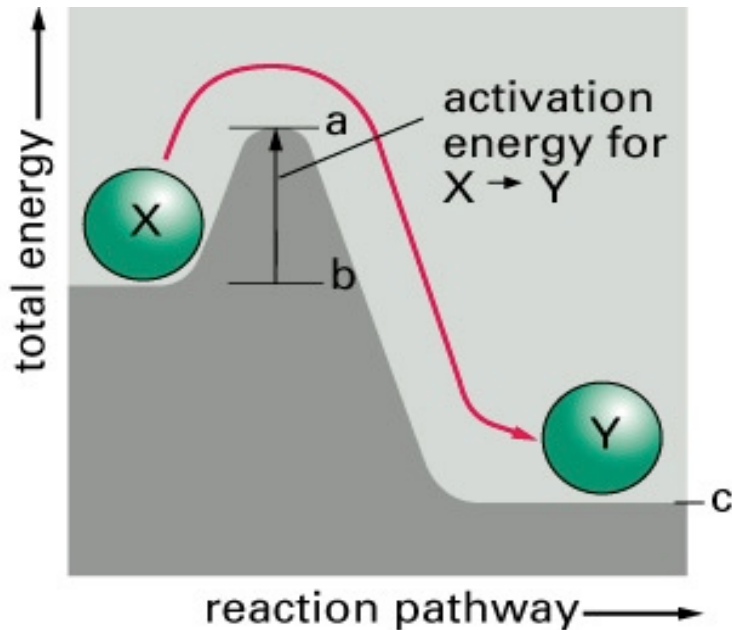
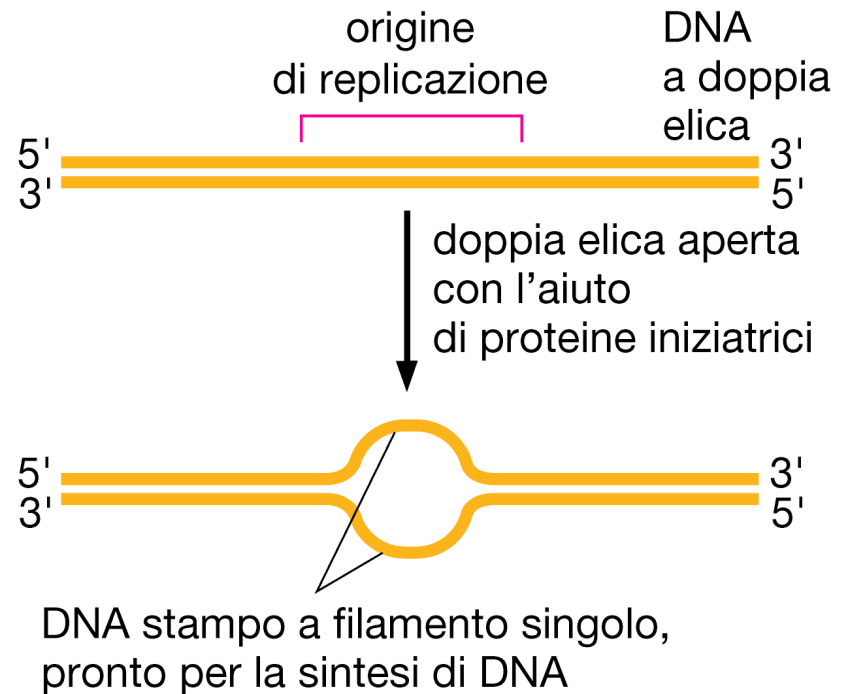


BACTERIAL REPLICATION

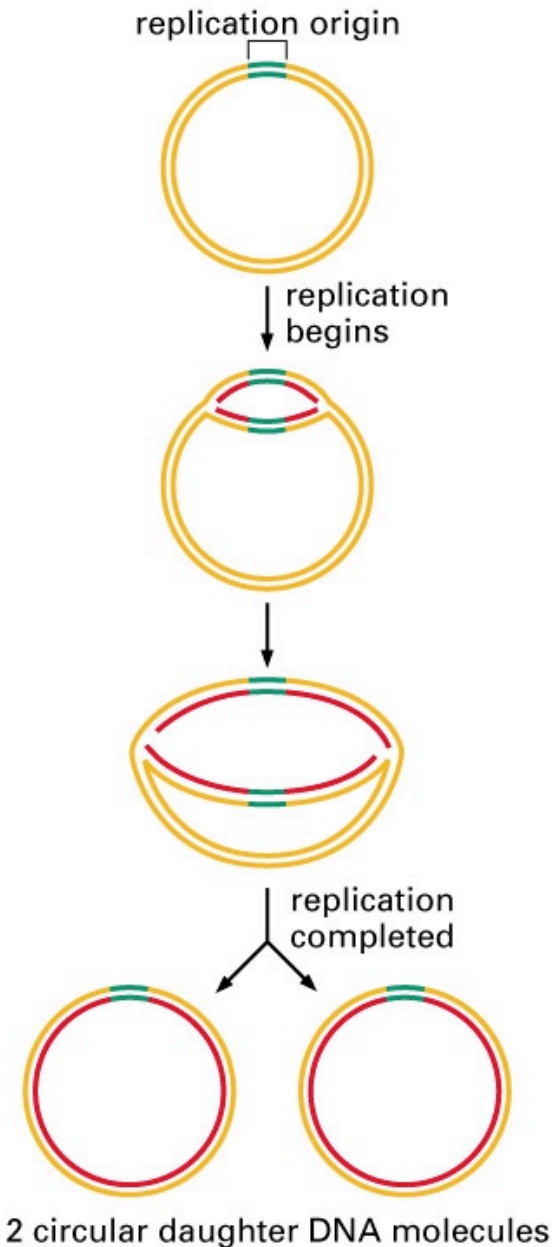


La replicazione viene innescata da proteine iniziatrici che si legano al DNA e distanziano le catene, rompendo i legami idrogeno, in corrispondenza di **ORIGINI DI REPLICAZIONE**, composte da sequenze di DNA particolarmente facili da aprire (ricche in A-T).

La doppia elica di DNA è estremamente stabile (tantissimi legami idrogeno tra le basi azotate) e alte temperature forniscono sufficiente energia termica per separare i due filamenti. Come fa a verificarsi questo nelle cellule viventi?



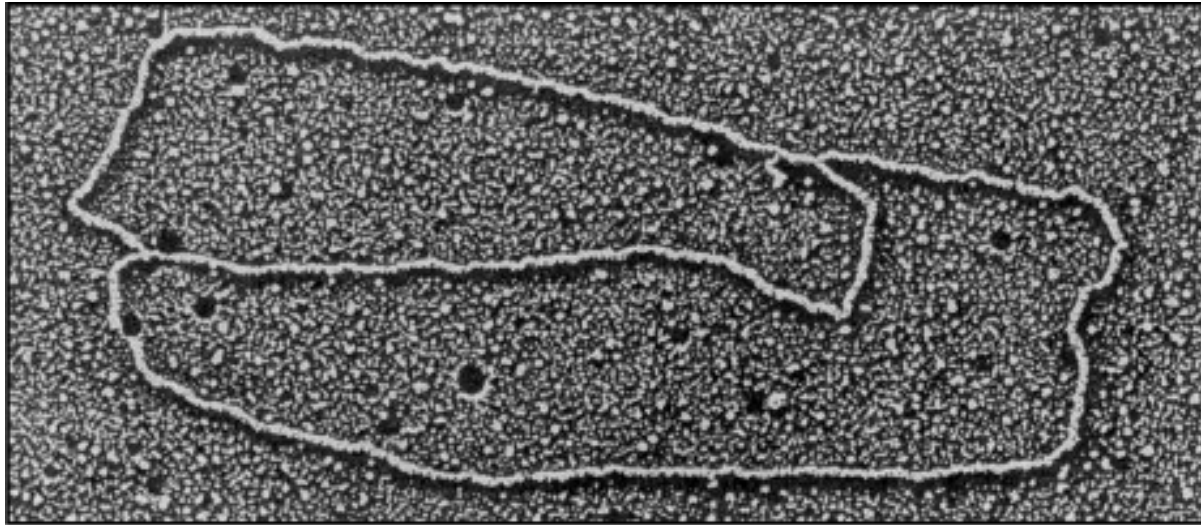
BACTERIAL REPLICATION



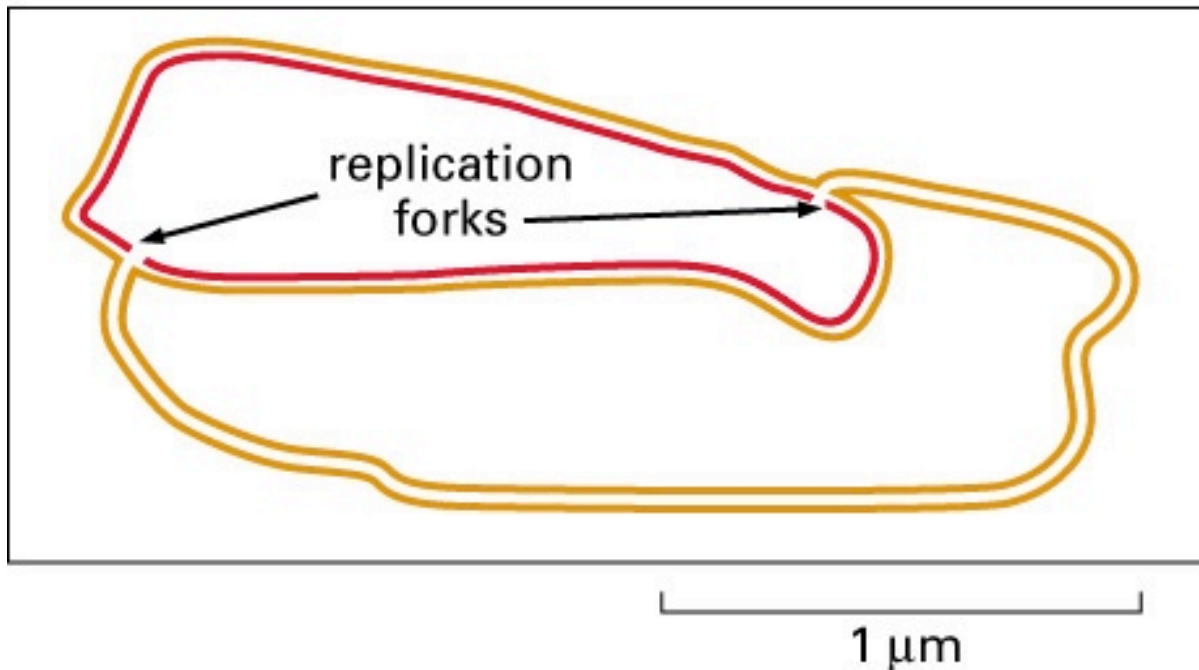
The genome of *E. coli* is contained in a single circular DNA molecule (4.6×10^6 nucleotide pairs).

