e da quelli da consultare indicati nelle diapositive 3-7 del file
INTRODUZIONE

Replicazione



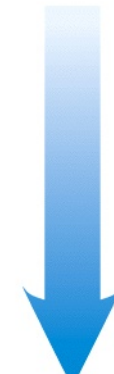
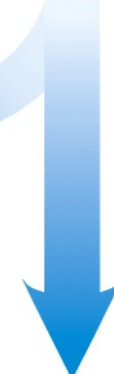
DNA

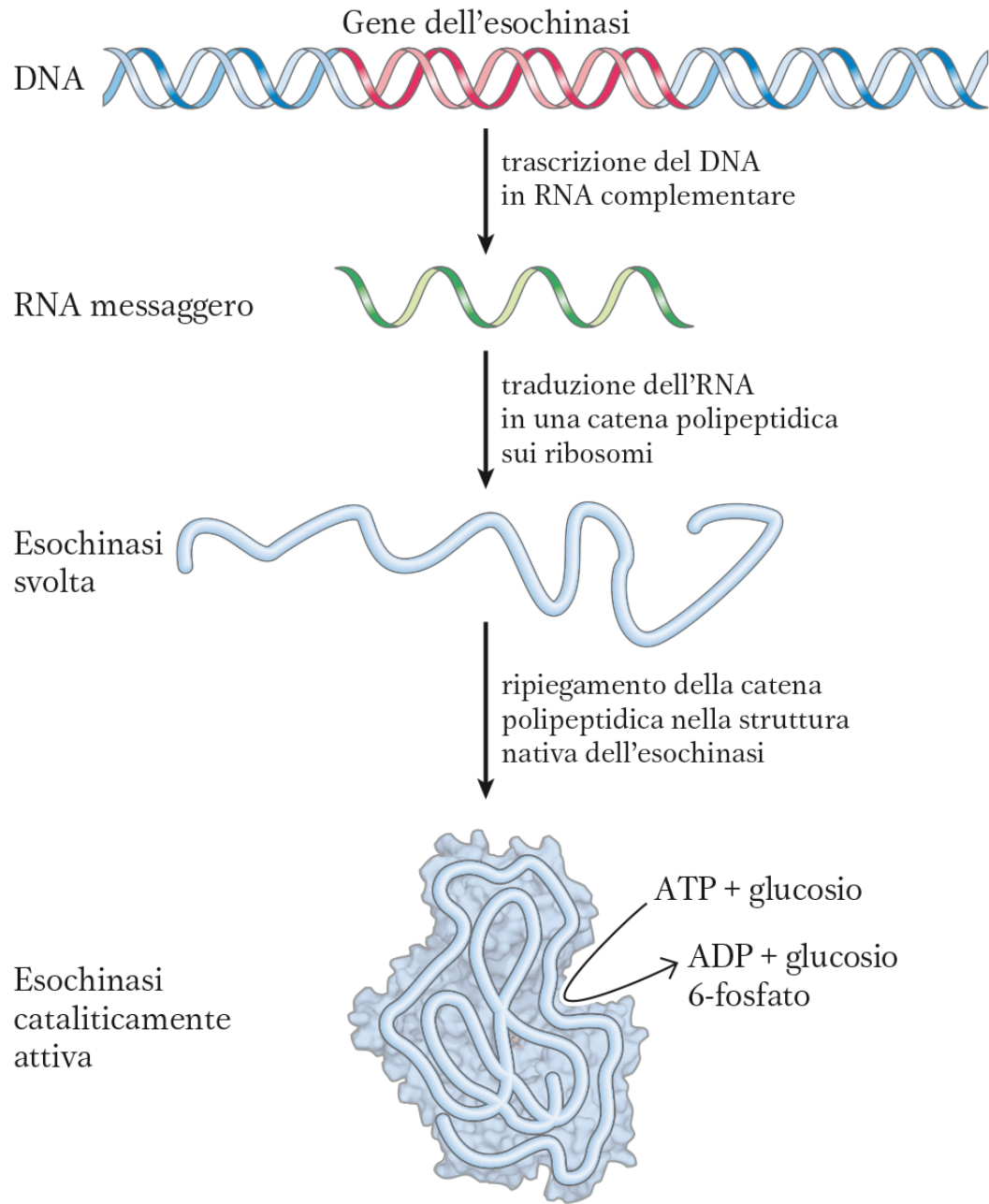
Trascrizione

RNA

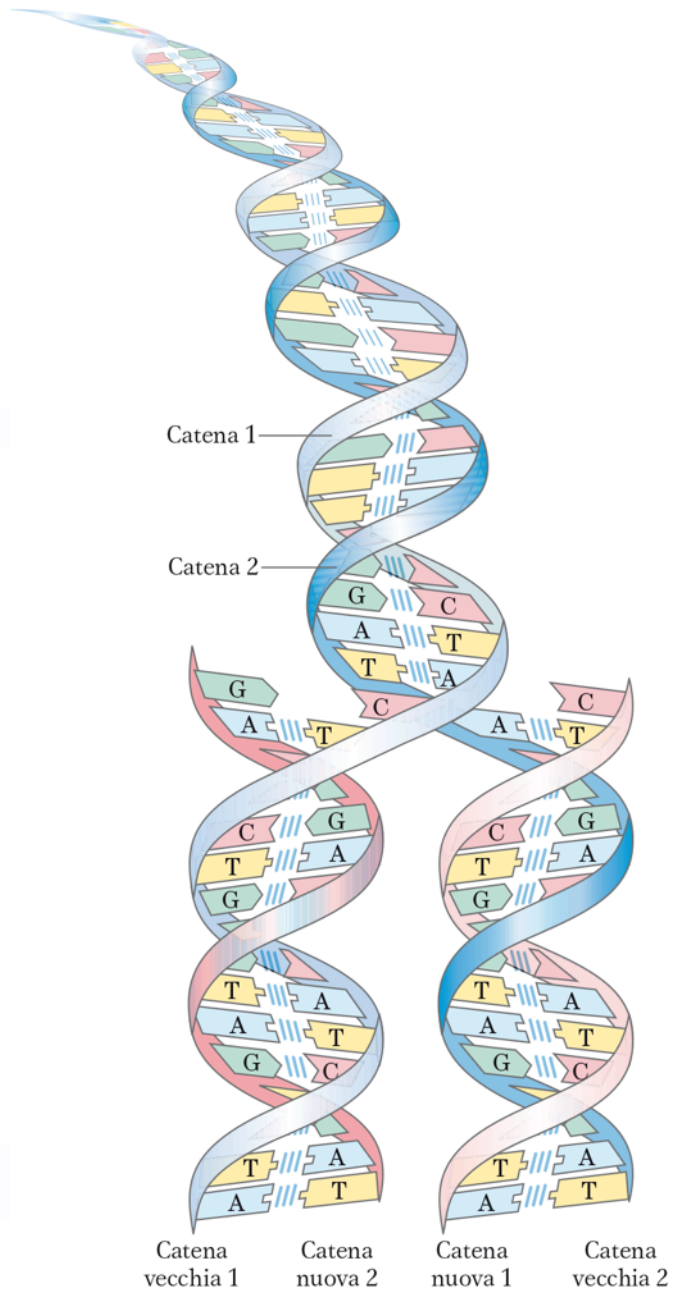
Traduzione

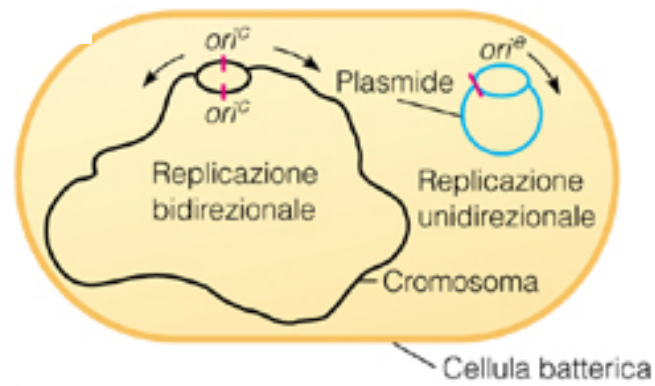
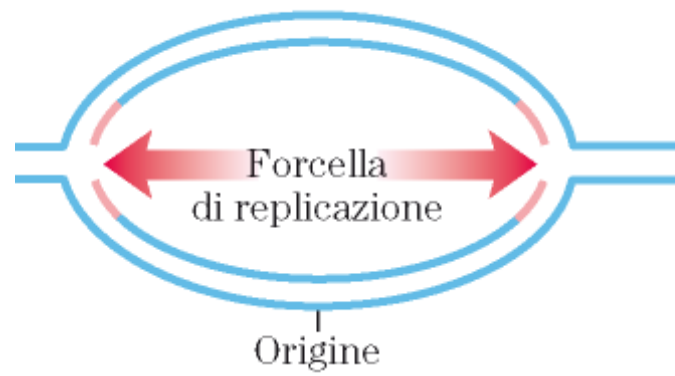
Proteina





Replicazione semiconservativa

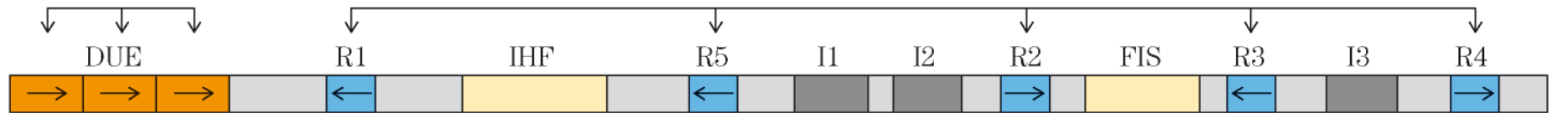




OriC

Disposizione in fila di tre
sequenze di 13 bp;
sequenza consenso
GATCTNTTNTTTT

Siti di legame della proteina DnaA,
cinque sequenze di 9 bp;
sequenza consenso
TT(A/T)TNCACC

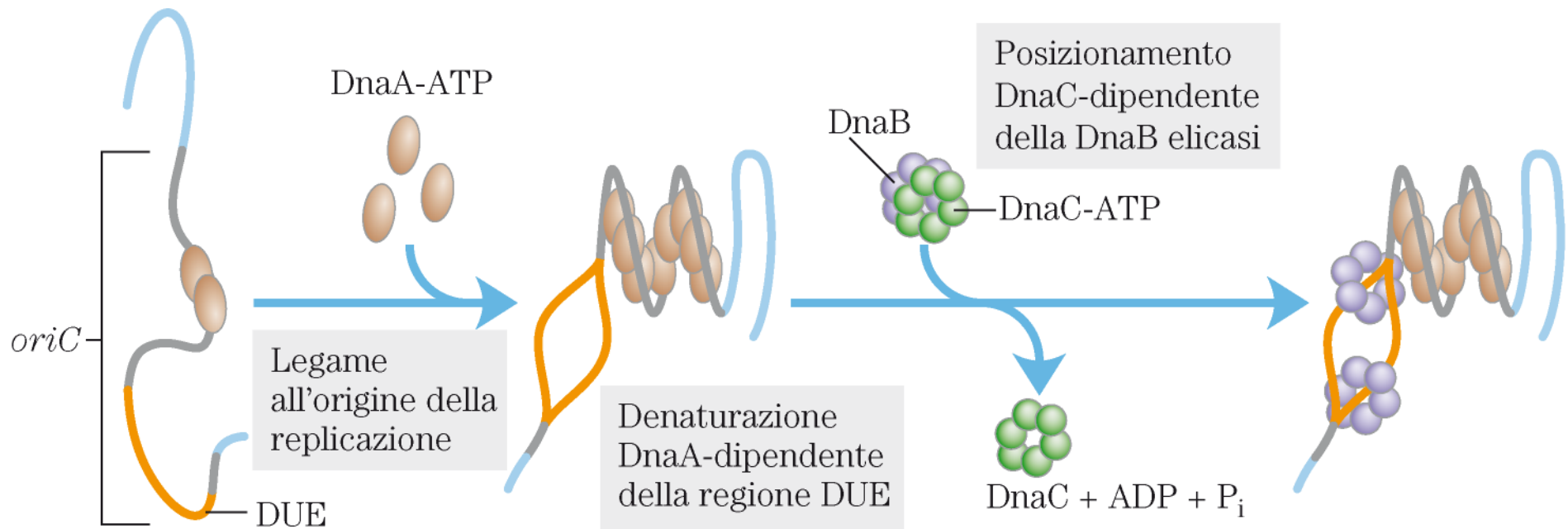


245 coppie di basi

Il DNA dell' OriC è metilato dalla Dam metilasi che metila l' N⁶
dell' adenina della sequenza palindroma 5' GATC (circa 11)

