

Lezione 6

La replicazione del DNA nei procarioti e negli eucarioti

- Il meccanismo semiconservativo.
- Le origini di replicazione, la formazione del complesso d'inizio e la forcella replicativa.
- Lo srotolamento del DNA: le DNA elicasi e le topoisomerasi.
- La primasi e l'innesco della replicazione.
- Le DNA polimerasi e le attività di correzione degli errori.
- Il filamento continuo e discontinuo e i frammenti di Okazaki.
- La rimozione dell'RNA e la DNA ligasi.
- La funzione dei telomeri e delle telomerasi.
- I telomeri e la senescenza replicativa.

Stabilità Genetica e Mutazioni

- La sopravvivenza di un organismo richiede **alta stabilità genetica**.
- I processi di mantenimento del DNA falliscono raramente → ma quando accade si verifica un **cambiamento permanente nella sequenza del DNA**.
- Questo cambiamento prende il nome di **mutazione**.
- Una mutazione può essere letale se colpisce una **posizione vitale** del genoma.

Frequenza delle mutazioni in E. coli

- **Circa 3 cambiamenti nucleotidici ogni 10^{10} nucleotidi copiati.**
- Nota: molte mutazioni sono silenti → sottostima della frequenza reale.

Frequenza delle mutazioni nell'uomo

- Confronto genitori–figli mostra: ~70 nuove mutazioni a singolo nucleotide per figlio/figlia.
- **Frequenza: 1 mutazione ogni 10^8 nucleotidi per generazione.**
- Stima leggermente bassa: alcune mutazioni germinali sono letali → assenti nella progenie.
- Tuttavia: solo una piccola parte del genoma è essenziale → effetto trascurabile.

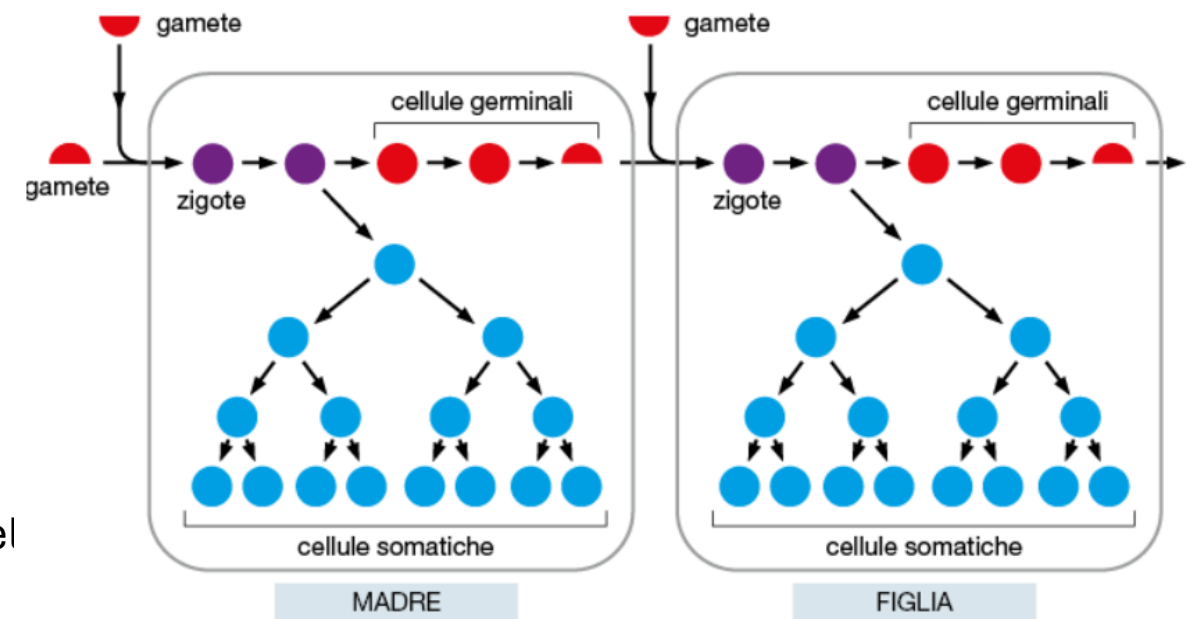
Stabilità come Condizione Vitale

Organismi sessuali: due tipi cellulari fondamentali.

- **Cellule germinali** → trasmettono l'informazione genetica alla progenie.
- **Cellule somatiche** → formano il corpo dell'organismo.