DNA synthesis begins at a site termed the origin of replication

Synthesis of DNA proceeds bidirectionally around the bacterial chromosome and the two forks proceed (500-1000 nn/sec) until they meet up roughly halfway around the chromosome

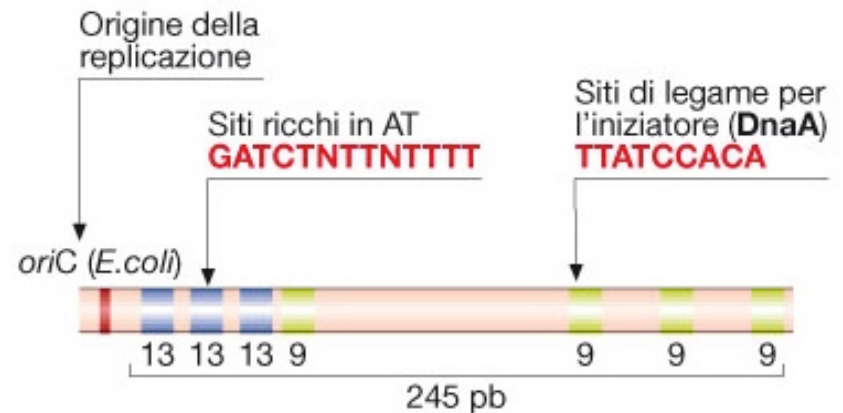
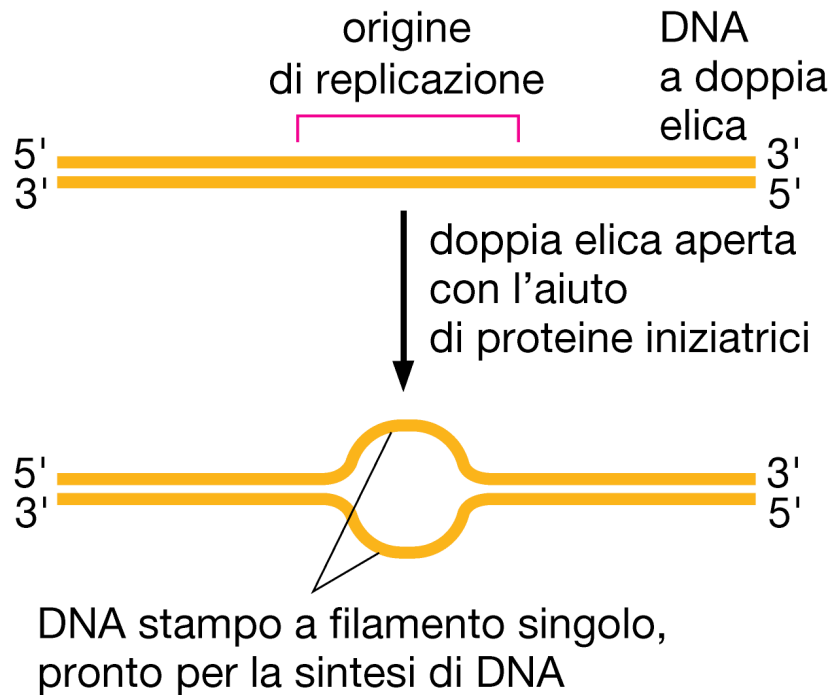


Al microscopio elettronico si distinguono delle biforcazioni a Y, dette **FORCELLE REPLICATIVE**. In questi punti la macchina replicatrice si muove lungo il DNA, aprendo i due filamenti e copiando l'informazione.



Le forcelle viaggiano rapidissime, circa 1000 coppie di nucleotidi al secondo nei batteri e 100 coppie di nucleotidi al secondo nell'uomo (verosimilmente per le difficoltà poste dalla struttura più complessa della cromatina)

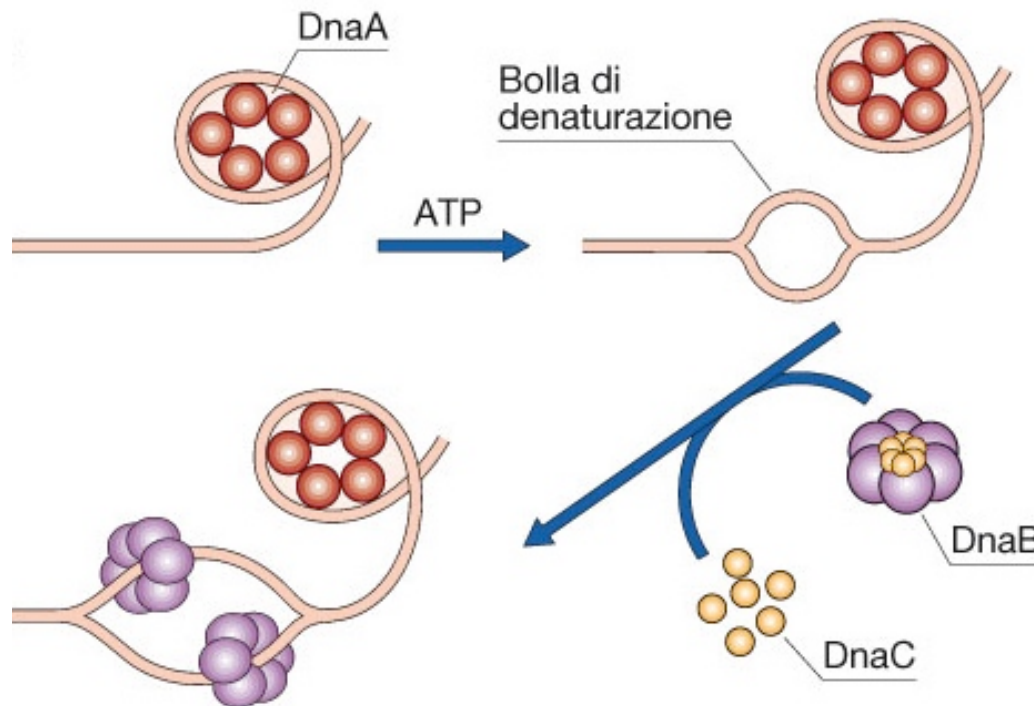
Origine di replicazione in E.Coli: *oriC*



L'origine minima di E.Coli e' lunga solo 245 bps.
E' una regione ricca di A e T: contiene 4 ripetizioni di 9 pb e 3 di 13 pb molto simili tra loro.
Le corte sequenze ripetute sono riconosciute da proteine specifiche nelle fasi iniziali della replicazione.

Inizio della replicazione in E.Coli

- **DnaA** riconosce *oriC* creando un core proteico attorno cui si avvolge il DNA di *oriC*. In presenza di ATP, induce la denaturazione localizzata del DNA in corrispondenza delle 3 ripetizioni di 13 pb, permettendo l'assemblaggio del complesso replicativo.
- In presenza della proteina accessoria **DnaC**, due complessi esamerici dell'elicasi replicativa (**DnaB**) vengono caricati sulla bolla di denaturazione, creando il complesso di pre-innesco e le due forcelle di replicazione bidirezionali.



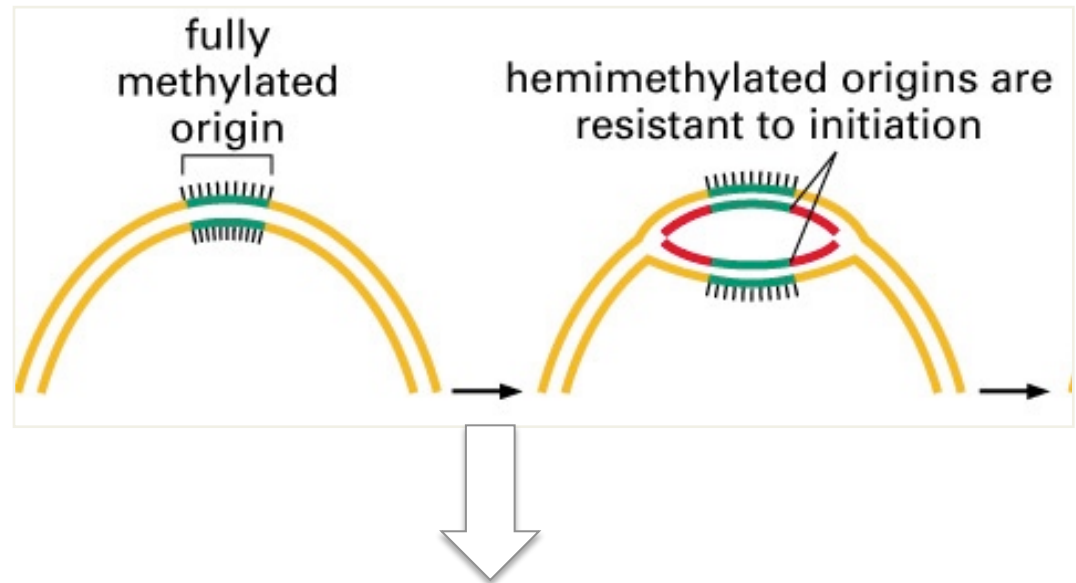
Inizio della replicazione

BATTERI: altamente regolato in quanto unico momento in cui il batterio controlla la replicazione

2 Livelli di regolazione:

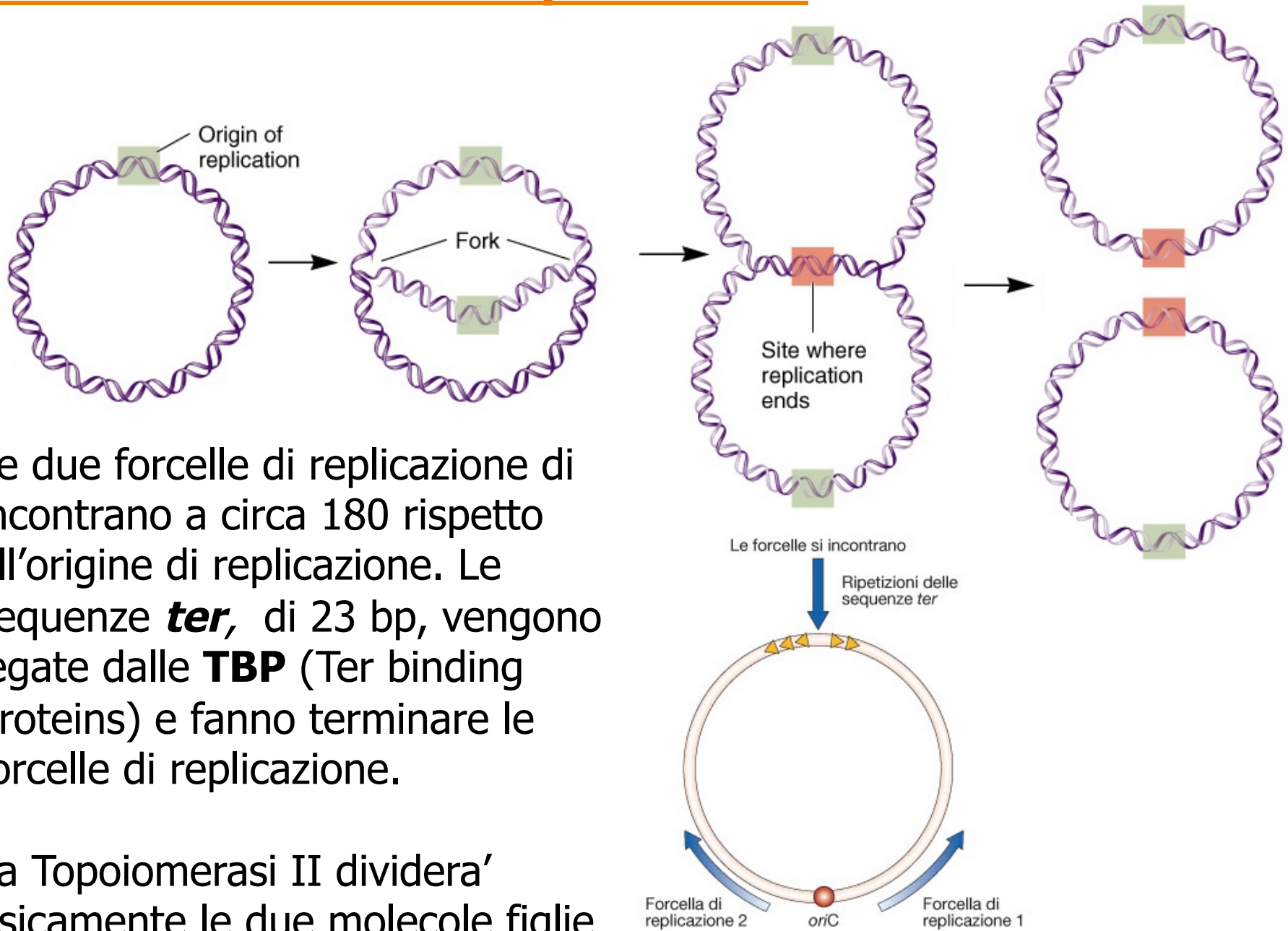
- Interazione della proteina iniziatrice con l'origine di replicazione:
solo quando ci sono nutrienti a sufficienza;