Fase d' inizio della replicazione

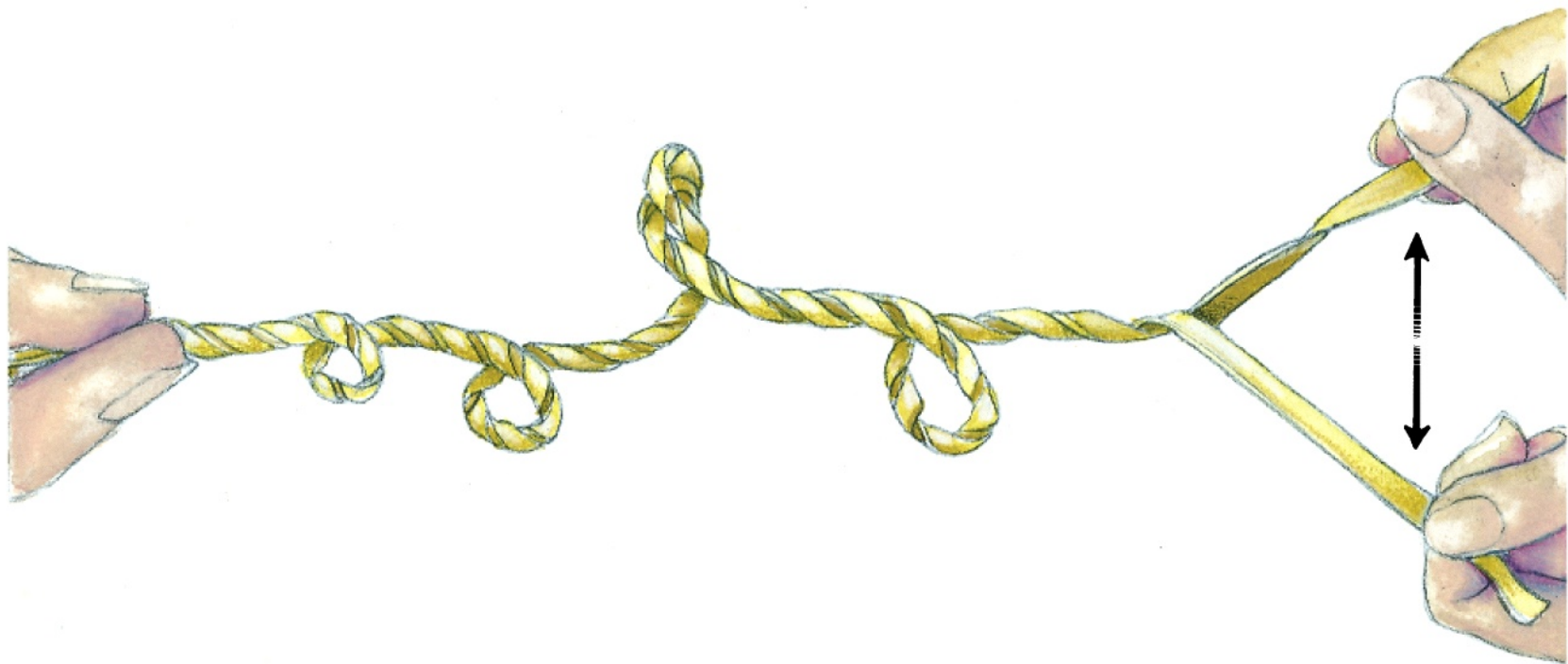
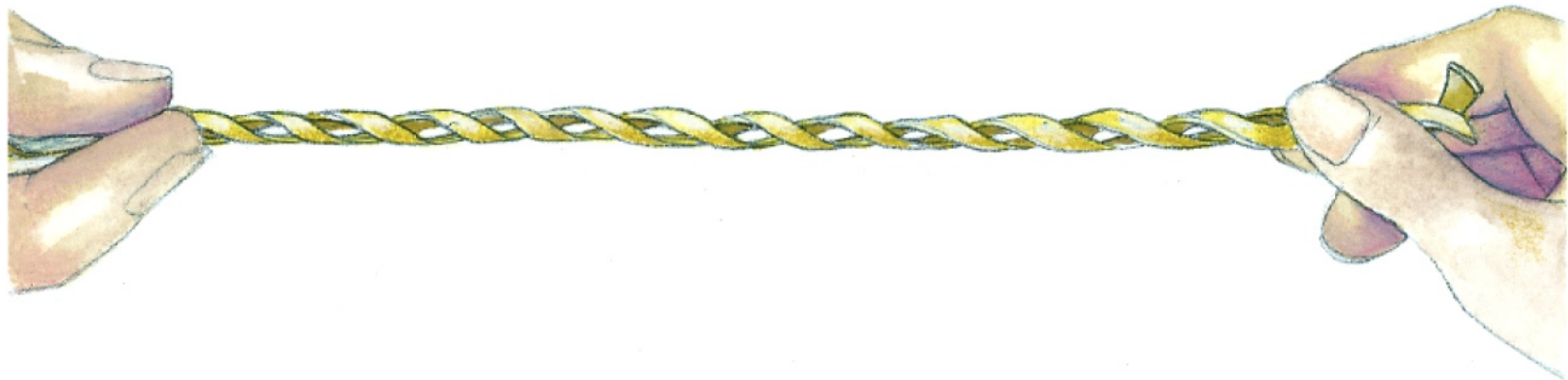
Alla fase d'inizio della replicazione partecipano almeno 10 differenti tipi di enzimi



- DnaA proteina della famiglia AAA + ATPasi (ATPasi associate a diverse attività), 8 molecole si legano ai siti R e il DNA si avvolge intorno
- DnaC proteina della famiglia AAA + ATPasi
- DnaB (elicasi)

La replicazione del DNA richiede numerosi enzimi e fattori proteici (più di 20) che nell'insieme costituiscono il sistema della DNA replicasi o REPLISOMA tra cui:

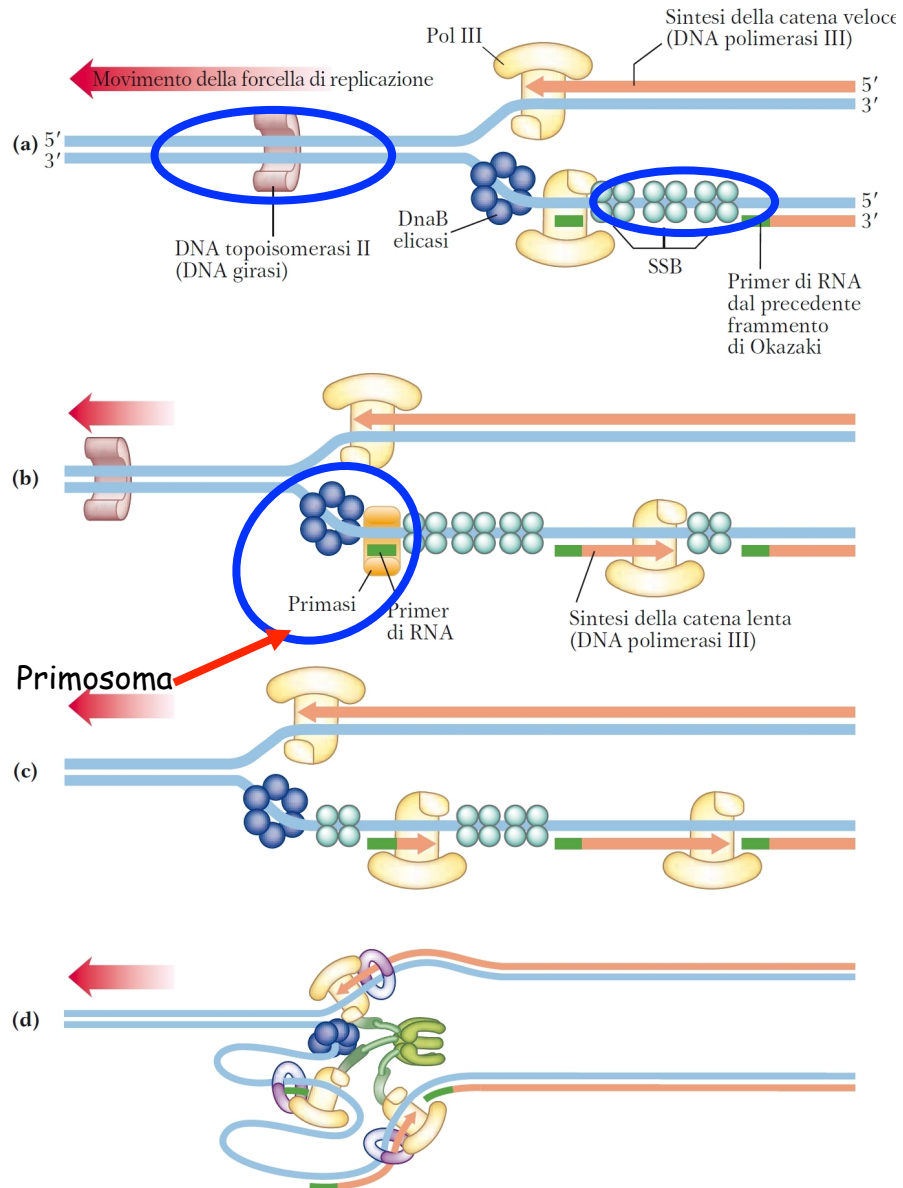
- Elicasi (DnaB): costituente del primosoma, disavvolge il DNA
- SSB: legano il DNA a filamento singolo
- Topoisomerasi (girasi): elimina i superavvolgimenti
- Primasi (DnaG): costituente del primosoma, sintetizza il primer di RNA
- DNA polimerasi III: allunga i nuovi filamenti
- DNA polimerasi I: elimina e sostituisce il primer
- DNA ligasi: sigilla l'interruzione

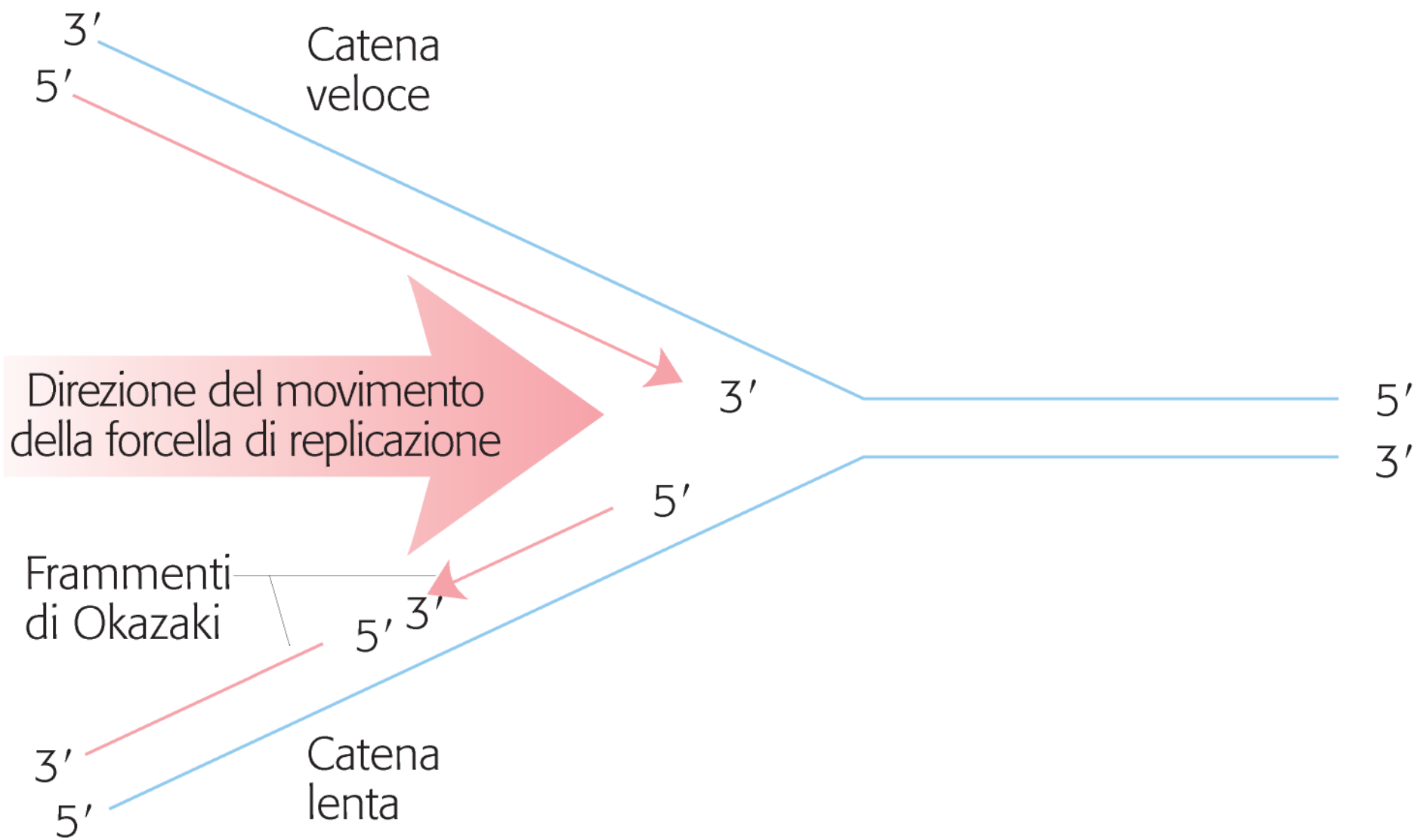


La replicazione del DNA richiede numerosi enzimi e fattori proteici (più di 20) che nell'insieme costituiscono il sistema della DNA replicasi o REPLISOMA tra cui:

- Elicasi (DnaB): costituente del primosoma, disavvolge il DNA
- Primasi (DnaG): costituente del primosoma, sintetizza il primer di RNA
- Topoisomerasi (girasi): elimina i superavvolgimenti
- SSB: legano il DNA a filamento singolo
- DNA polimerasi III: allunga i nuovi filamenti
- DNA polimerasi I: elimina e sostituisce il primer
- DNA ligasi: sigilla l'interruzione