Protezione necessaria:

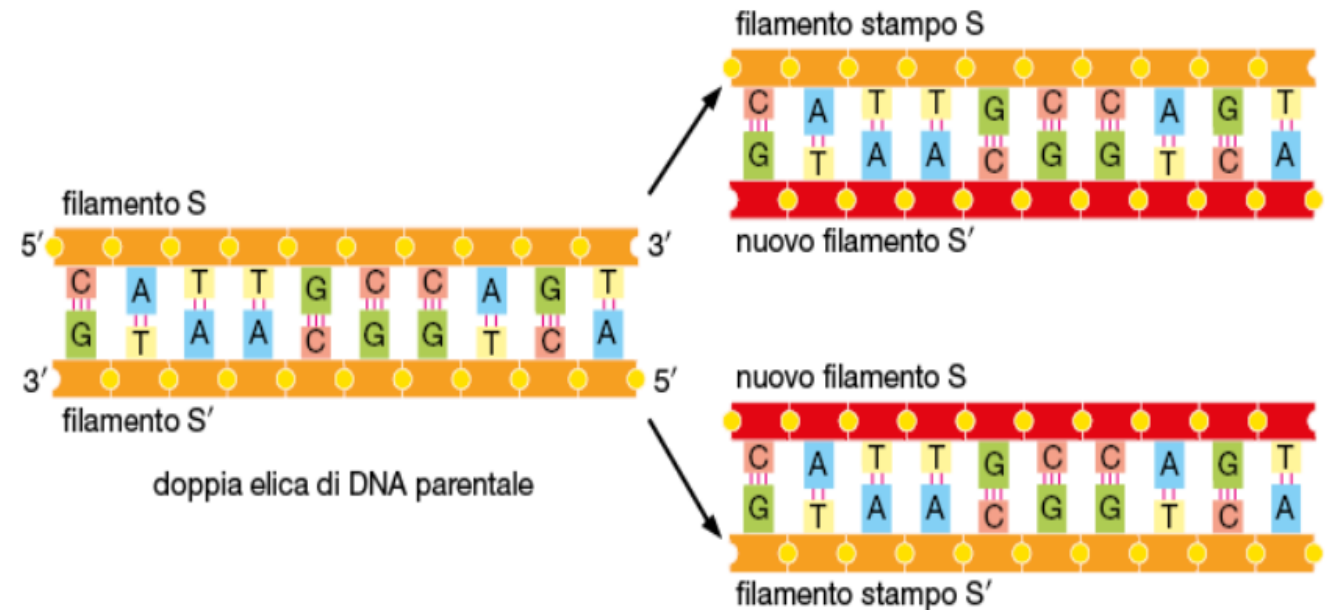
- **Germinali** → per mantenere la specie.
- **Somatiche** → per salvaguardare l'organizzazione del corpo ed evitare mutazioni dannose.