- Origine di replicazione:
una volta usata, va incontro a un “**periodo refrattario**”, rappresentato da un **ritardo nella metilazione delle nuove A sintetizzate**, che blocca ulteriori inizi di replicazione.



Nello stato emi-metilato (transitorio!) non può funzionare da origine di replicazione, non viene usata 2 volte!

Terminazione della replicazione.



Le due forcelle di replicazione di incontrano a circa 180 rispetto all'origine di replicazione. Le sequenze **ter**, di 23 bp, vengono legate dalle **TBP** (Ter binding proteins) e fanno terminare le forcelle di replicazione.

La Topoisomerasi II dividerà fisicamente le due molecole figlie

Topoisomerasi

two circular DNA double helices that are interlocked

topoisomerase II

a type II DNA topoisomerase makes a reversible covalent attachment to both DNA strands, interrupting the *orange* double helix and forming a protein gate

the topoisomerase gate opens and shuts to let a second DNA helix pass

TOPOISOMERASI II: forma un nick transiente su entrambi i filamenti di una doppia elica permettendo all'elica neo-sintetizzata di passare nella breccia creata dal taglio; successivamente salda il nick.

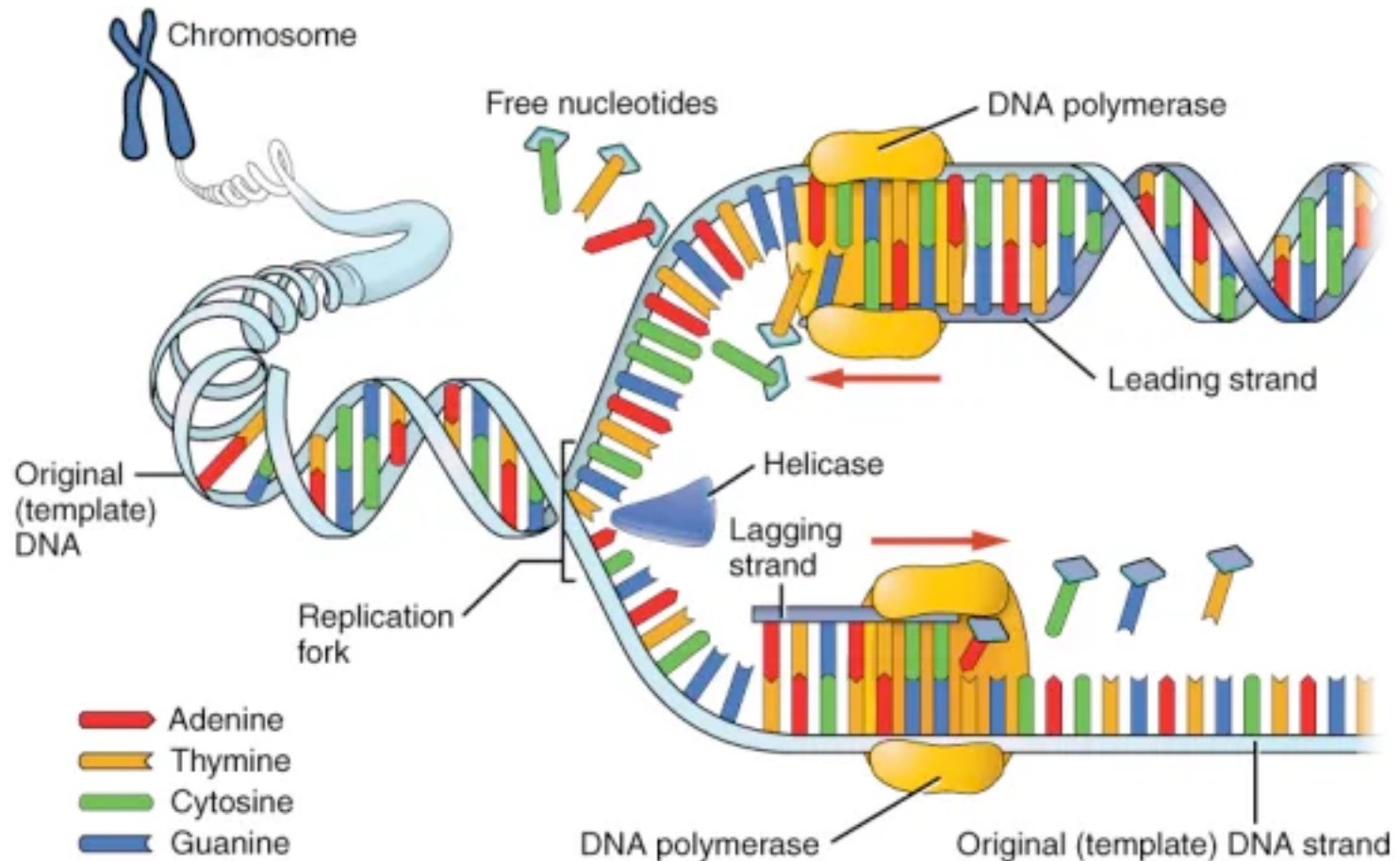
reversal of the covalent attachment of the topoisomerase restores an intact double helix

two circular DNA double helices that are separated

Serve ATP!

La Forcella di Replicazione

La forcella di replicazione è la struttura in cui avviene la duplicazione del DNA. E' formata dalla molecola di DNA parentale i cui due filamenti complementari sono parzialmente denaturati per un breve tratto.



Special proteins help to open up double helix in front of the replication fork

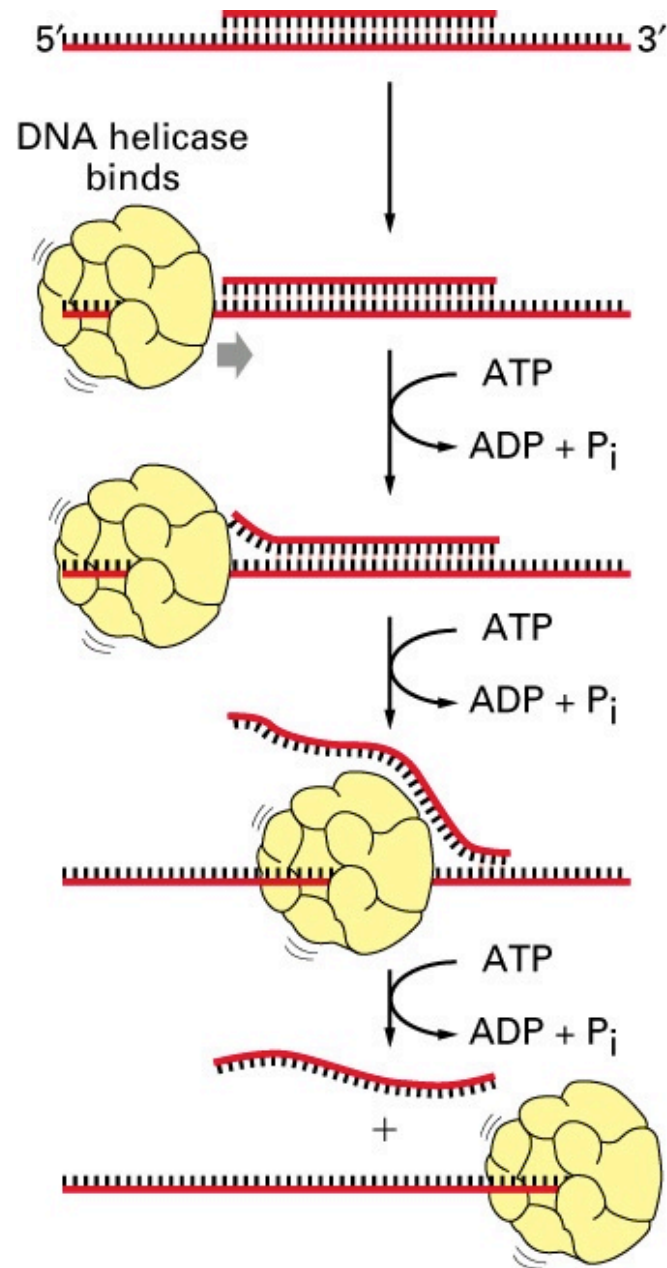
- * DNA helicases
- * Single-strand binding (SSB) proteins

DNA Helicase

An enzyme that unwinds the double helix by breaking the Hydrogen bonds between the complementary bases

La DNA elicasi si lega al DNA a singolo filamento e scorre separando i due filamenti della molecola (1000 nucleotidi/secondo).

Il movimento della DNA elicasi richiede idrolisi di ATP.