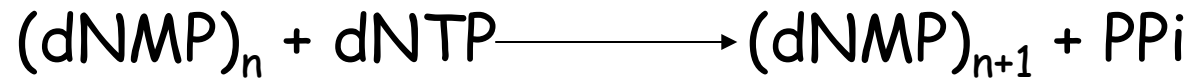
Fase d' allungamento





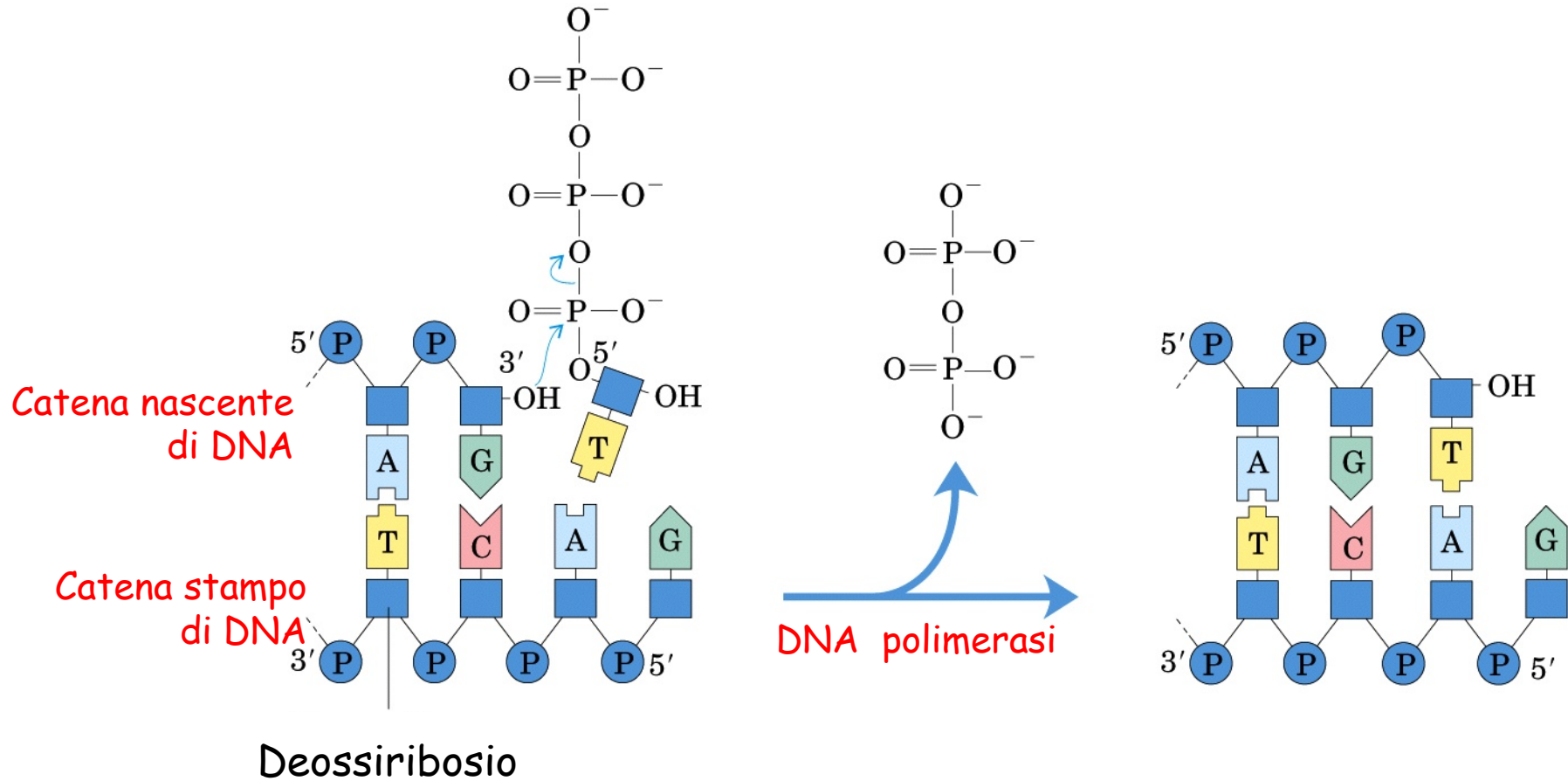
La replicazione del DNA richiede numerosi enzimi e fattori proteici (più di 20) che nell'insieme costituiscono il sistema della DNA replicasi o REPLISOMA tra cui:

- Elicasi (DnaB): costituente del primosoma, disavvolge il DNA
- SSB: legano il DNA a filamento singolo
- Topoisomerasi (girasi): elimina i superavvolgimenti
- Primasi (DnaG): costituente del primosoma, sintetizza il primer (10-60 ribonucleotidi) di RNA
- DNA polimerasi III: allunga i nuovi filamenti
- DNA polimerasi I: elimina e sostituisce il primer
- DNA ligasi: sigilla l'interruzione

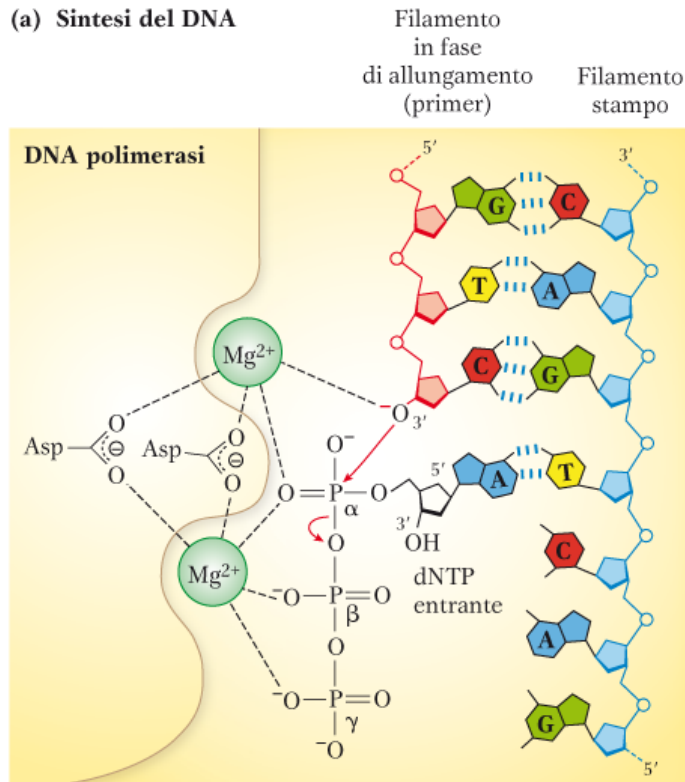


DNA

DNA allungato di
un nucleotide

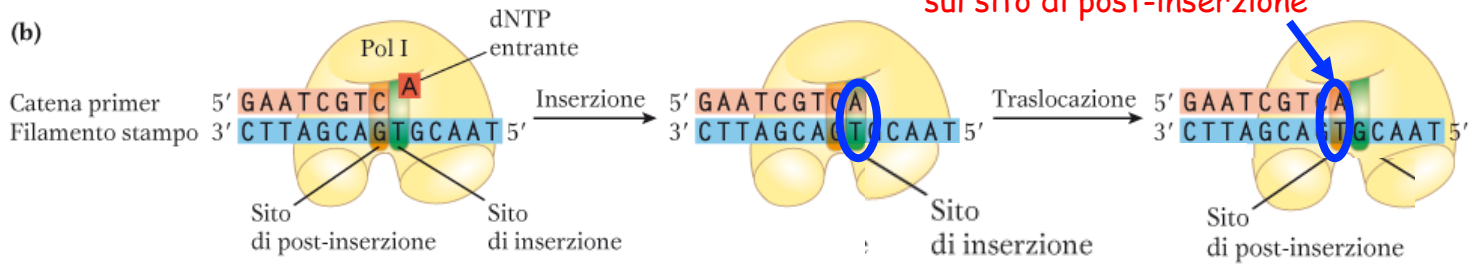


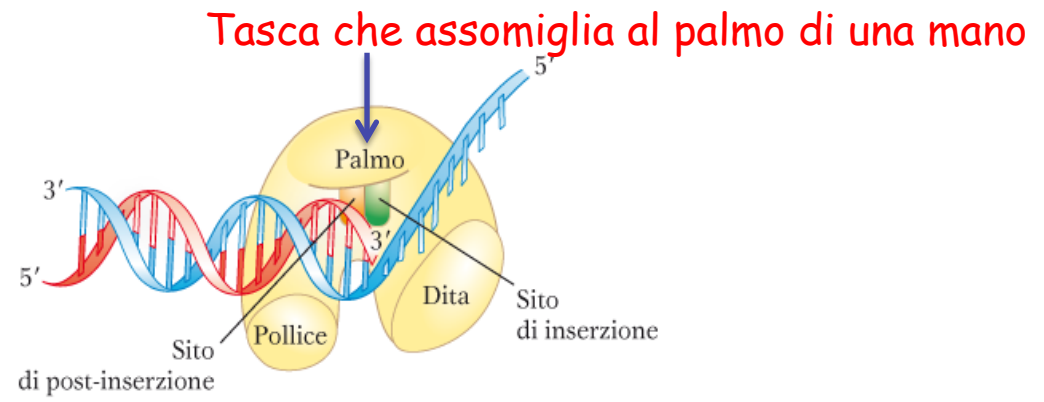
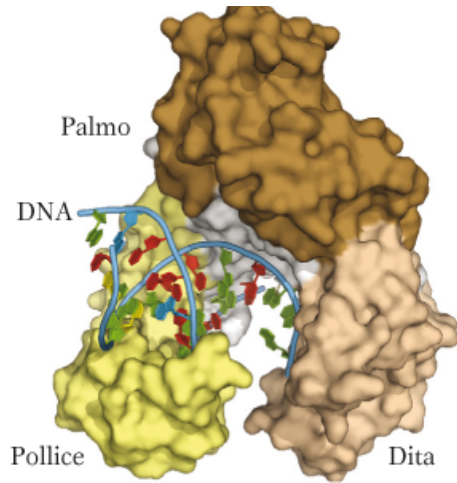
(a) Sintesi del DNA



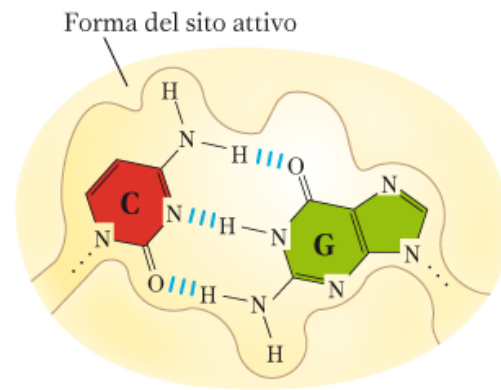
dopo che si è formato il legame fosfodiesterico la polimerasi scivola in avanti sulla molecola di DNA e la nuova coppia formata è posizionata sul sito di post-inserzione

(b)

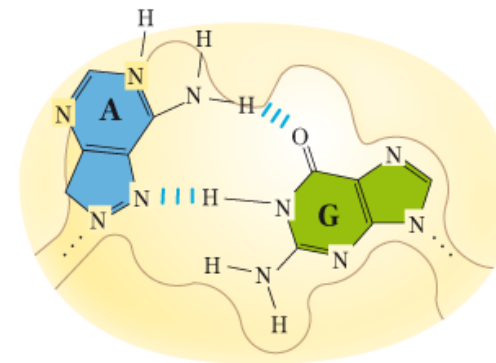
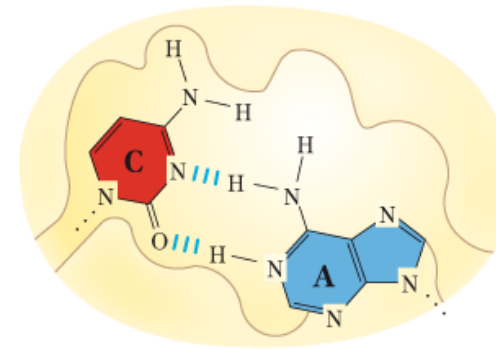
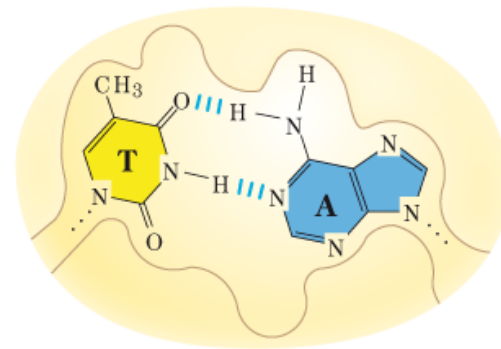
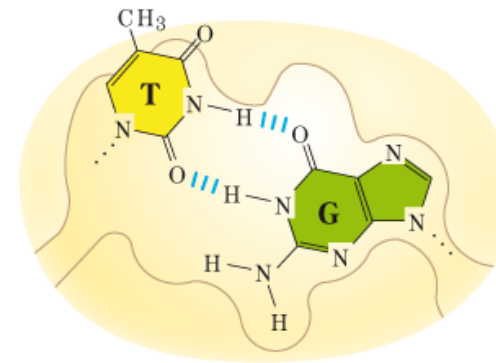