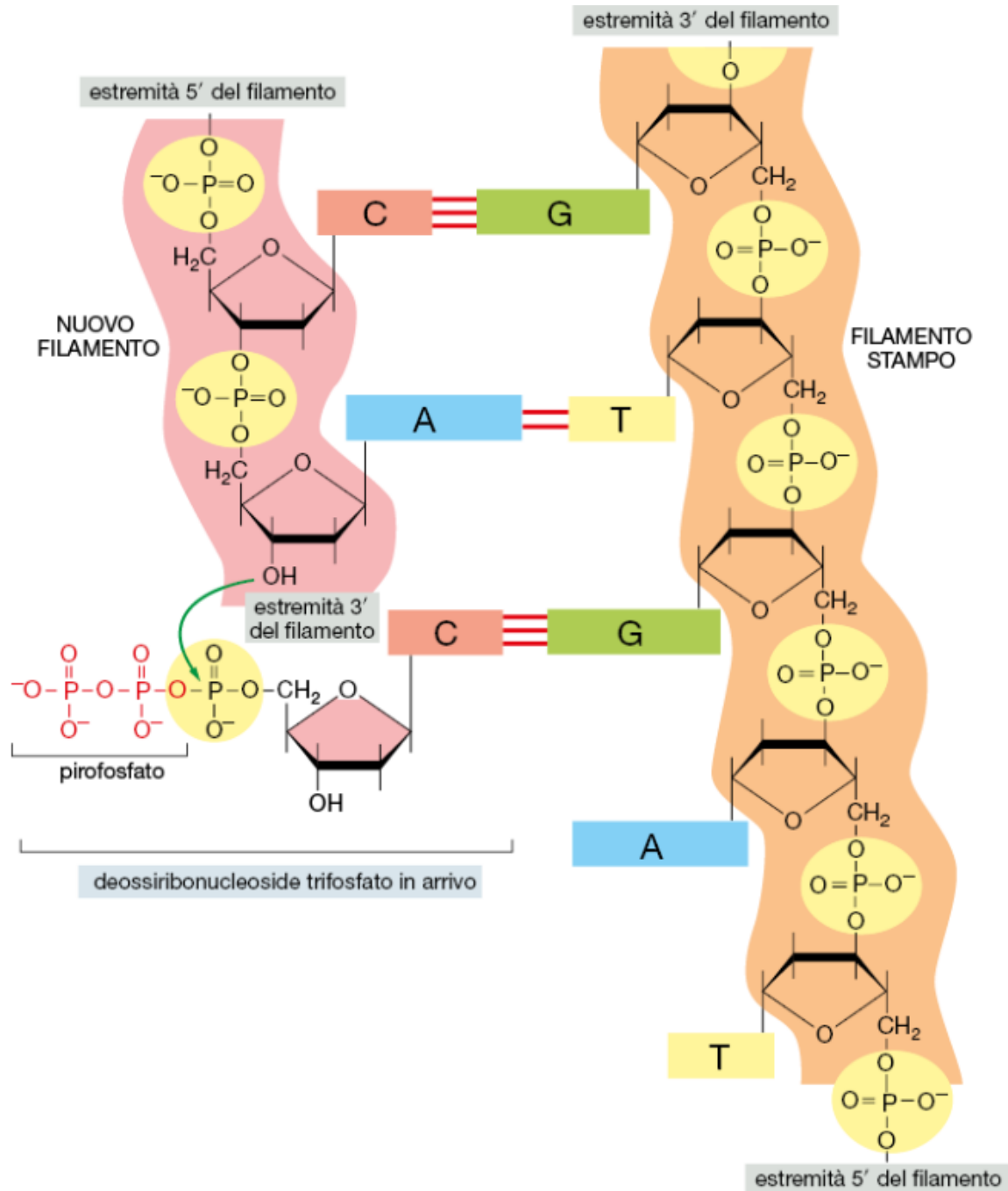


- Organismi pluricellulari come l'uomo dipendono dalla **fedeltà della replicazione del DNA** per:
 - **Mantenere la stabilità delle cellule germinali** → continuità della specie.
 - **Mantenere la stabilità delle cellule somatiche** → prevenzione del cancro.
- La stabilità genetica è quindi una condizione indispensabile sia per la **sopravvivenza dell'individuo** che per la **perpetuazione della specie**.

Necessità della replicazione - Fondamento della replicazione

- Tutti gli organismi devono duplicare il proprio DNA con **straordinaria accuratezza** prima di ogni divisione cellulare.
- La duplicazione è affidata a una **macchina di replicazione**, complesso enzimatico altamente specializzato.
- Velocità del processo: fino a **1000 nucleotidi al secondo**.
- L'appaiamento complementare tra le basi è alla base di:
 - **Replicazione** del DNA.
 - **Riparazione** del DNA.
- Meccanismo:
 - Separazione della doppia elica → due filamenti stampo.
 - Riconoscimento dei nucleotidi esposti da parte di **nucleotidi complementari liberi**.
 - Appaiamento corretto guida la polimerizzazione del nuovo filamento.