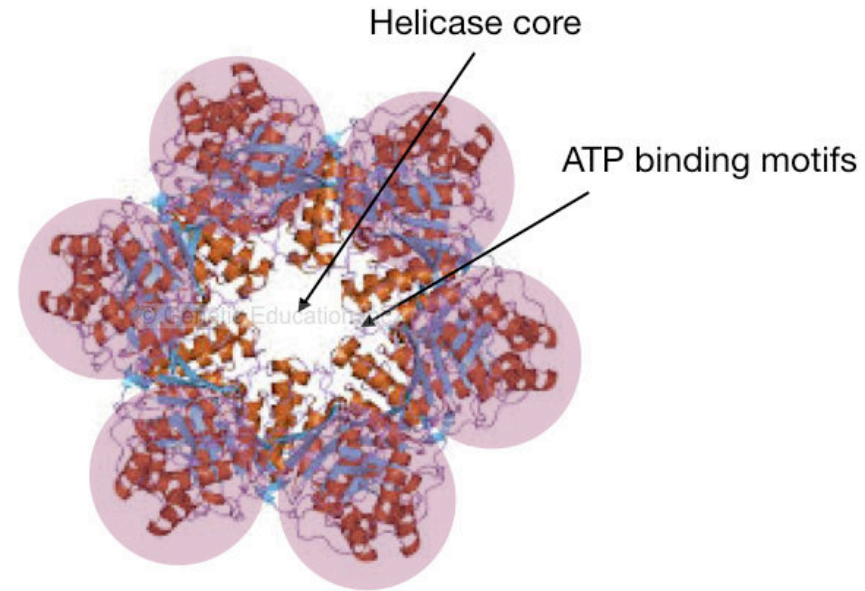


Crystal Structure of T7 Gene 4 Ring Helicase Indicates a Mechanism for Sequential Hydrolysis of Nucleotides

Martin R. Singleton,* Michael R. Sawaya,†
Tom Ellenberger,† and Dale B. Wigley*†

*Sir William Dunn School of Pathology
University of Oxford
South Parks Road
Oxford OX1 3RE
United Kingdom

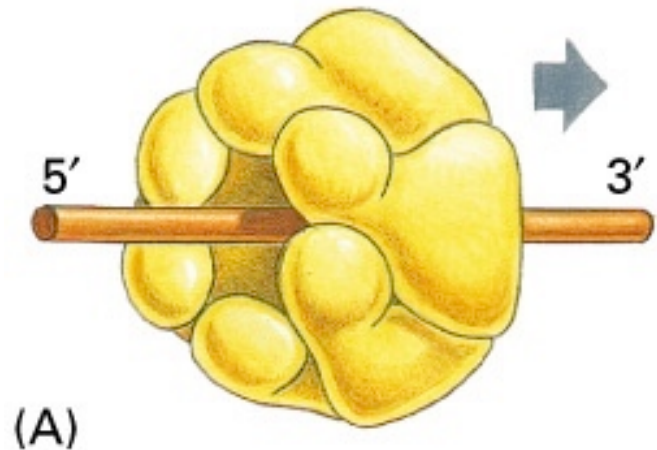
†Department of Biological Chemistry
and Molecular Pharmacology
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts 02115



Origin of replication

Helicase

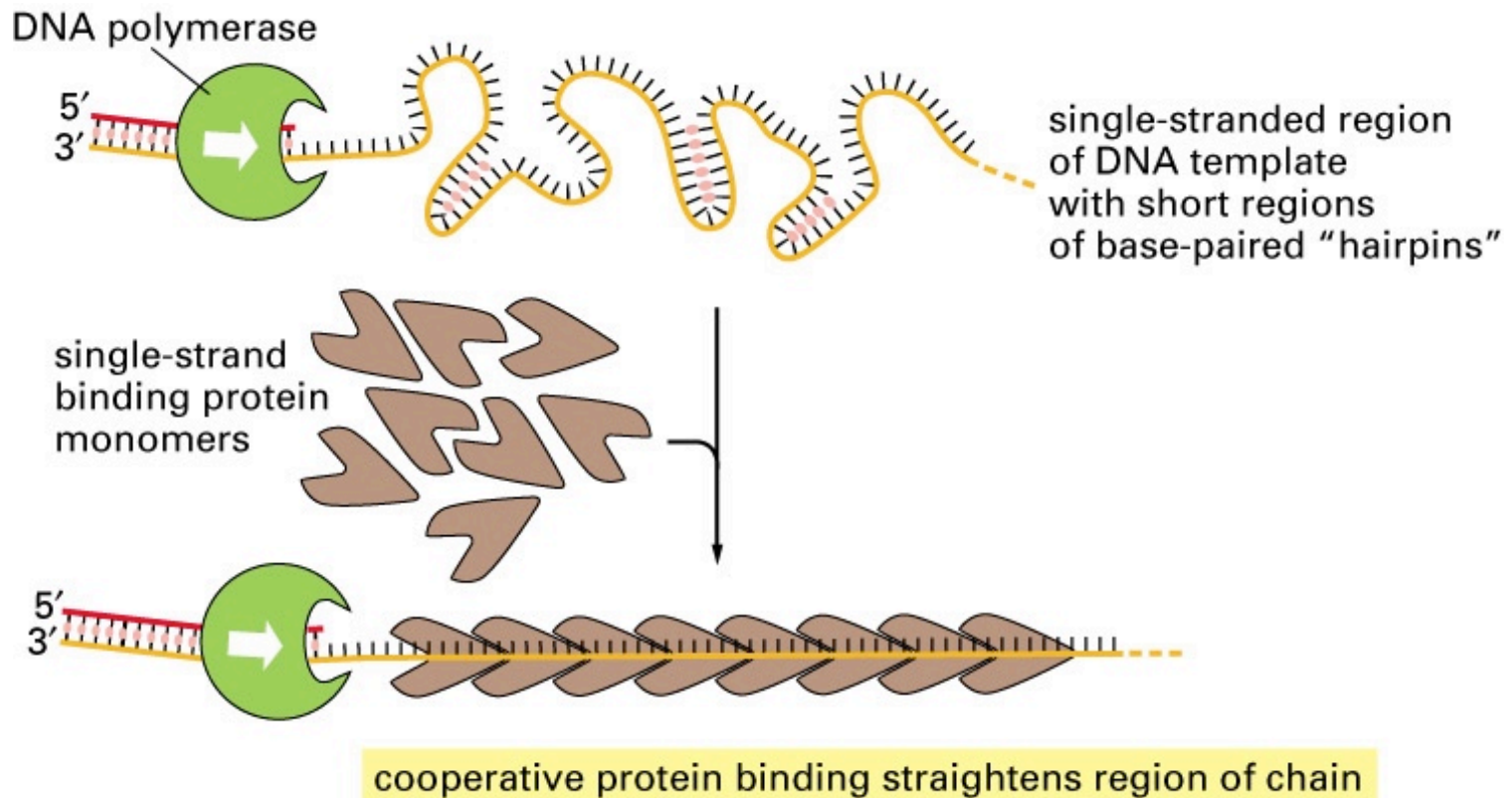
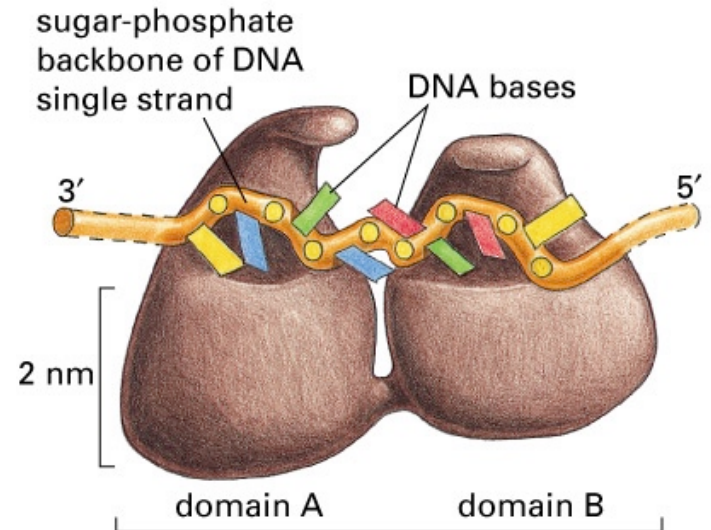
Hexameric structure of DNA helicase



SSB proteins

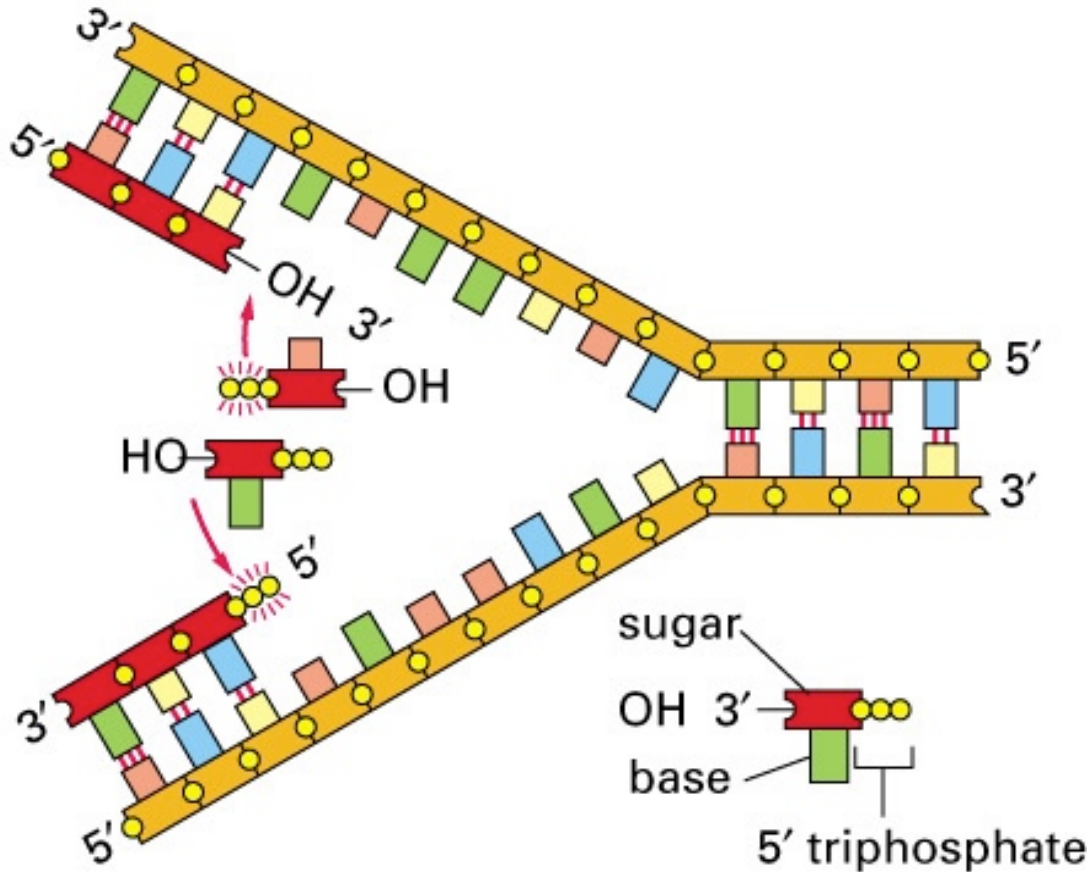
SSB proteins bind tightly to ssDNA without covering the bases.