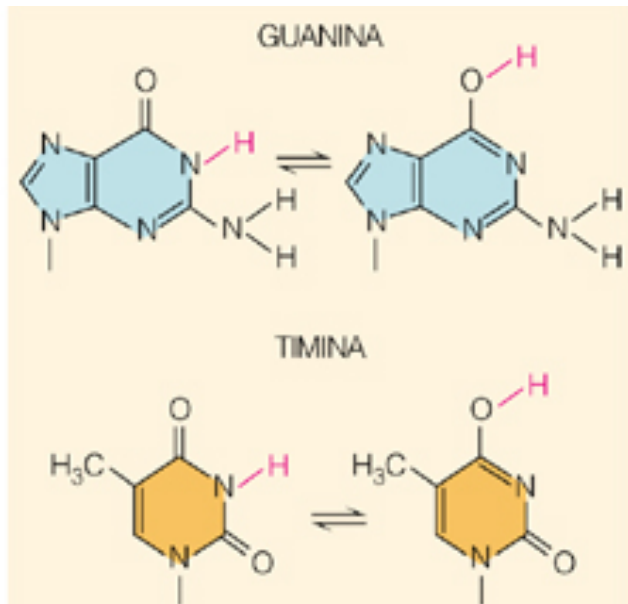


(a) Coppie di basi corrette



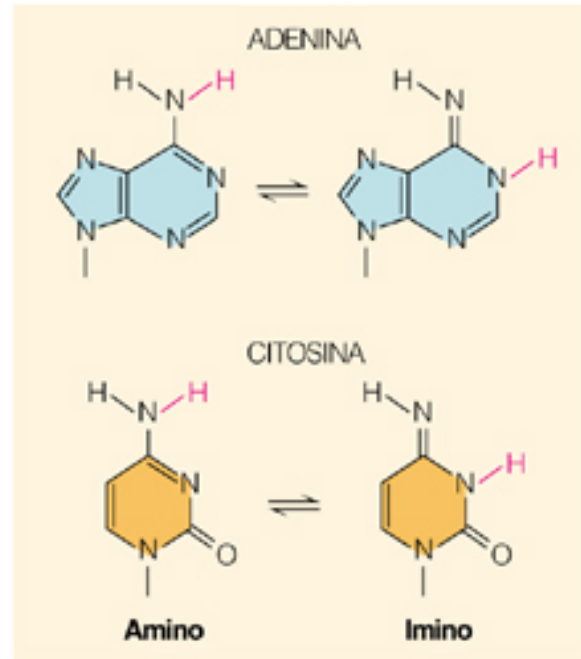
(b) Coppie di basi non corrette



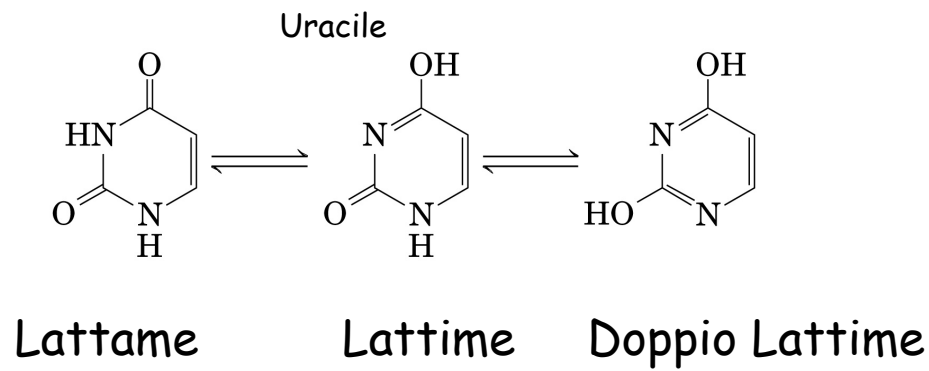


Lattame

Lattime

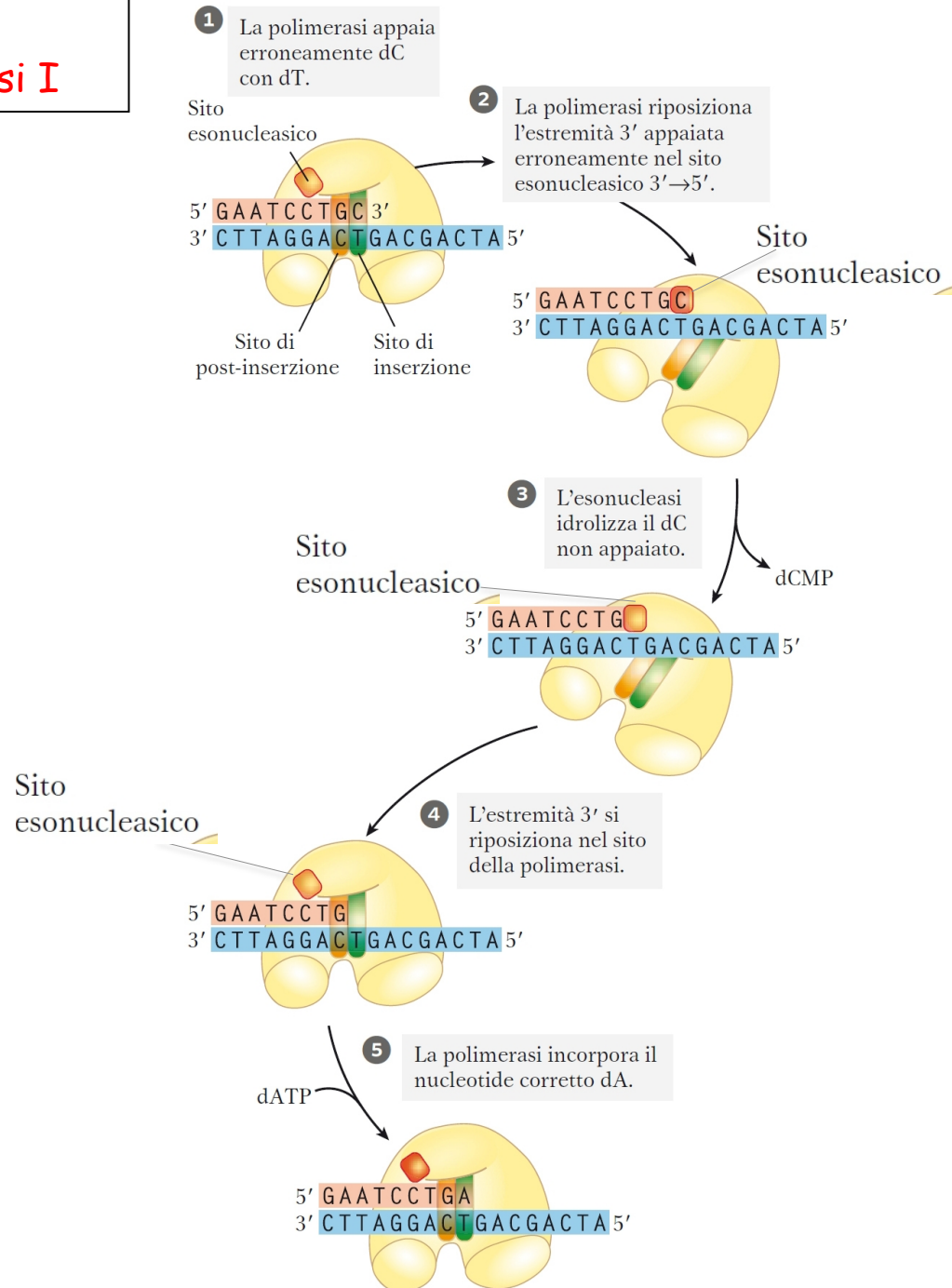


Talvolta gli errori
si verificano
quando le basi
azotate si
presentano per
breve tempo in una
forma tautomerica
insolita



Attività 3' → 5' esonucleasica (proofreading) della DNA polimerasi I

La DNA polimerasi inserisce un nucleotide sbagliato ogni 10^4 - 10^5 nucleotidi inseriti ma il processo di proofreading migliora la precisione della reazione di polimerizzazione di un fattore di 10^2 - 10^3

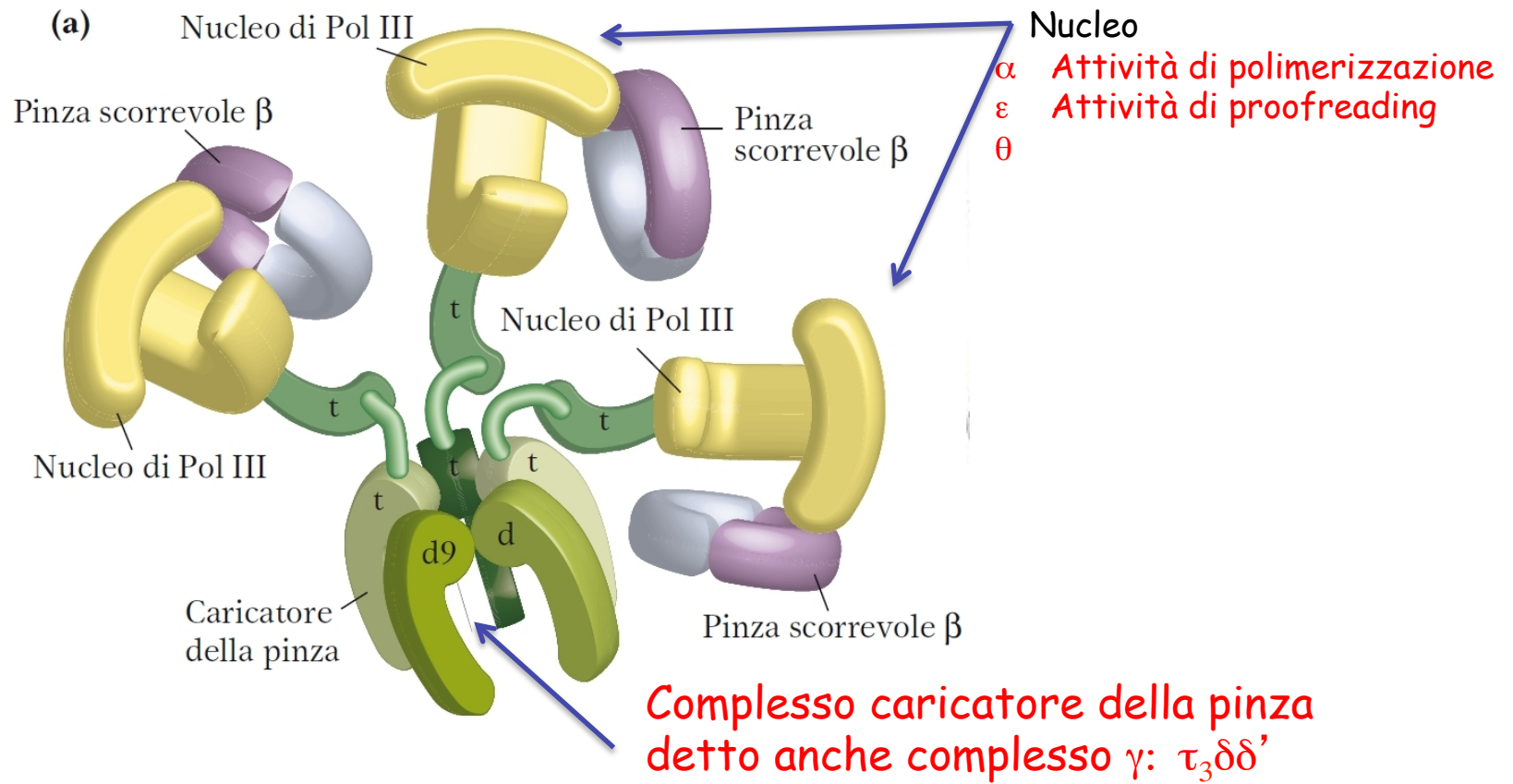


DNA Polimerasi di E. Coli

| | I | II | III |
|--|----------|-----------|------------|
| Attività polimerasica | Si | Si | Si |
| Attività 3'→5' esonucleasica (proofreading) | Si | Si | Si |
| Attività 5'→3' esonucleasica | Si | No | No |
| Velocità di polimerizzazione (nucleotidi/s) | 16-20 | 40 | 250-1000 |
| Processività (nucleotidi aggiunti prima della dissociazione) | 3-200 | 1500 | ≥ 500 000 |

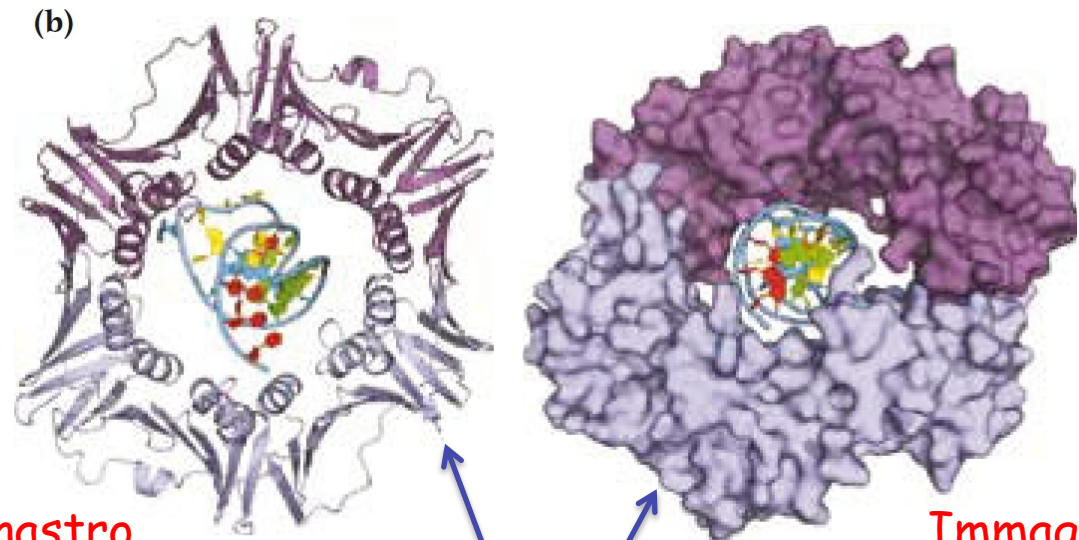
DNA polimerasi III

DNA polimerasi III* è formata da 16 subunità di cui 8 diverse + subunità β \rightarrow DNA polimerasi III