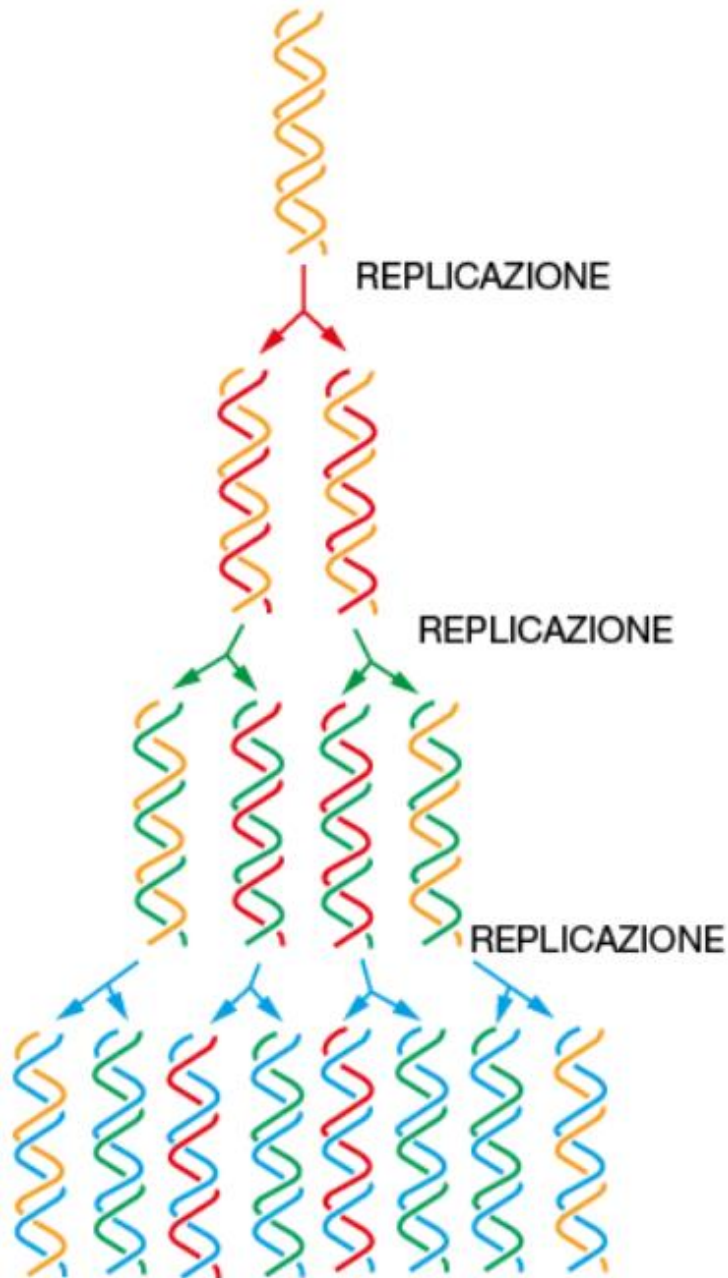


DNA come stampo

- Ogni filamento della doppia elica (S e S') funge da **stampo**.
- A → si appaia solo con T.
- G → si appaia solo con C.
- Risultato:
 - Copia precisa di entrambi i filamenti.
 - Si ottengono due **doppie eliche identiche** all'originale.
- → Principio della **replicazione semiconservativa**.

Reazione di polimerizzazione

- Reazione base: aggiunta di un nucleotide all'estremità **3'-OH** del filamento nascente.
- Direzione di sintesi: **5' → 3'**.
- Energia della reazione:
 - Deriva dall'idrolisi del legame fosfato ad alta energia del dNTP.
 - Rilascio di **pirofosfato (PPi)** → successiva idrolisi in 2 fosfati inorganici.