SSB proteins are unable to open a DNA helix but aid helicases by stabilizing the unwound ss conformation



La Forcella di Replicazione

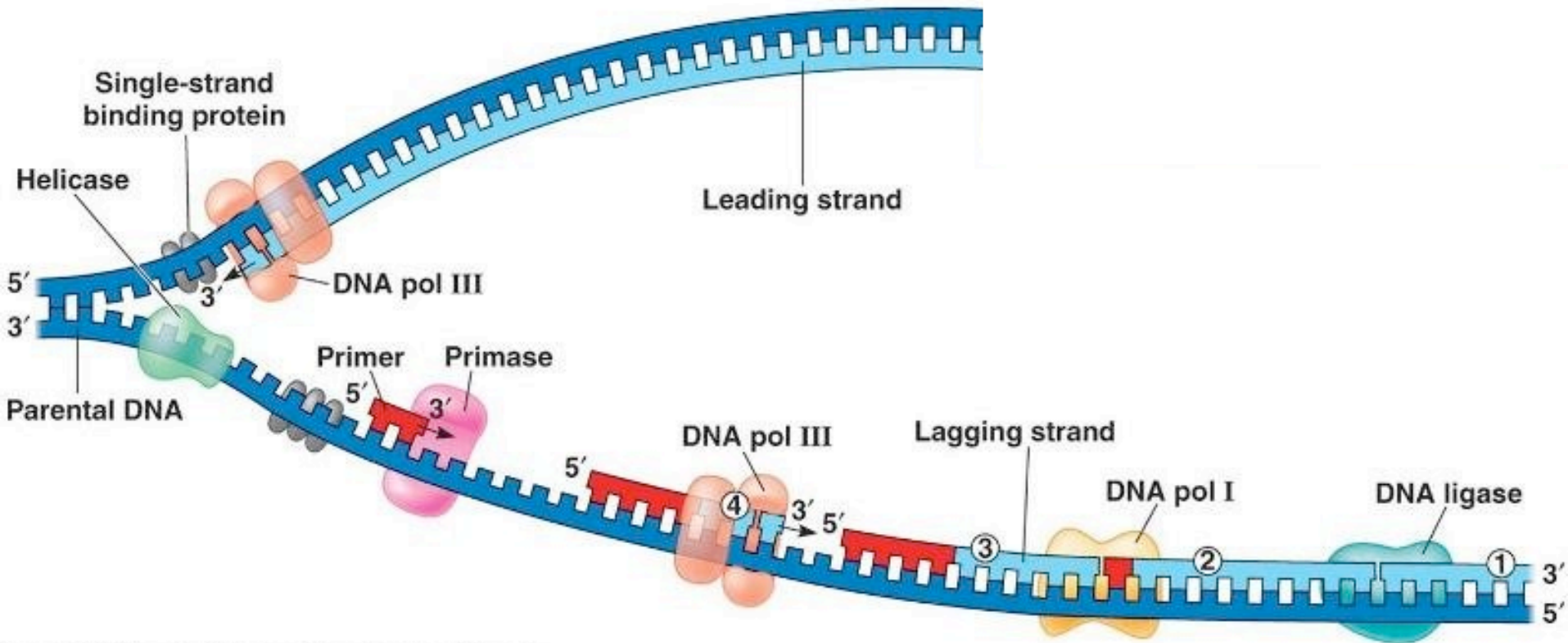
I singoli filamenti fungono da stampo per la sintesi di un nuovo filamento complementare.



MA

La DNA polimerasi ha
attività di sintesi
ESCLUSIVAMENTE in
direzione 5' -> 3':
problema di sintesi
continua di uno dei due
filamenti

La strategia di duplicazione e' diversa sui due filamenti



Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

Viene definito **filamento "guida" (leading)** quello in cui la sintesi di DNA procede in modo continuo, mentre il **filamento "lento" o ritardato (lagging)** è quello in cui la duplicazione avviene attraverso la sintesi di brevi segmenti di DNA, chiamati **frammenti di Okazaki**, lunghi 1000-2000 nucleotidi nei procarioti e 100-200 negli eucarioti.

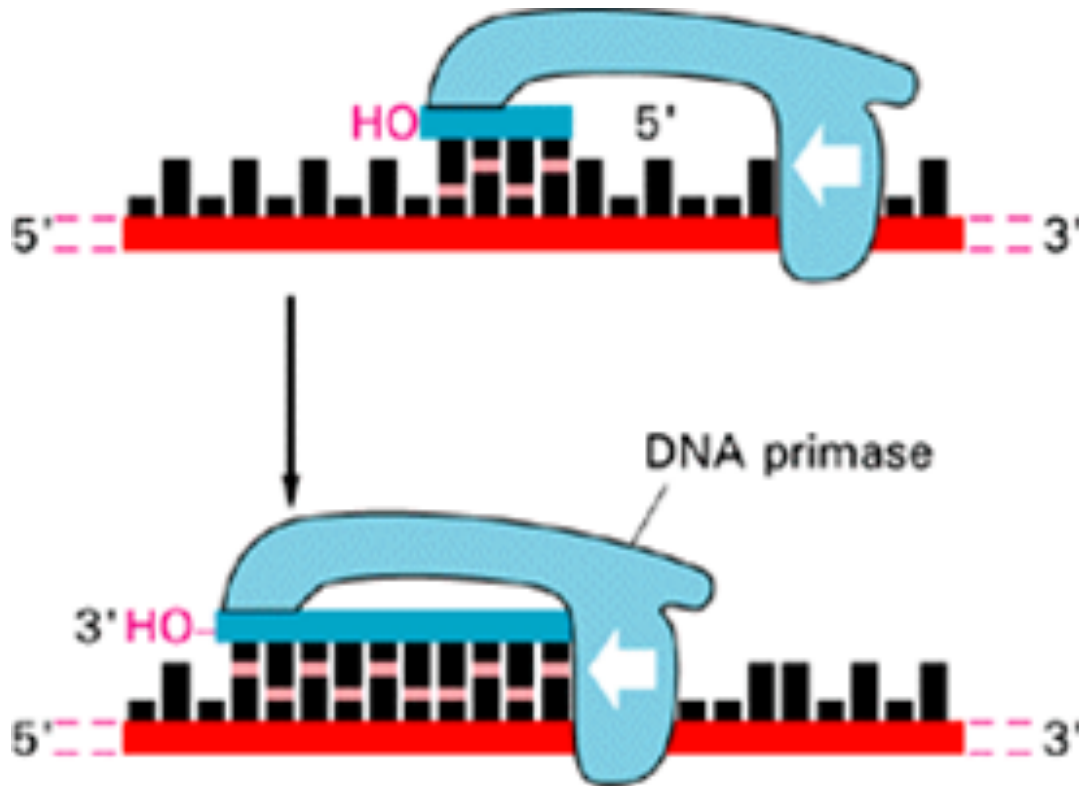
Le DNA Polimerasi richiedono un'estremità di innesco 3'-OH per iniziare la sintesi del DNA.



La Primasi

La primasi e' una speciale **RNA Polimerasi** che produce corti primers di RNA (circa 10 nucleotidi) che servono da innesco per la DNA polimerasi.

Al contrario della DNA polimerasi, la primasi e' in grado di iniziare una nuova catena unendo due ribonucleotidi trifosfati.



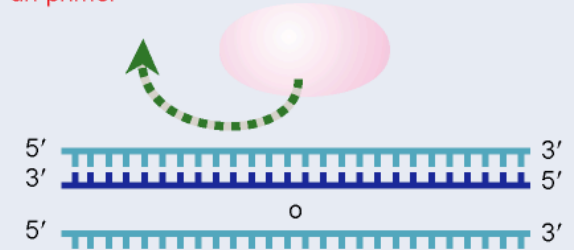
Le DNA Polimerasi richiedono un'estremità di innesco 3'-OH per iniziare la sintesi del DNA.



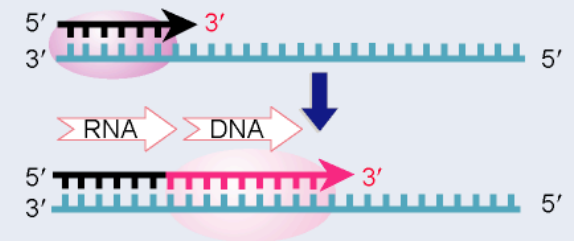
L'innesco può essere una molecola di RNA, un nick nel DNA o una proteina di innesco (virus).

Esistono molti modi per generare estremità 3'-OH

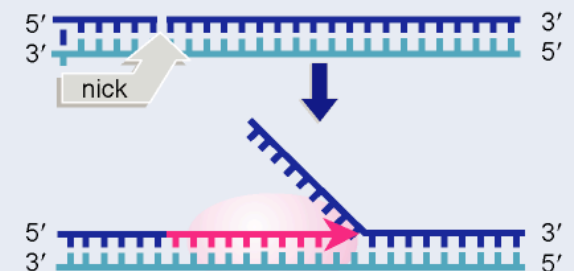
Le DNA polimerasi non possono iniziare la sintesi di DNA su DNA duplex o a singolo filamento senza un primer



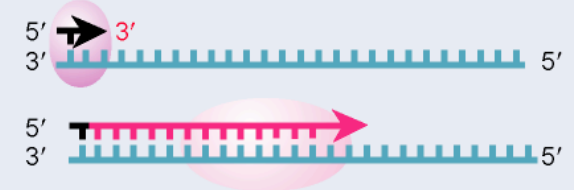
Il primer di RNA è sintetizzato o fornito per appaiamento delle basi



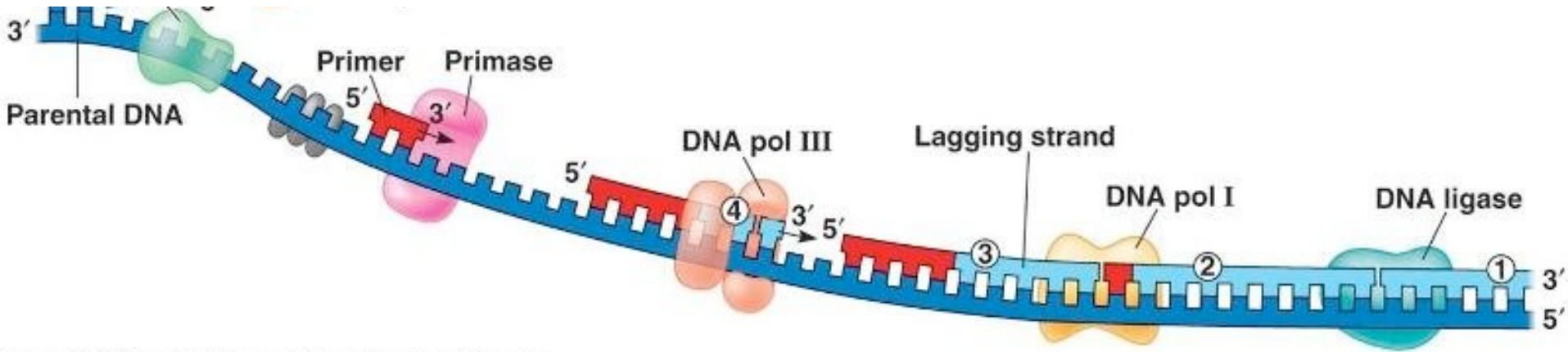
Il DNA duplex è tagliato per fornire l'estremità libera alla DNA polimerasi