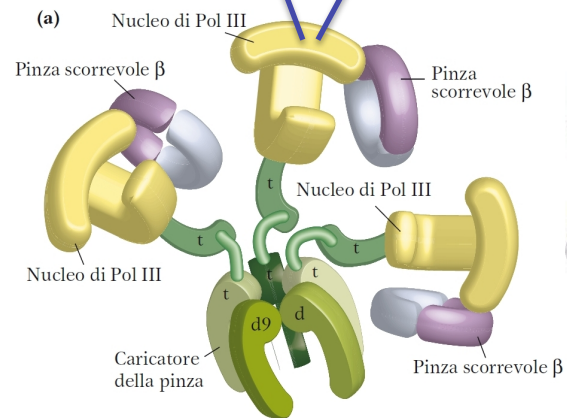
χ e ψ si legano a questo complesso

Pinza circolare che circonda il DNA

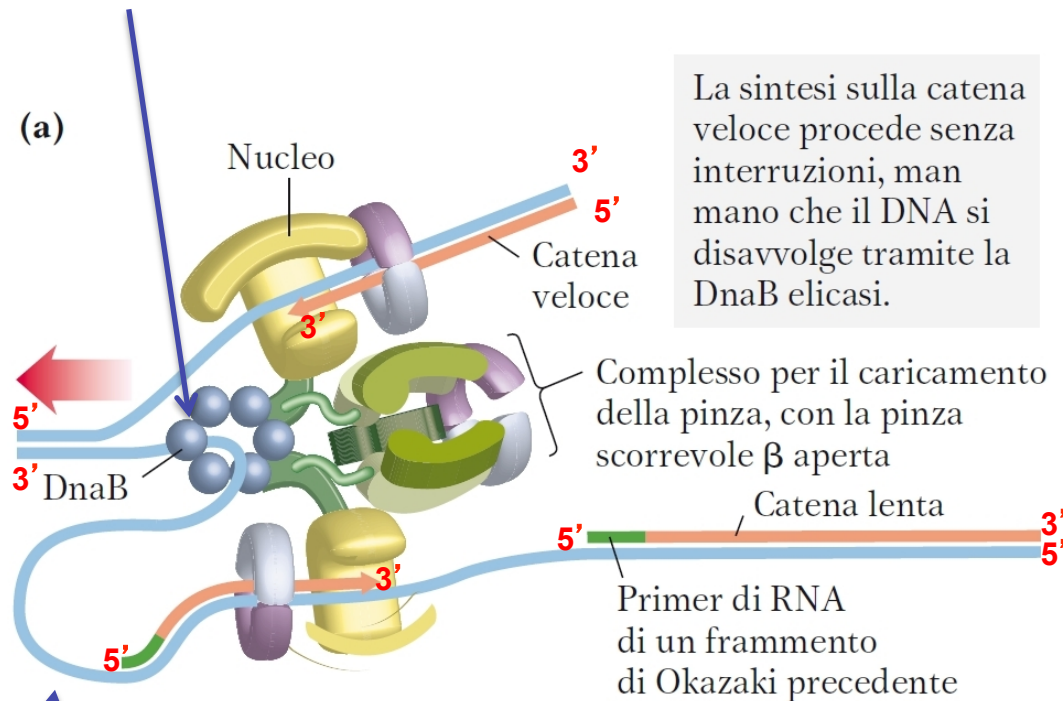


Struttura a nastro

Immagine della superficie

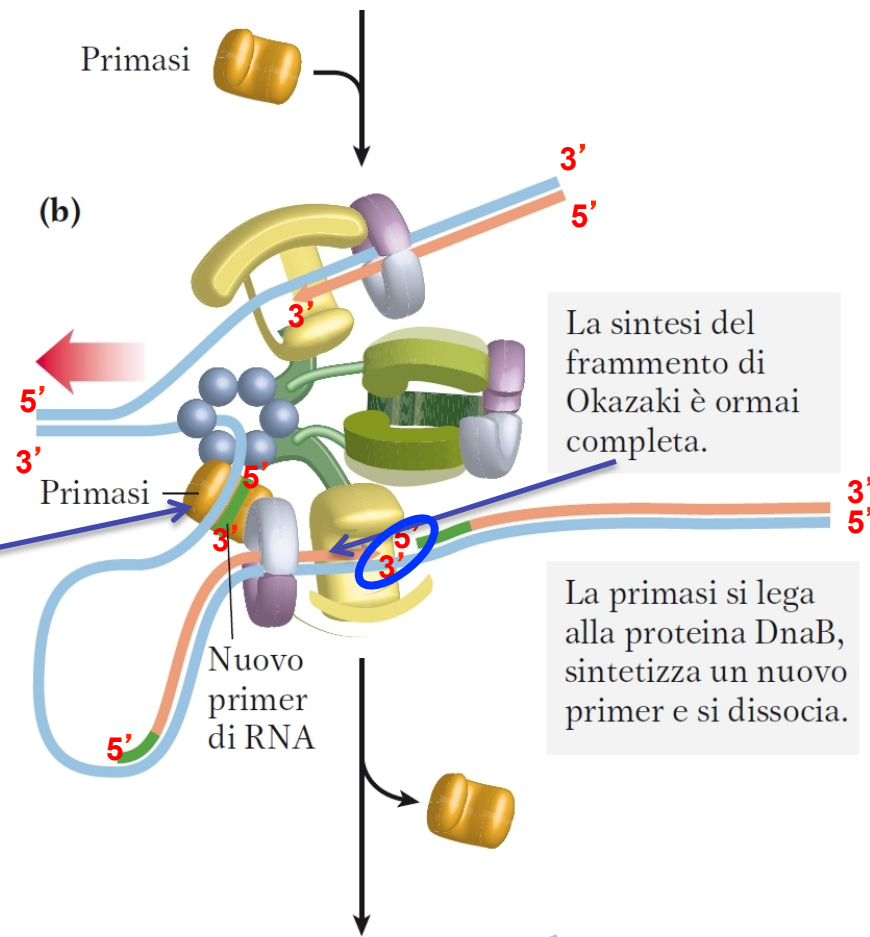


La DnaB elicasi separa la doppia elica e si sposta nella direzione dell'apertura della forcella muovendosi lungo la catena lenta

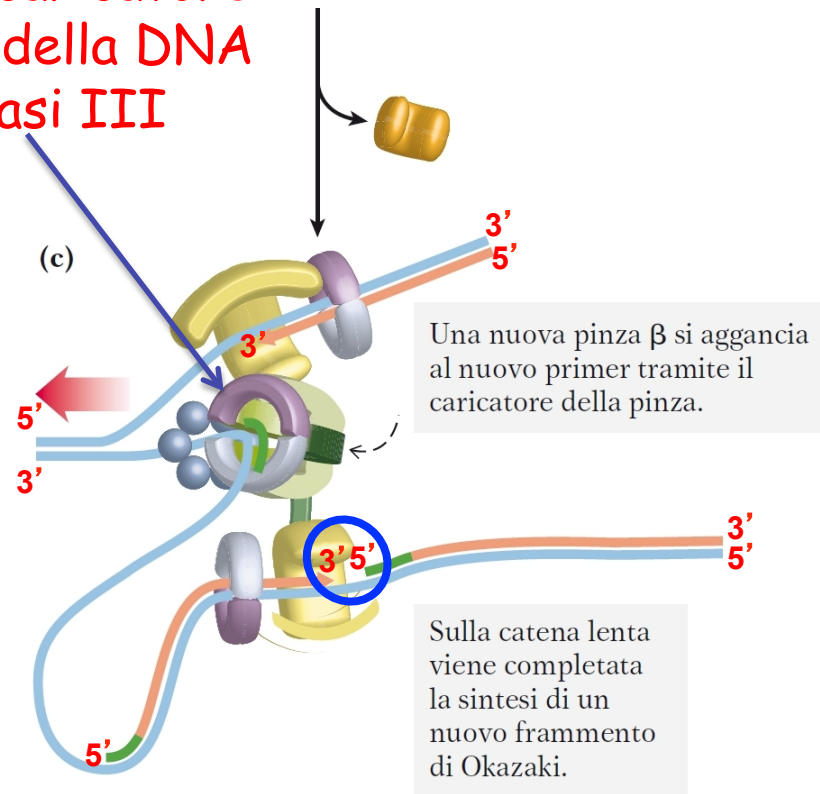


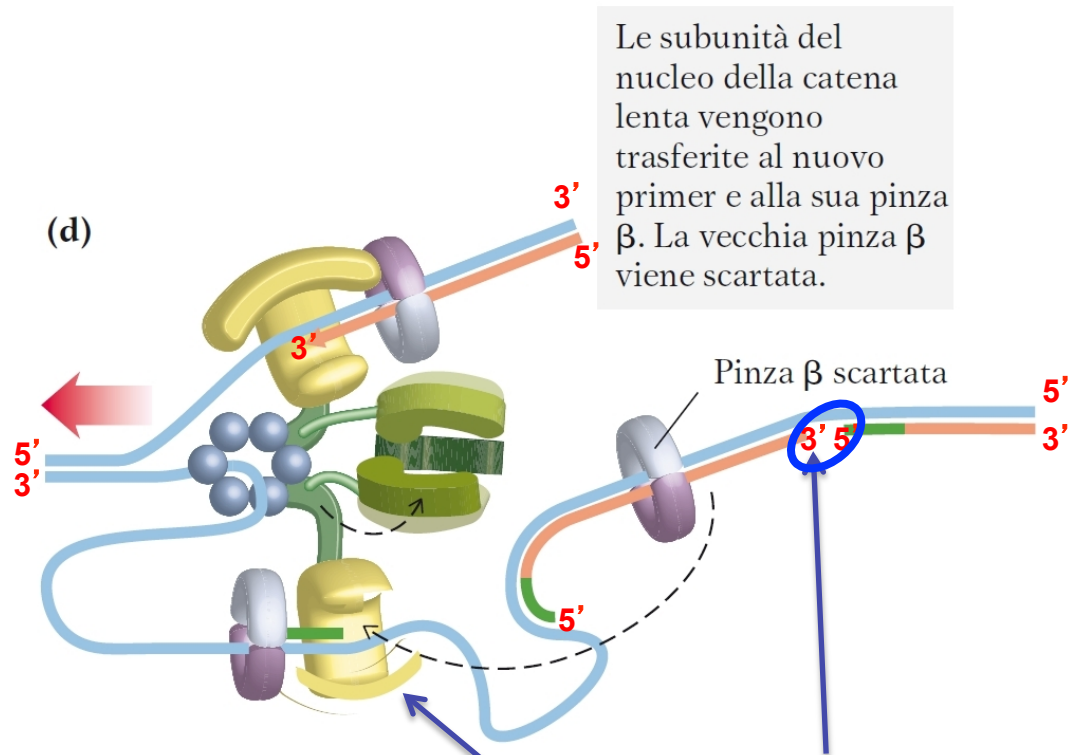
La catena stampo della catena lenta forma un'ansa in modo che la sintesi del DNA proceda coordinatamente su entrambe le catene in direzione 5'→3', nella stessa direzione dell'apertura della forcella

La DnaG Primasi si associa temporaneamente alla DnaB elicasi, sintetizza un corto primer di RNA e poi si dissocia



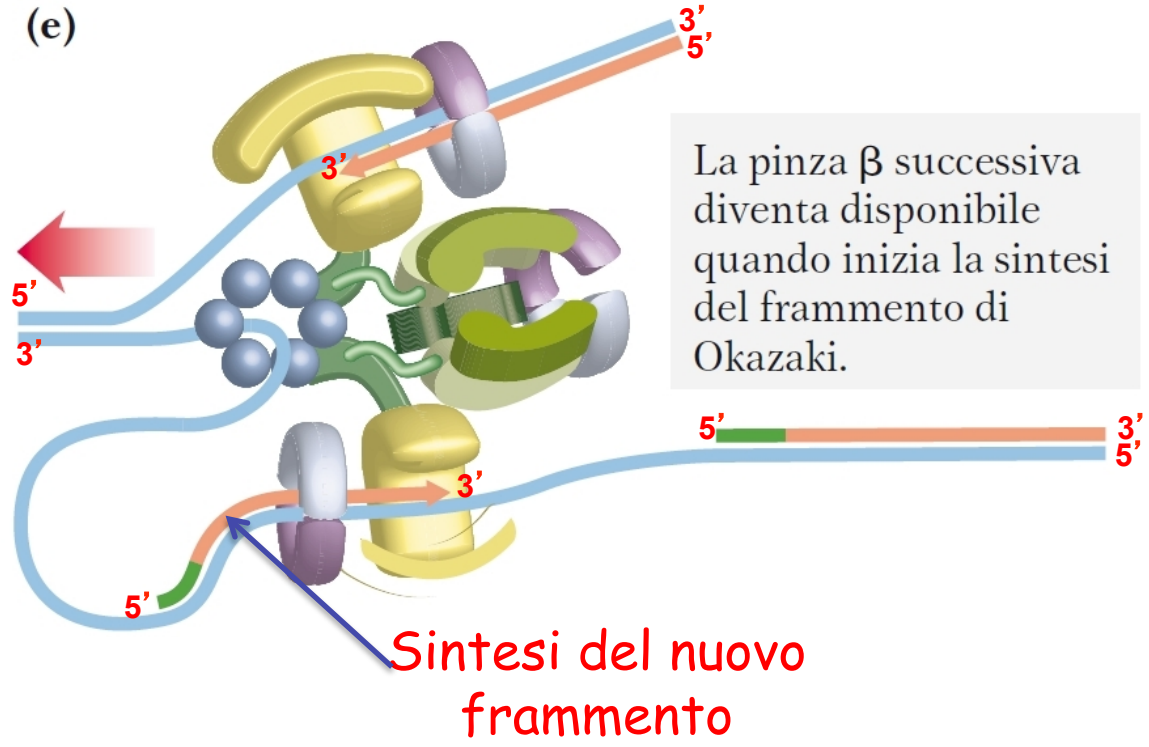
Una nuova pinza scorrevole viene posizionata vicino al primer di RNA dal complesso caricatore della pinza della DNA polimerasi III