DNA come stampo

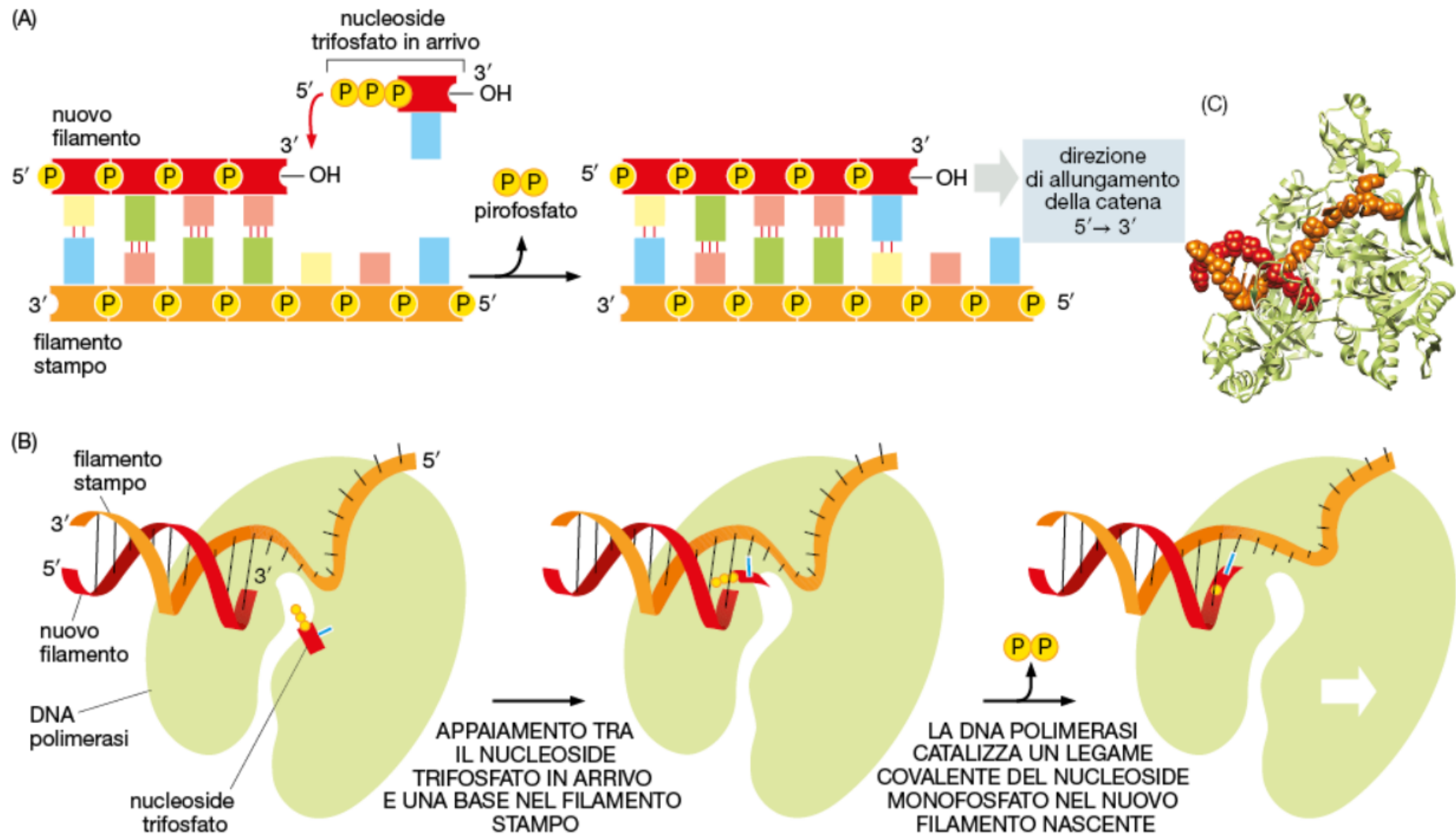
- Ogni filamento della doppia elica (S e S') funge da **stampo**.
- A → si appaia solo con T.
- G → si appaia solo con C.
- Risultato:
 - Copia precisa di entrambi i filamenti.
 - Si ottengono due **doppie eliche identiche** all'originale.
- → Principio della **replicazione semiconservativa**.

Reazione di polimerizzazione

- Reazione base: aggiunta di un nucleotide all'estremità **3'-OH** del filamento nascente.
- Direzione di sintesi: **5' → 3'**.
- Energia della reazione:
 - Deriva dall'idrolisi del legame fosfato ad alta energia del dNTP.
 - Rilascio di **pirofosfato (PPi)** → successiva idrolisi in 2 fosfati inorganici.

Ruolo della DNA polimerasi

- **Catalizza** la formazione del **legame fosfodiesterico**.
- **Guida** il nucleotide in **arrivo** verso il filamento stampo.
- Lo **posiziona correttamente** per la reazione chimica con il gruppo **3'-OH** del filamento in crescita.
- Movimento della polimerasi: indicato dalla freccia bianca, **scorre sul filamento di DNA**