Un nucleotide di innesco è fornito da una proteina che si lega al DNA



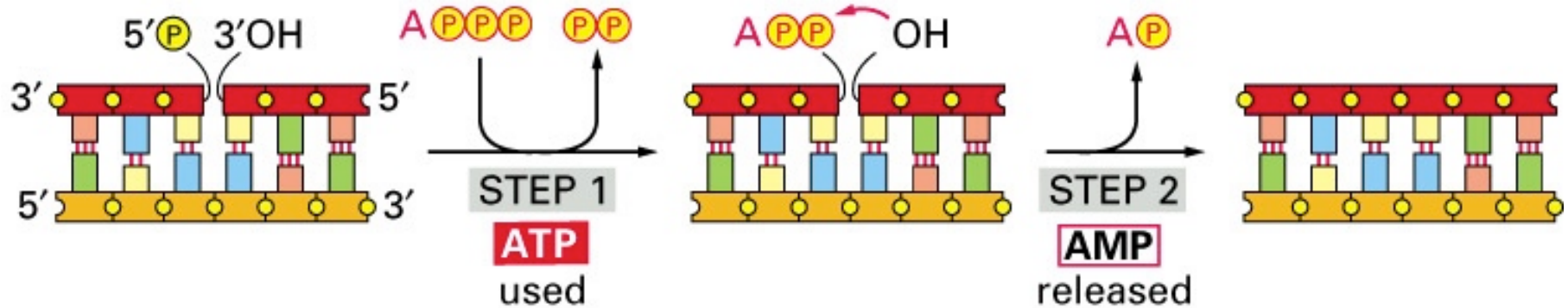
I frammenti di Okazaki



- ✓ I frammenti di Okazaki sono sintetizzati dalla DNA polimerasi III a partire degli inneschi creati dalla Primasi.
- ✓ La DNA polimerasi non è in grado di unire i frammenti.
- ✓ I primers a RNA devono essere sostituiti, in quanto le basi U devono essere sostituite da T.
- ✓ I primers vengono degradati da una Rnasi (RNaseH + FEN1 in eucarioti) e la DNA Polimerasi I li sostituisce con una sequenza di DNA, contenente T e non più U.
- ✓ I singoli frammenti vengono poi uniti dalla DNA Ligasi

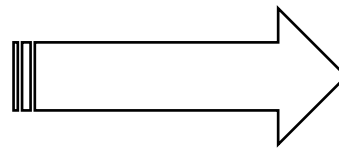
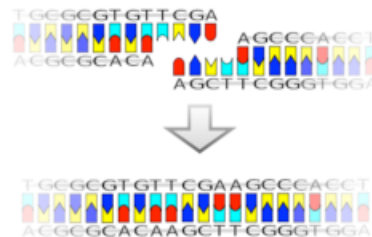
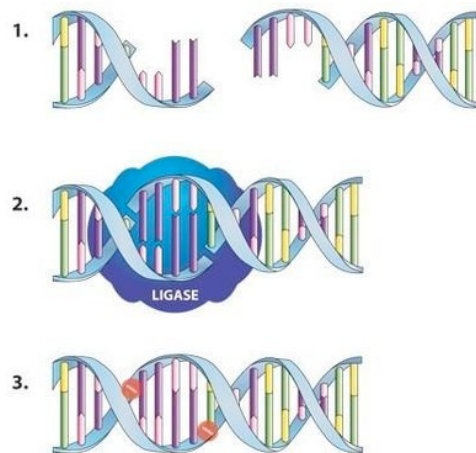
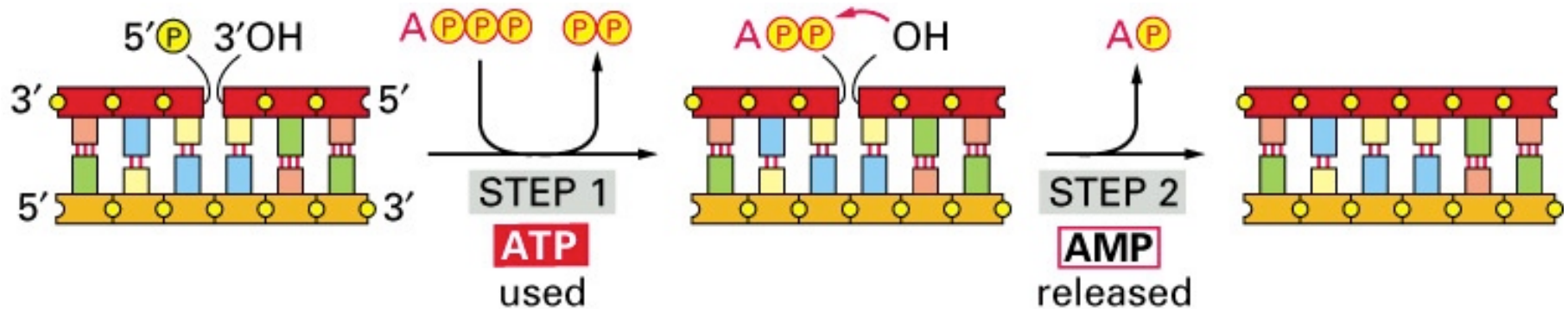
L'azione della DNA Ligasi

La DNA ligasi catalizza la formazione di legami fosfodiesterici tra frammenti di Okazaki



L'azione della DNA Ligasi

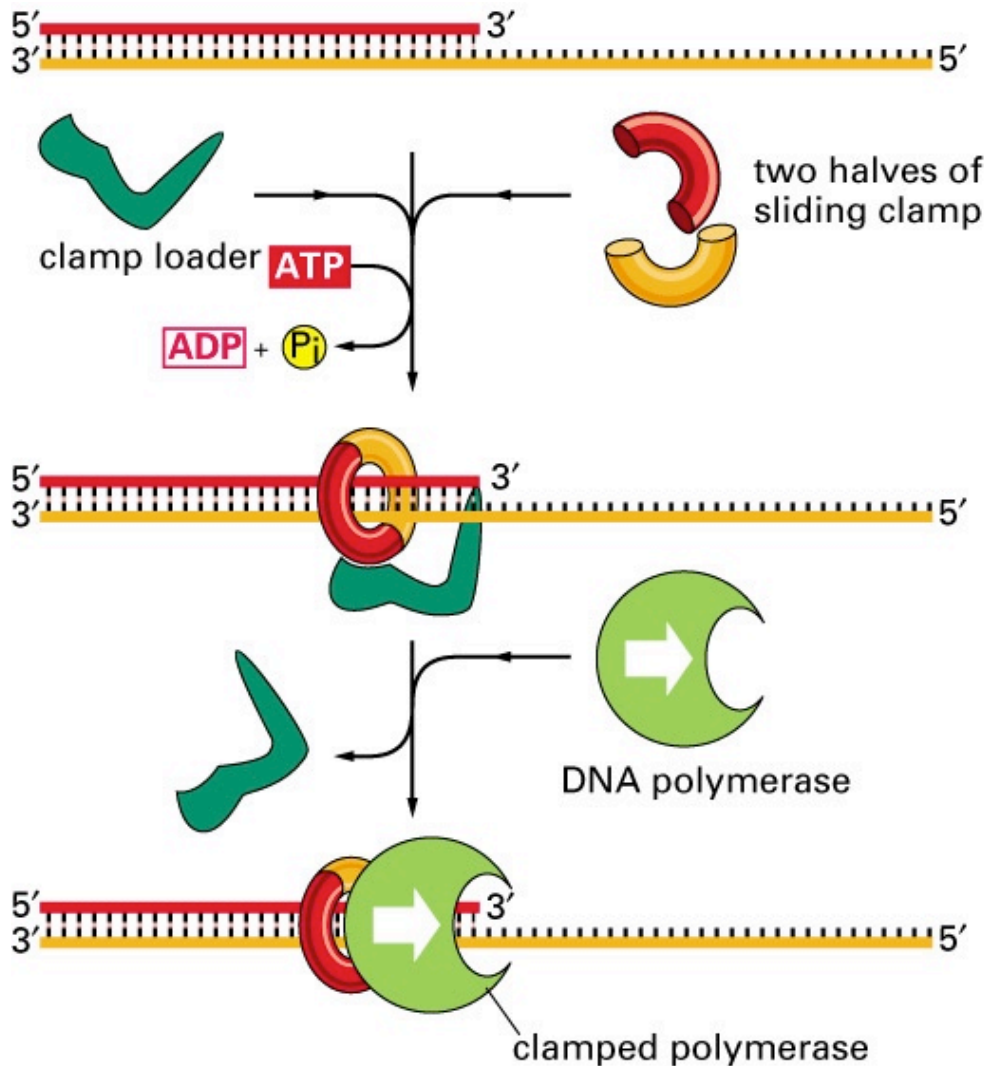
La DNA ligasi catalizza la formazione di legami fosfodiesterici tra frammenti di Okazaki



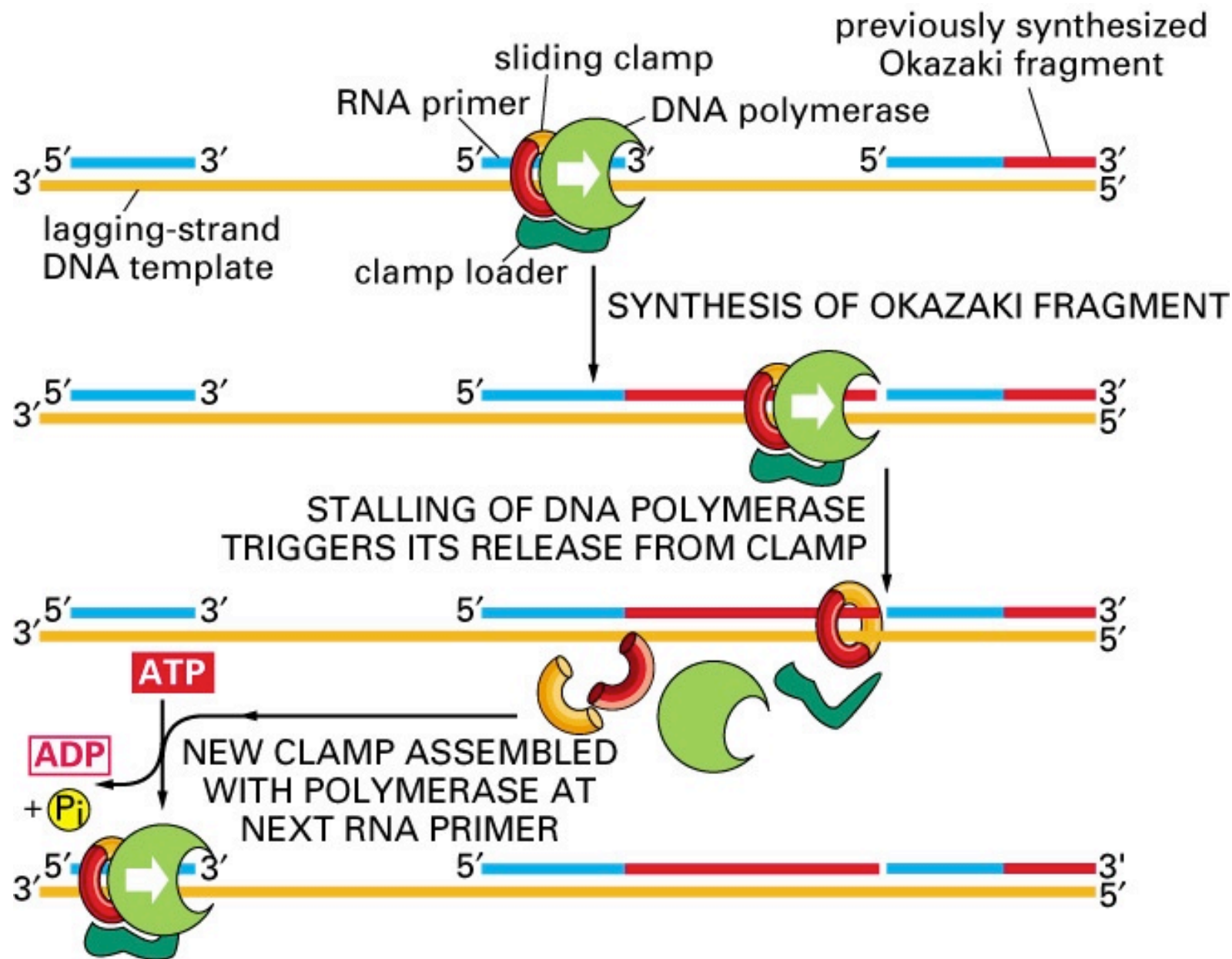
DNApol stays connected to DNA by a sliding ring

A ring clamp keeps the polymerase firmly on the DNA when it is moving on the dsDNA. One side of the ring binds to the back of the DNApol and it slides along DNA as the polymerase moves on.