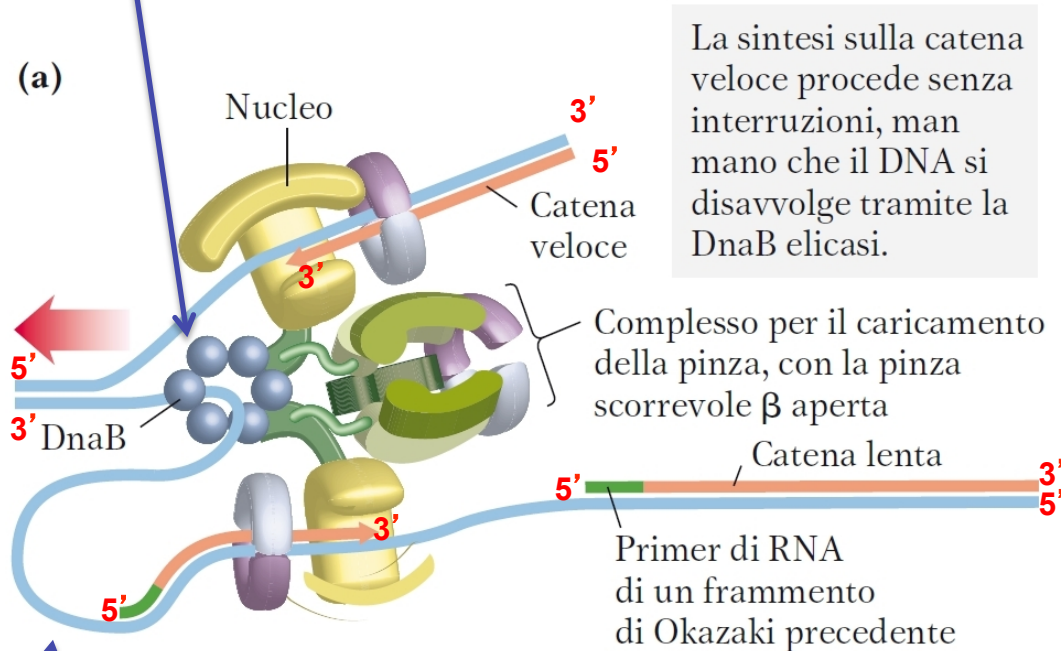


Arresto della sintesi del nuovo frammento, il nucleo della DNA polimerasi rilascia la pinza β e si associa alla nuova pinza e al nuovo primer

(e)



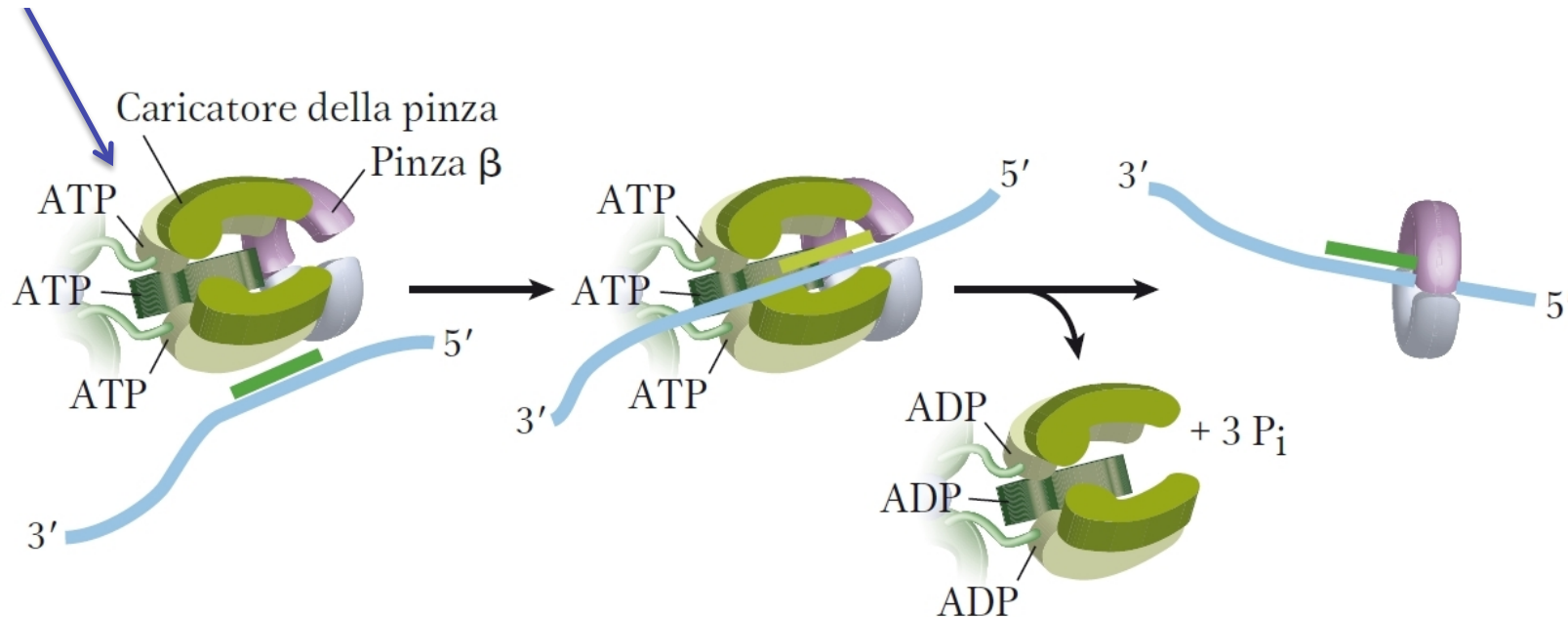
La DnaB elicasi separa la doppia elica e si sposta nella direzione dell'apertura della forcella muovendosi lungo la catena lenta



La catena stampo della catena lenta forma un'ansa in modo che la sintesi del DNA proceda coordinatamente su entrambe le catene in direzione 5'→3', nella stessa direzione dell'apertura della forcella

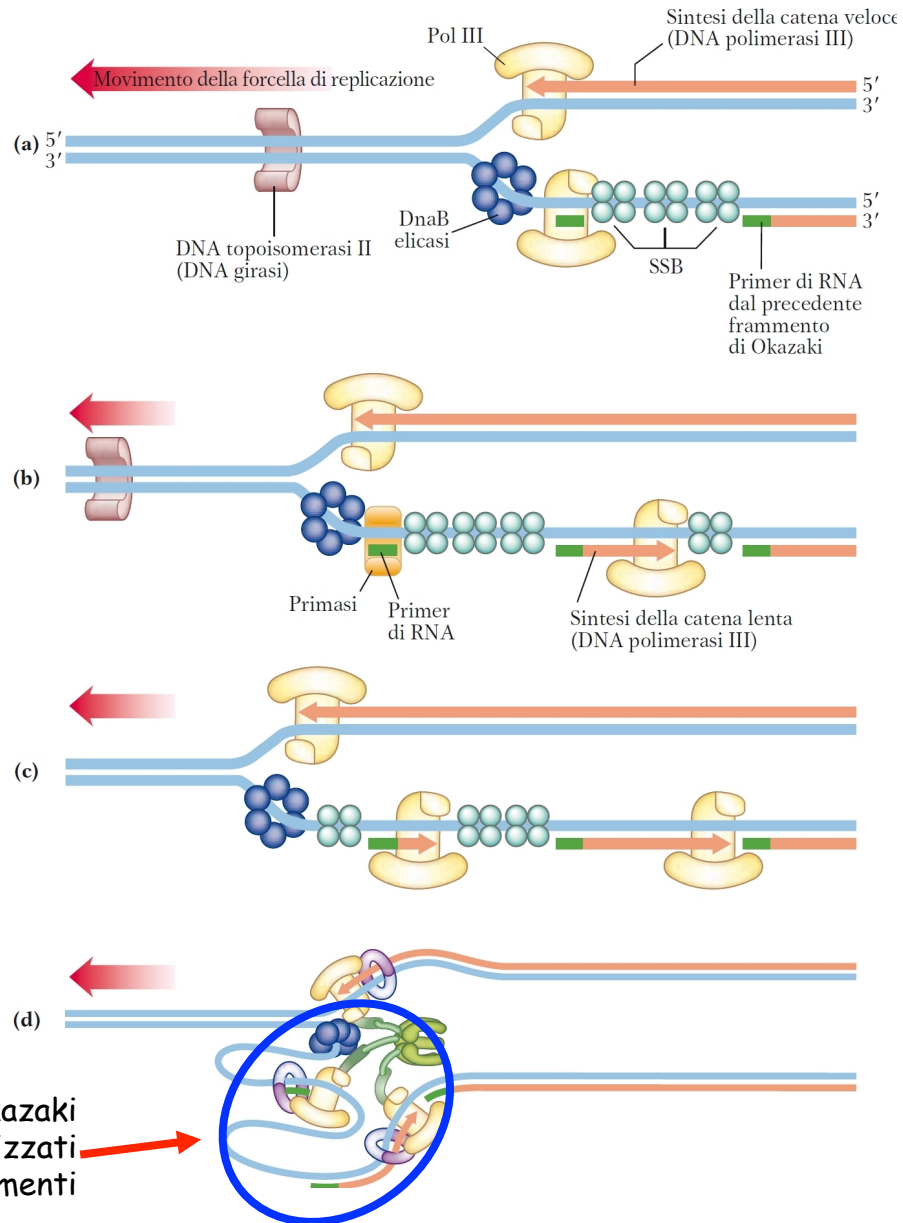
Caricatore della pinza della DNA polimerasi III

Complesso caricatore della pinza detto complesso γ : $\tau_3\delta\delta'$ è una AAA + ATPasi



$\delta\delta'$ e le estremità amminoterminali di τ_3 legano 3 molecole di ATP

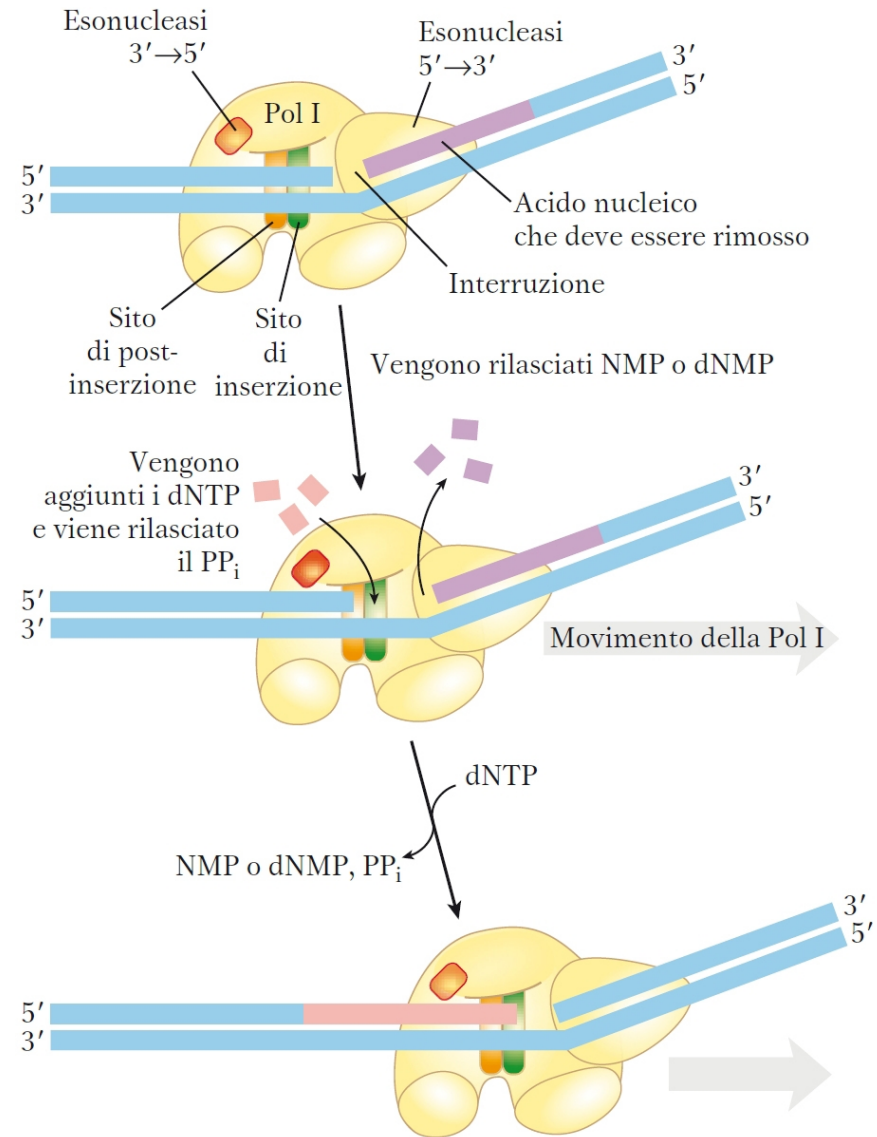
Fase d' allungamento



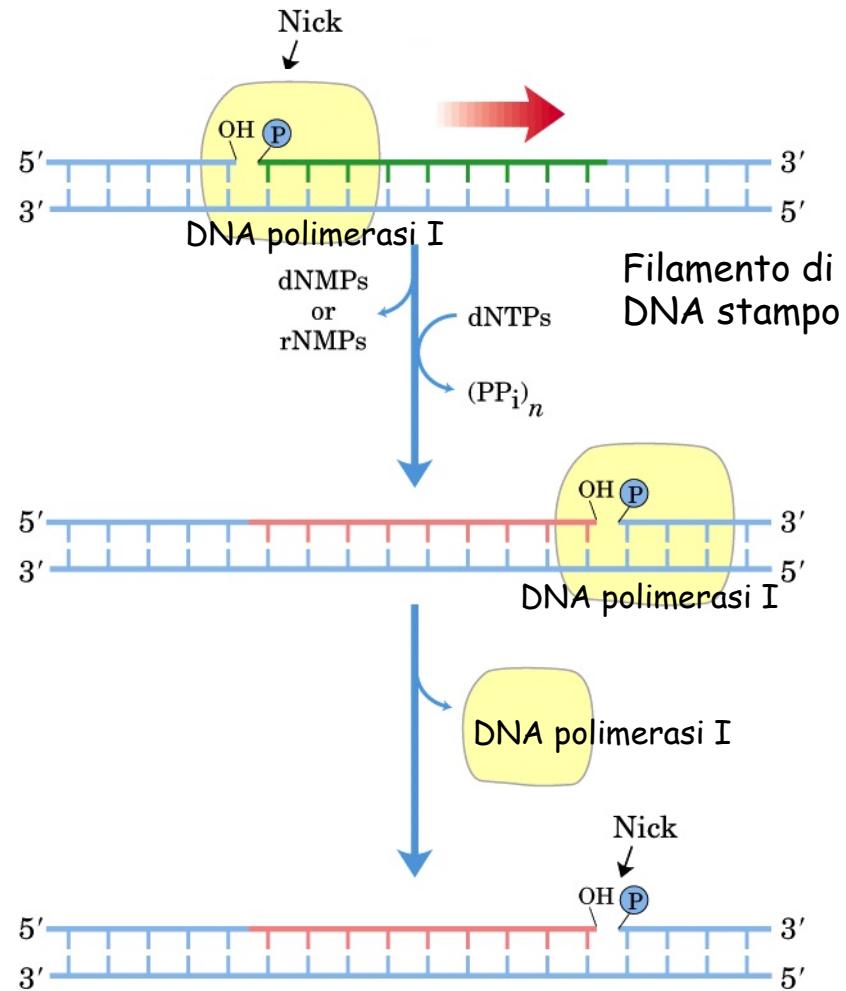
DNA polimerasi I

Frammento di Klenow: attività di polimerizzazione e proofreading

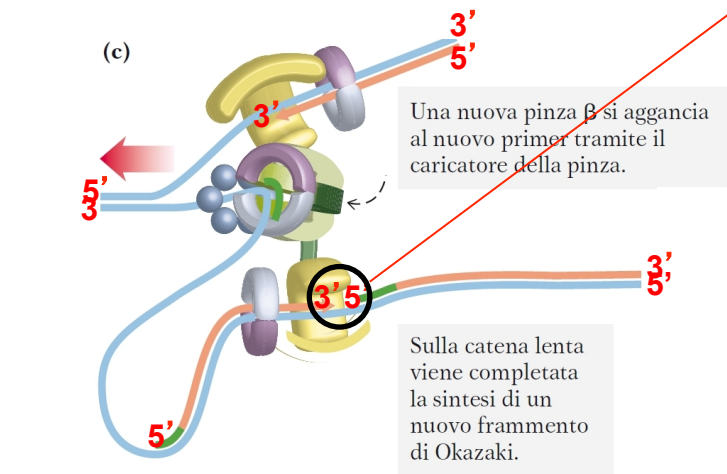
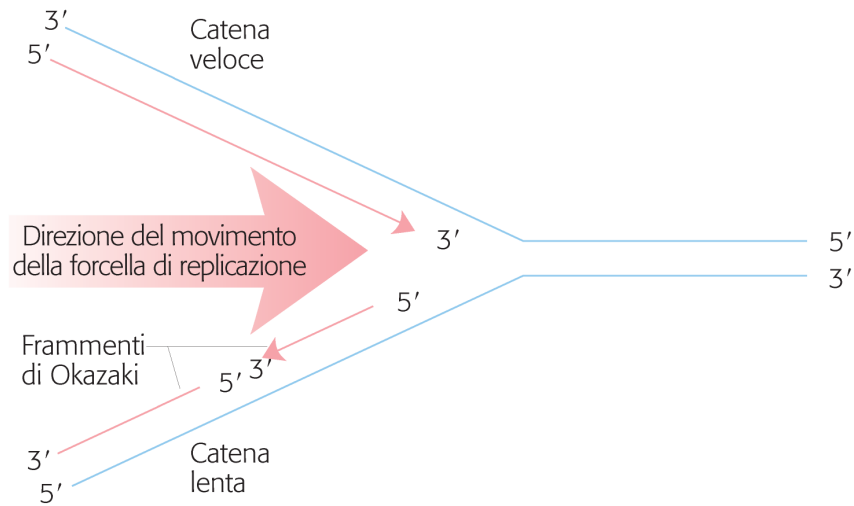
Attività 5' → 3' esonucleasica



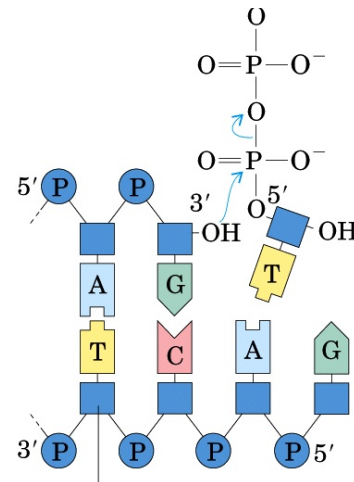
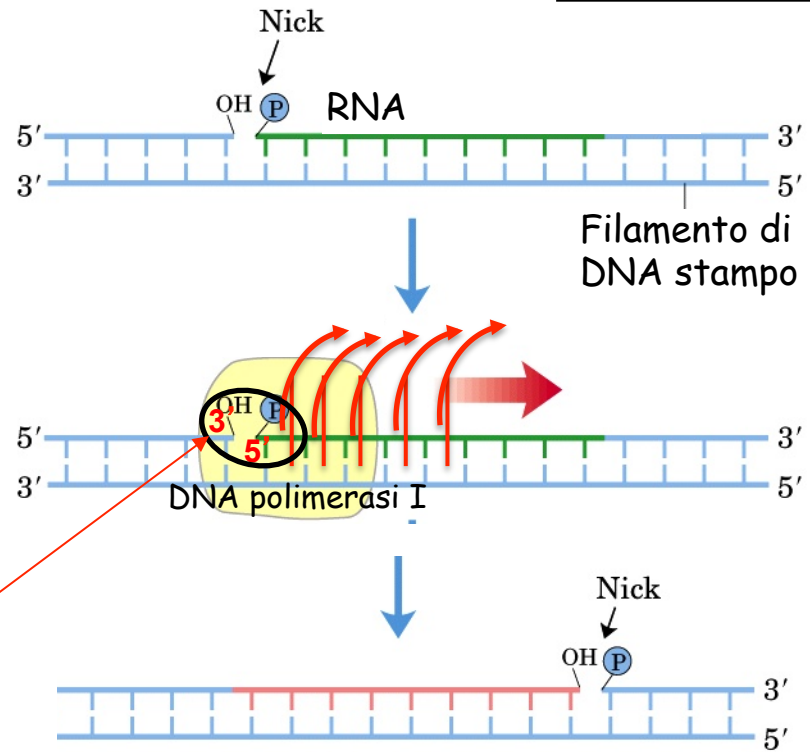
DNA polimerasi I



Nick translation

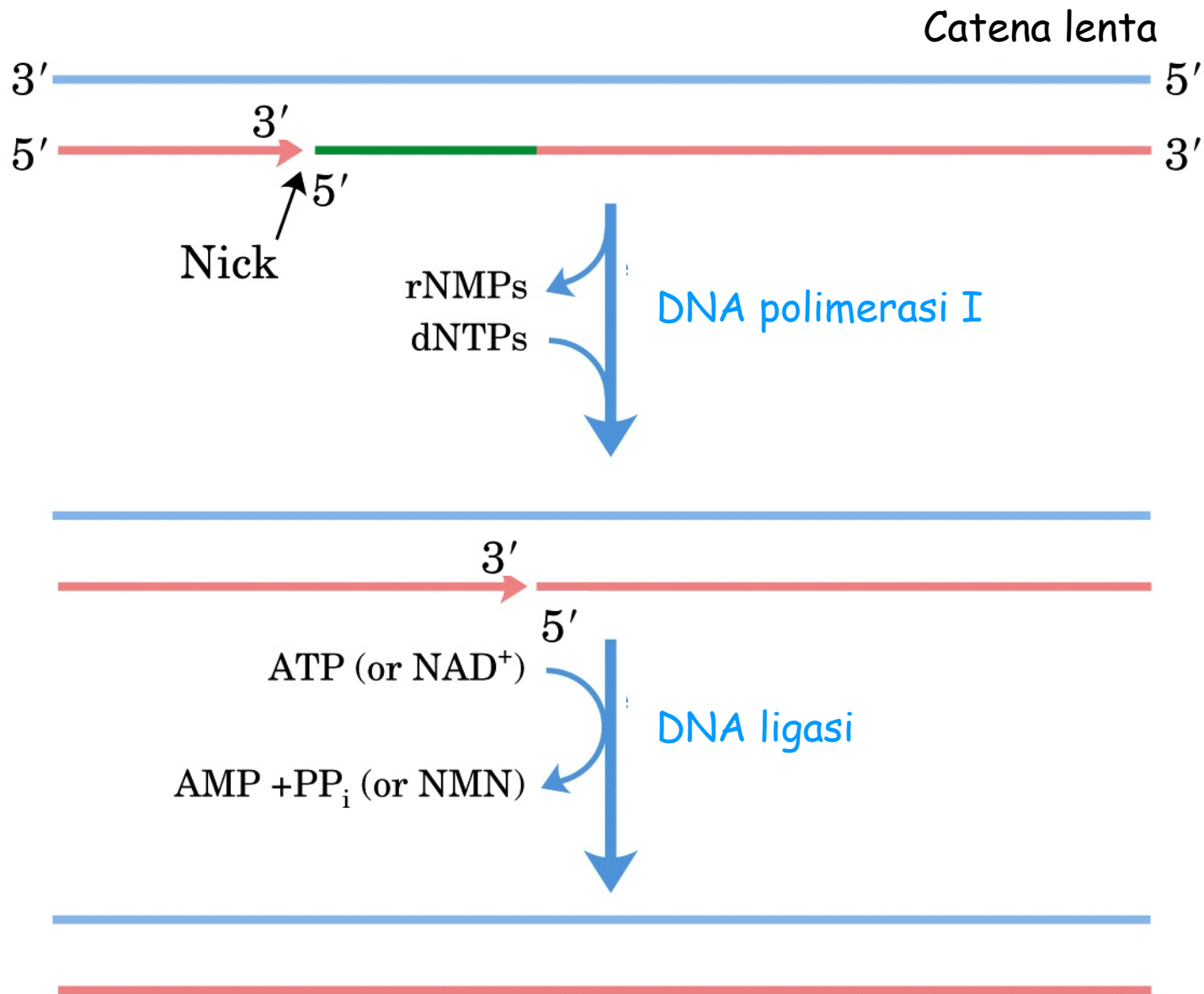


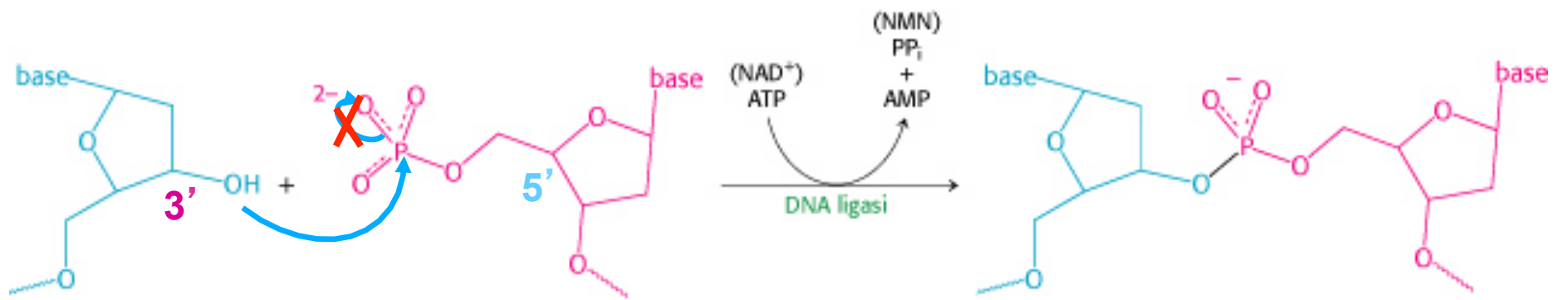
Nick translation



La replicazione del DNA richiede numerosi enzimi e fattori proteici (più di 20) che nell'insieme costituiscono il sistema della DNA replicasi o REPLISOMA tra cui:

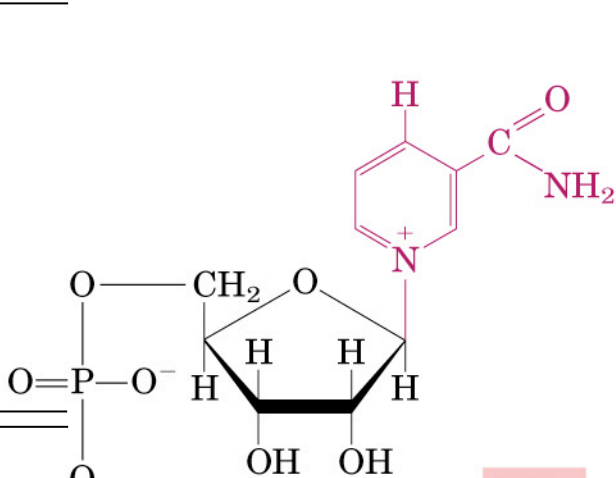
- Elicasi (DnaB): costituente del primosoma, disavvolge il DNA
- SSB: legano il DNA a filamento singolo
- Topoisomerasi (girasi): elimina i superavvolgimenti
- Primasi (DnaG): costituente del primosoma, sintetizza il primer di RNA
- DNA polimerasi III: allunga i nuovi filamenti
- DNA polimerasi I: elimina e sostituisce il primer
- DNA ligasi: sigilla l'interruzione