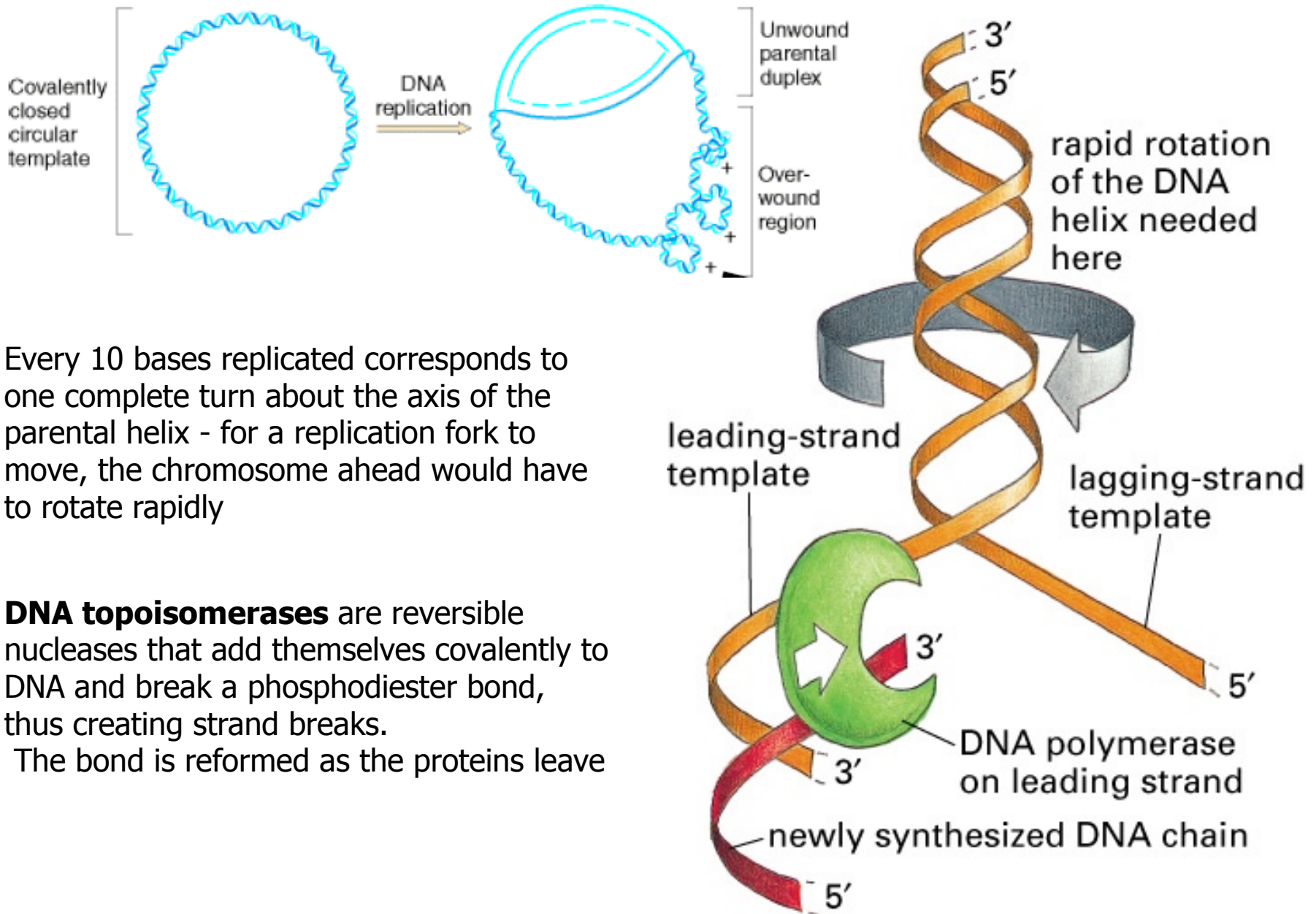
A clamp loader (PCNA) catalyzes the assembly of the multisubunit clamps around the DsDNA.



The assembly of the clamp around the primer-template junction requires ATP hydrolysis by a special protein complex, the **clamp loader**



The winding problem



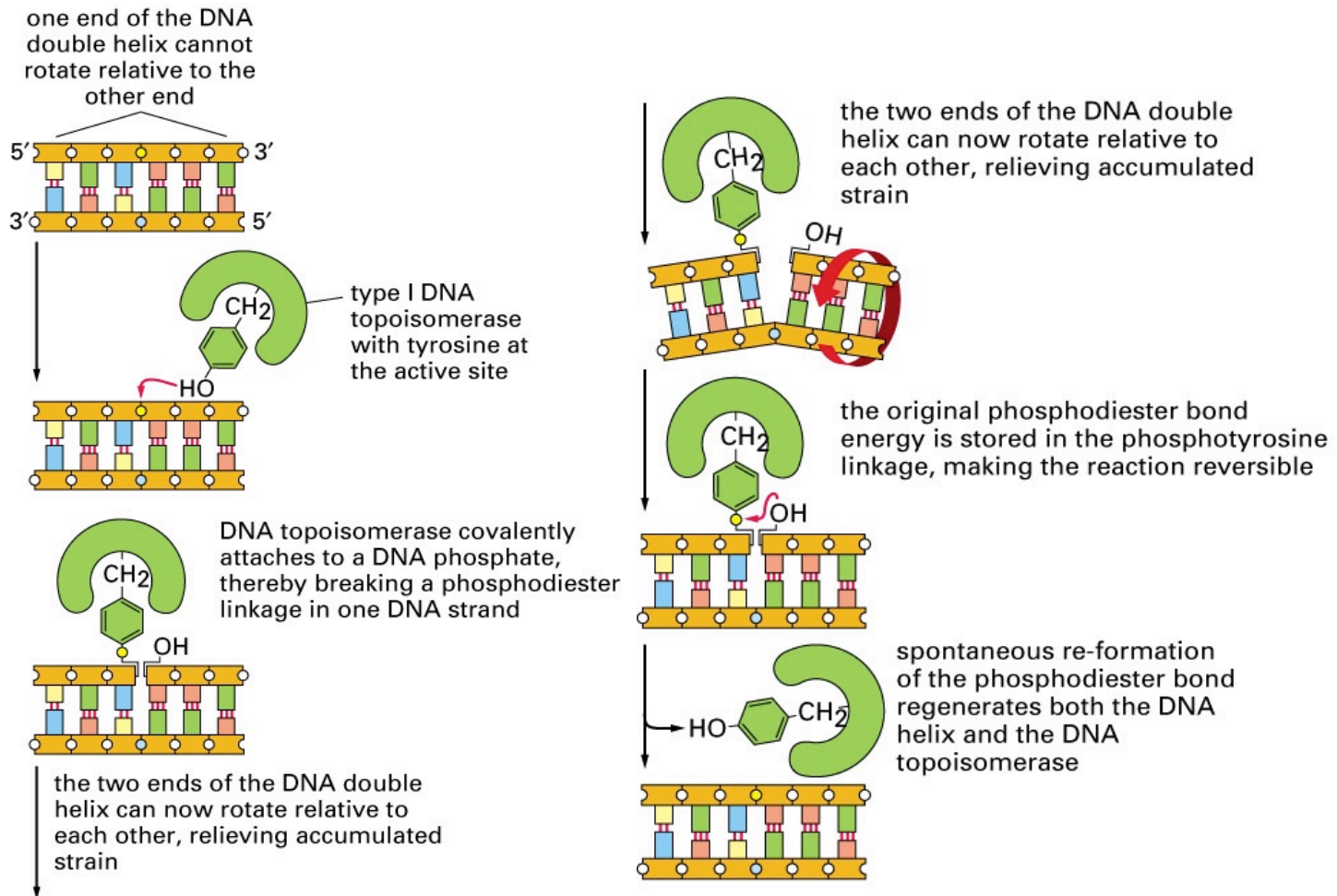
Every 10 bases replicated corresponds to one complete turn about the axis of the parental helix - for a replication fork to move, the chromosome ahead would have to rotate rapidly

DNA topoisomerases are reversible nucleases that add themselves covalently to DNA and break a phosphodiester bond, thus creating strand breaks.

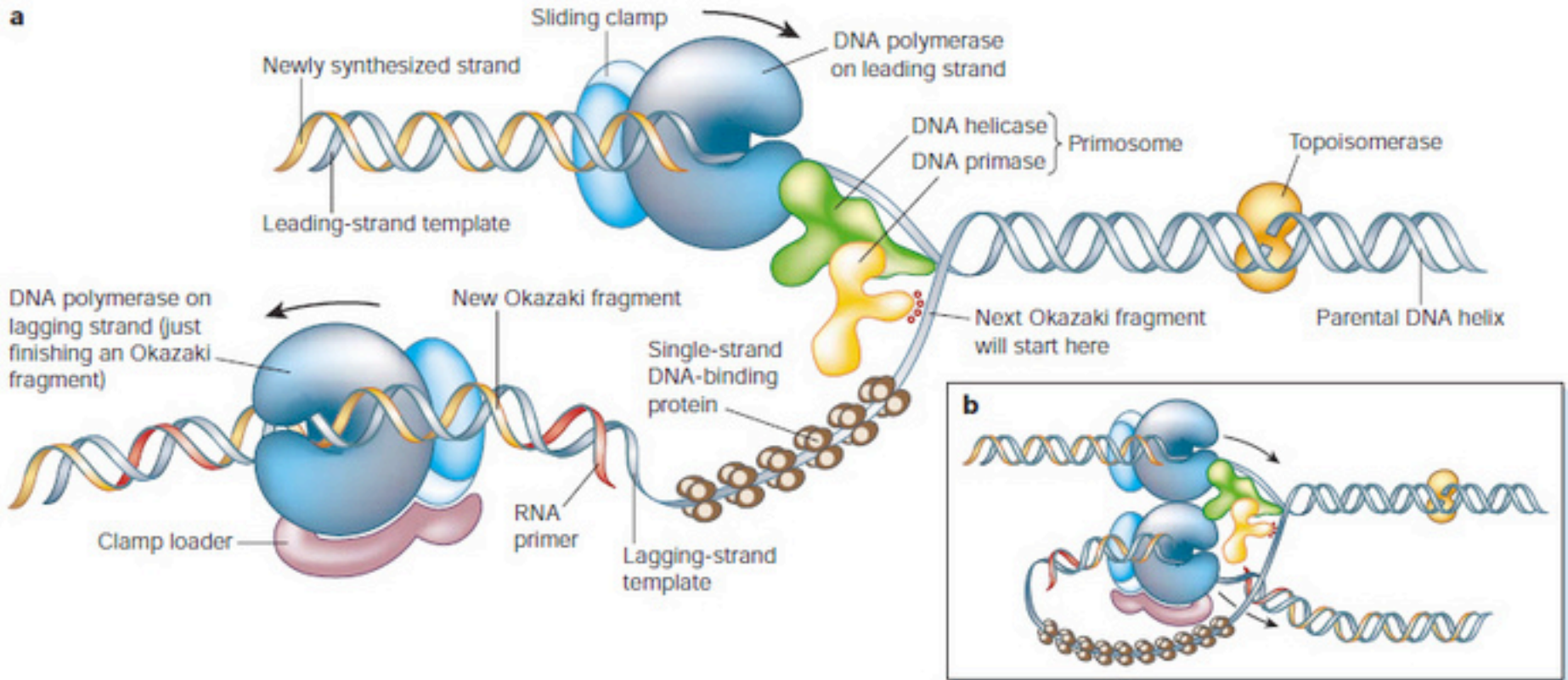
The bond is reformed as the proteins leave

Topoisomerasi

TOPOISOMERASI I: formano un nick transiente su un singolo filamento permettendo alle due parti dell'elica di ruotare liberamente l'una rispetto all'altra.