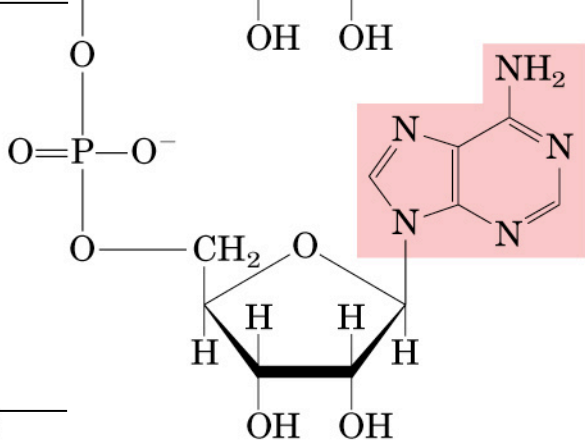


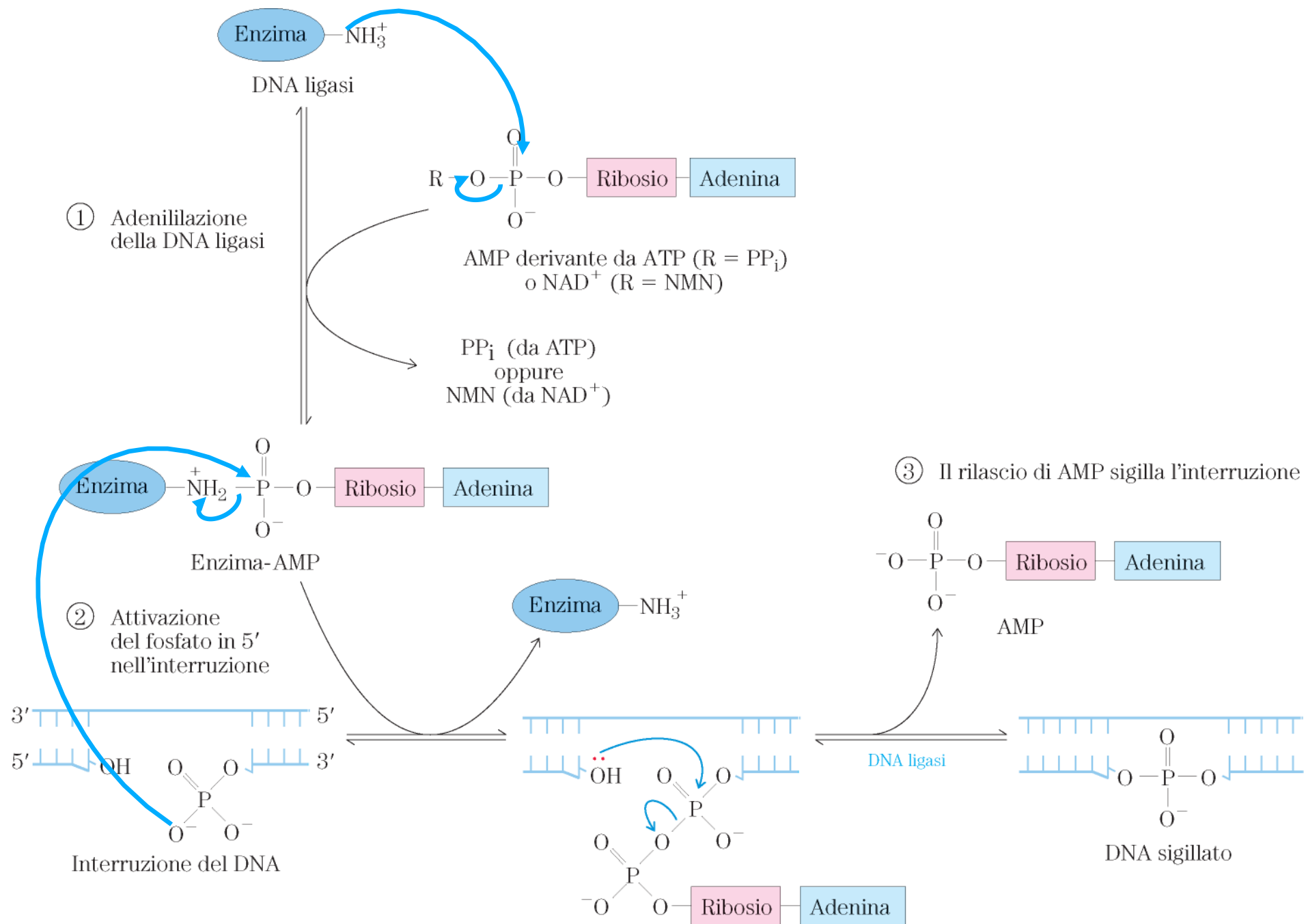
NAD⁺

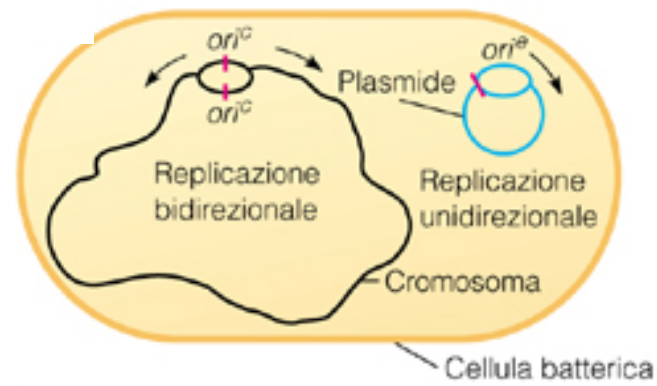
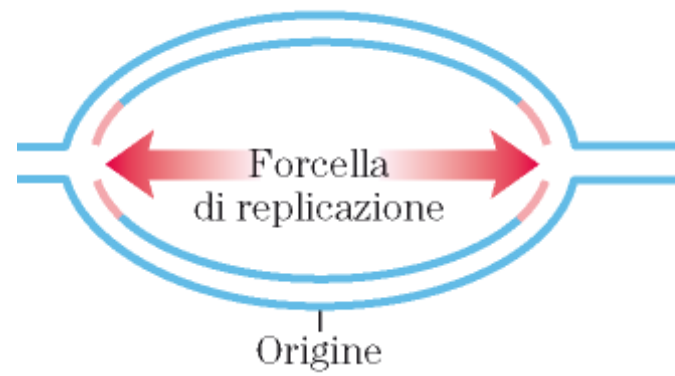
NMN



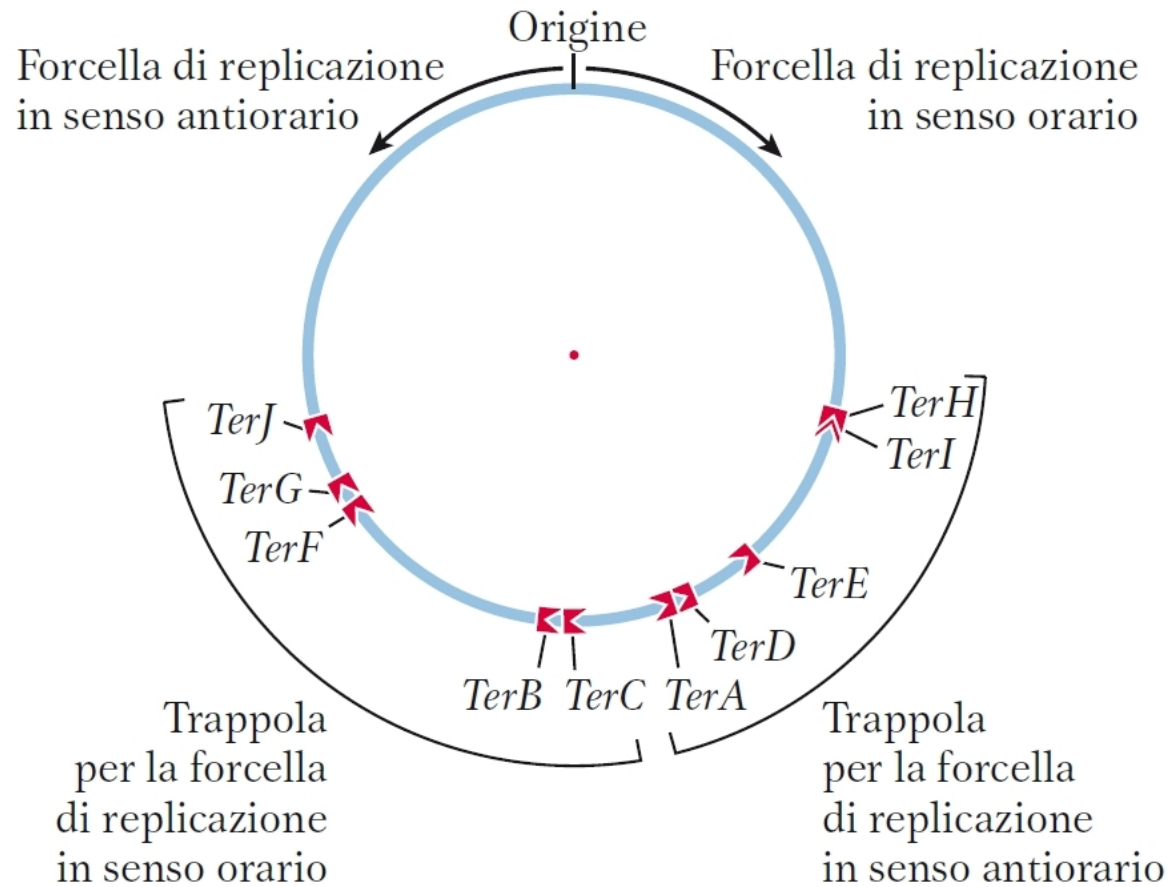
AMP



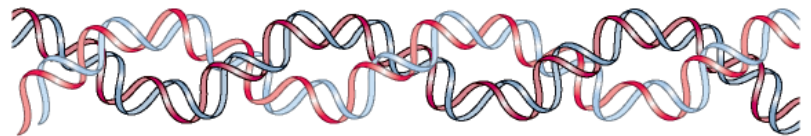
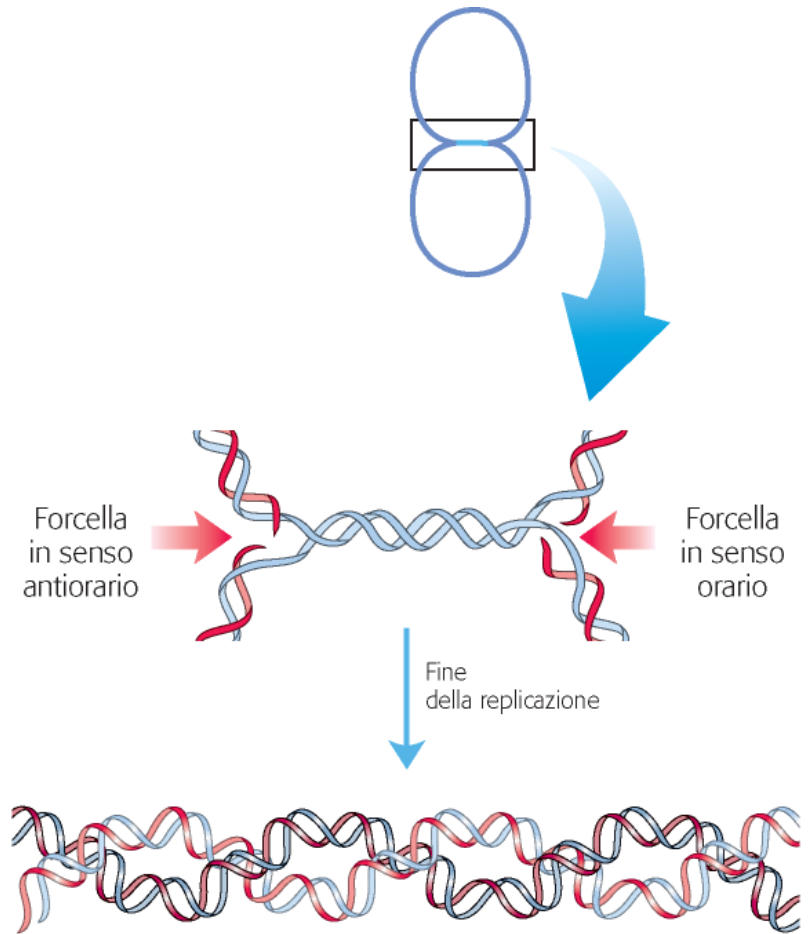




Terminazione



Le sequenze Ter sono sequenze di 20 coppie di basi, sito di legame per le proteine Tus ed il complesso Tus-Ter arresta la forcella di replicazione solo in una direzione

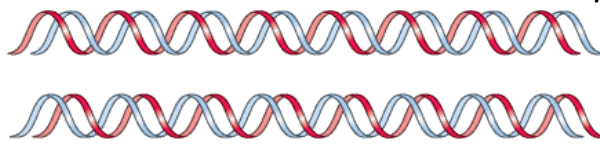


Catenani

Cromosomi concatenati

DNA topoisomerasi IV

Taglia due catene di una doppia elica di DNA e permette all'altra doppia elica di passare attraverso l'interruzione



Cromosomi separati

La replicazione del DNA negli eucarioti differisce per:

- Quantità di DNA da replicare, origini multiple (circa 30.000, ogni cromosoma diverse centinaia)
- Numero di proteine richieste (più di 27)
- Tipi di DNA polimerasi (13 tipi detti: pol α , δ , ϵ ...) tra cui le più importanti sono:
 - Pol α ha attività DNA polimerasi/primasi e non ha attività esonucleasica 3'→5'
 - Pol δ sintetizza il filamento lento, ha attività esonucleasica 3'→5' ed alta processività
 - Pol β interviene nei processi di riparazione
 - Pol ϵ sintetizza il filamento veloce, ha attività esonucleasica 3'→5' ed ha la più alta processività
 - Pol γ presente nei mitocondri