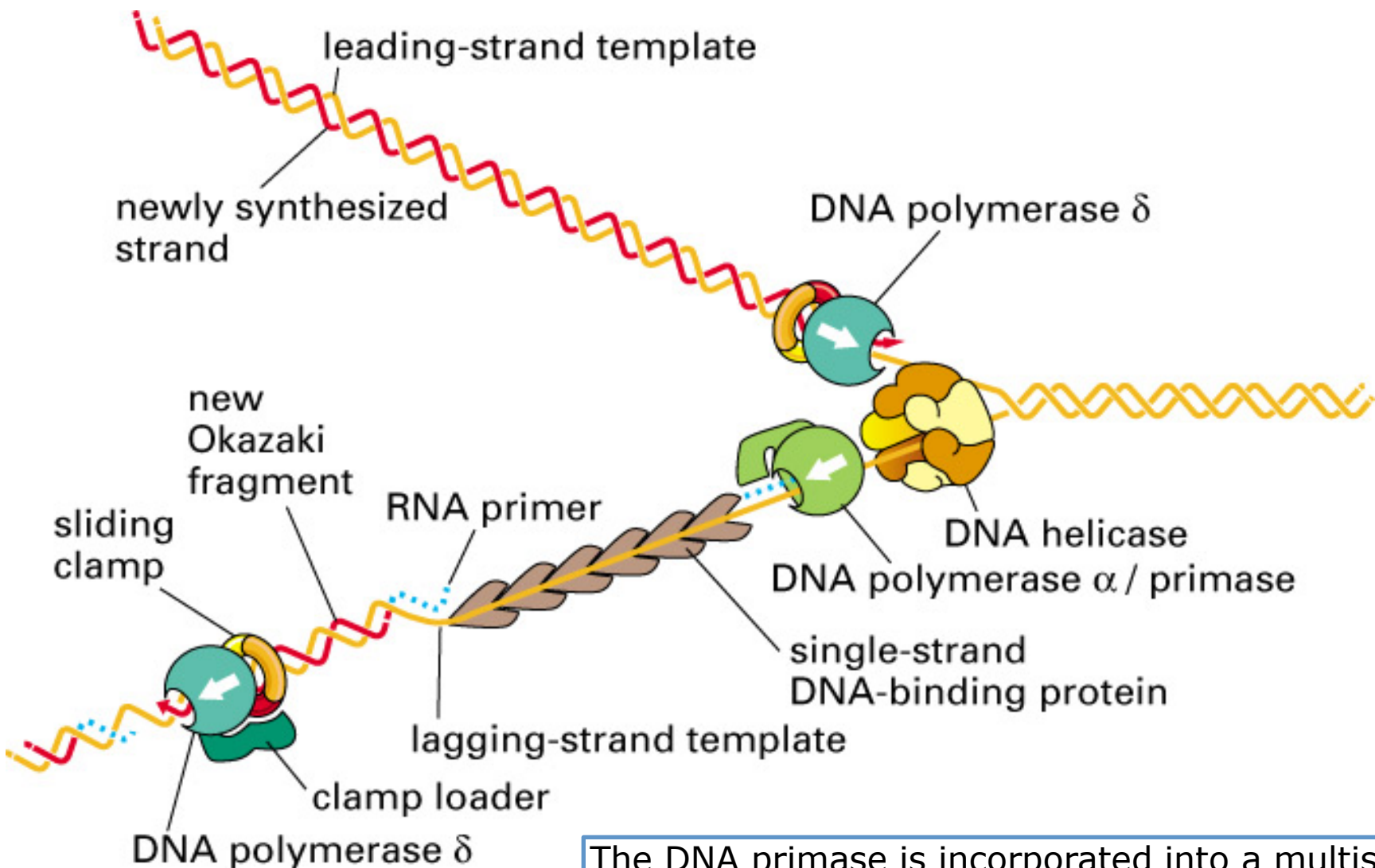


The proteins at a replication fork form a multienzyme replication machine



A special arrangement, with a lagging strand folded back facilitates the loading of the polymerase clamp each time that an Okazaki fragment is synthesized. The replication proteins are linked together into a single large unit, that moves rapidly along the DNA, enabling DNA to be synthesized on both sides of the replication fork in a coordinated manner

DNA replication is similar in eucaryotes and bacteria

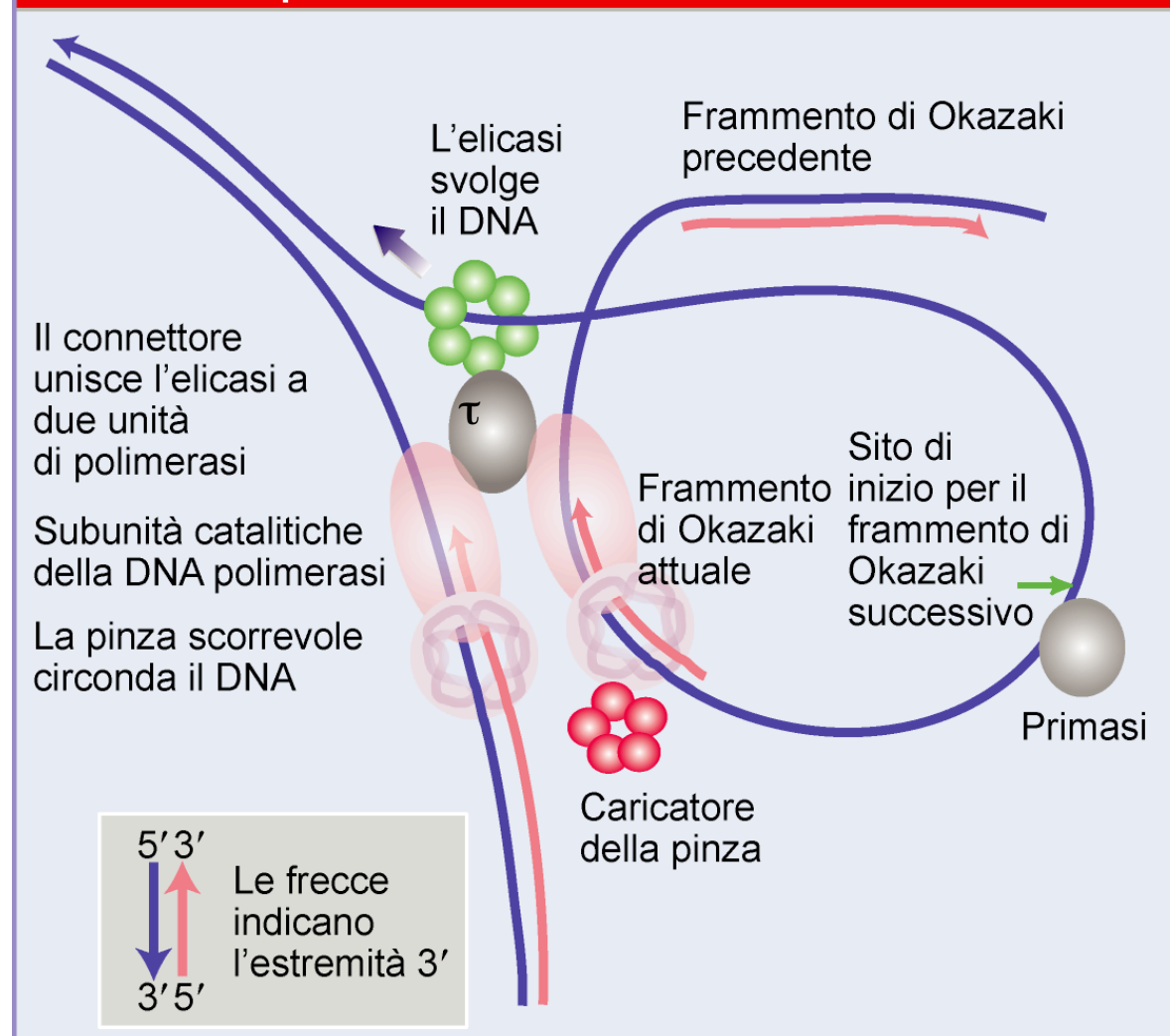


The DNA primase is incorporated into a multisubunit polymerase alpha. DNA polymerase delta then synthesizes the remainder of each Okazaki fragment

Tabella 6.2 Comparazione tra le proteine più note coinvolte nella replicazione del DNA negli eucarioti e nella replicazione del DNA di *E. coli*.

<i>E. coli</i>	Eucarioti	Struttura e funzione della proteina negli eucarioti
DnaA	ORC (T-Ag in SV-40)	Riconoscimento dell'origine; è costituita da 6 subunità
DnaB-DnaC	MCM 2-7 (T-Ag in SV-40)	DNA elicasi; è costituita da 6 subunità
DnaG (primasi)	DNA polimerasi α -primasi	La polimerasi che sintetizza gli RNA primer e corte catene di DNA sul filamento ritardato; è composta da 4 subunità
Subunità α di Pol III	DNA polimerasi δ e DNA polimerasi ϵ	Le due polimerasi replicative; ciascuna composta da 4 subunità
Subunità β di Pol III	PCNA	La proteina che forma la "clamp" che avvolge e scivola sul DNA; è un omotrimerico
Complesso- γ di Pol III	RFC	Il complesso che carica la "clamp" sul DNA; è composto da 5 subunità
SSB	RPA	La proteina che stabilizza il DNA a singolo filamento (ssDNA); è composta da 3 subunità
Pol I	FEN1, RNasi H	Nucleasi che eliminano gli RNA primer dai frammenti di Okazaki
Lig 1	DNA ligasi I	La DNA ligasi che salda i frammenti di Okazaki

Le DNA replicasi hanno una serie di funzioni in comune



L'elicasi (DnaB) che crea la forcella di replicazione è connessa a due subunità catalitiche della DNA Pol dalla subunità τ , ciascuna delle quali è tenuta al DNA dalla pinza scorrevole. La pol che sintetizza il frammento stampo si muove continuamente, mentre quella che sintetizza il filamento ritardato si dissocia alla fine di un frammento di Okazaki e si riassocia con un primer nell'ansa stampo a singolo filamento per sintetizzare il frammento successivo.