La Scoperta della Forcella di Replicazione

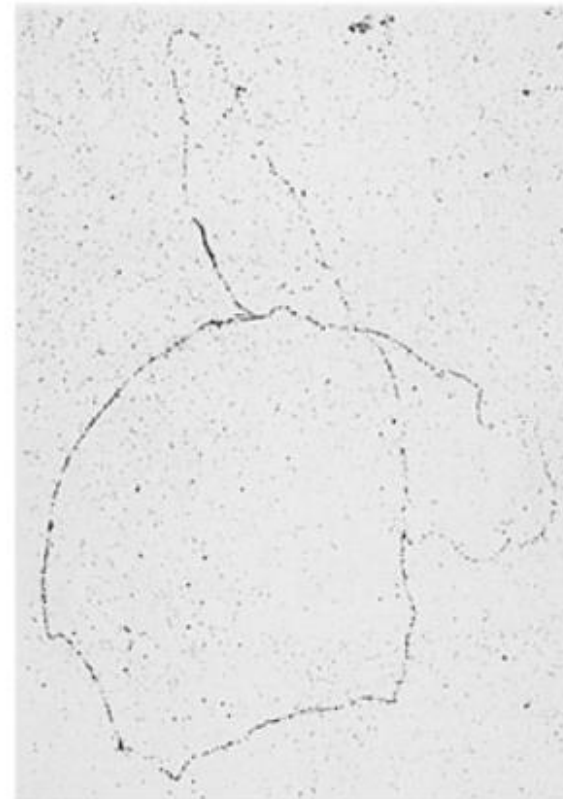
Analisi sul cromosoma di **E. coli** (anni '60) rivelarono:

- Esistenza di una **regione di replicazione localizzata** che si sposta lungo il DNA.
- Struttura a **forma di Y** → **forcella di replicazione** (Figura 5.6).

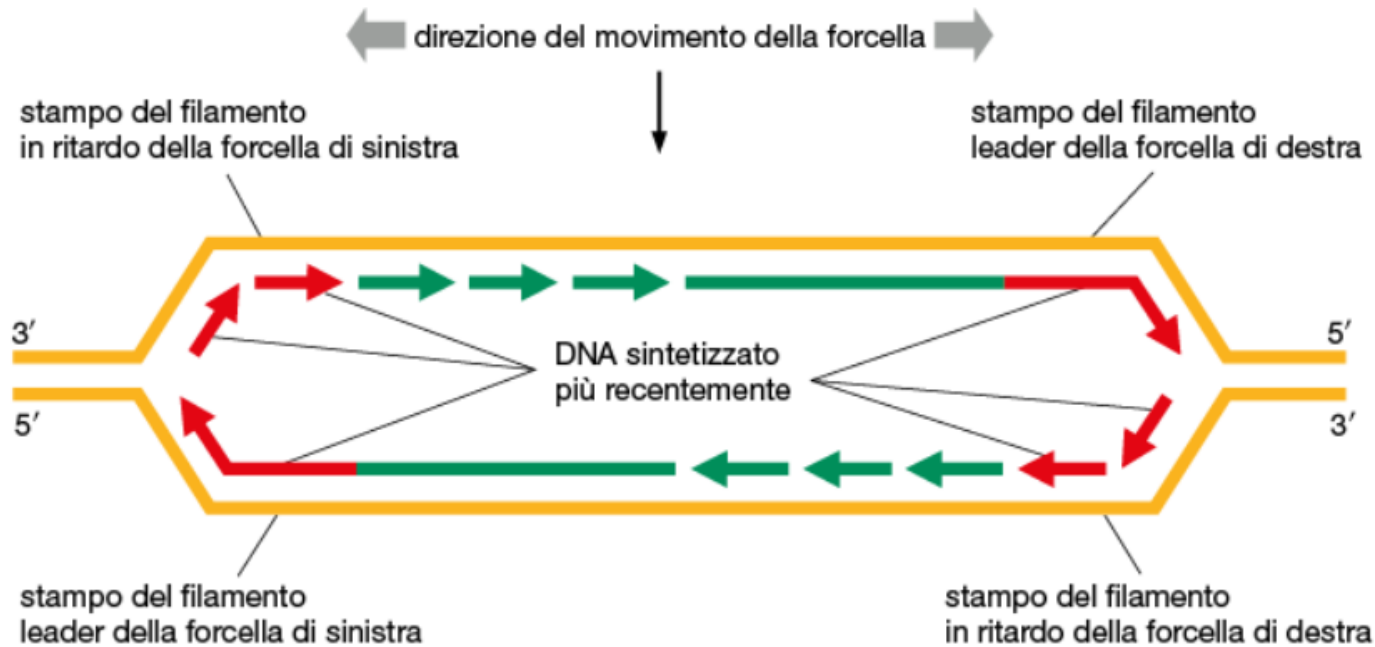
•Struttura:

- **Stelo della Y** = DNA parentale.
- **Bracci della Y** = DNA di nuova sintesi.

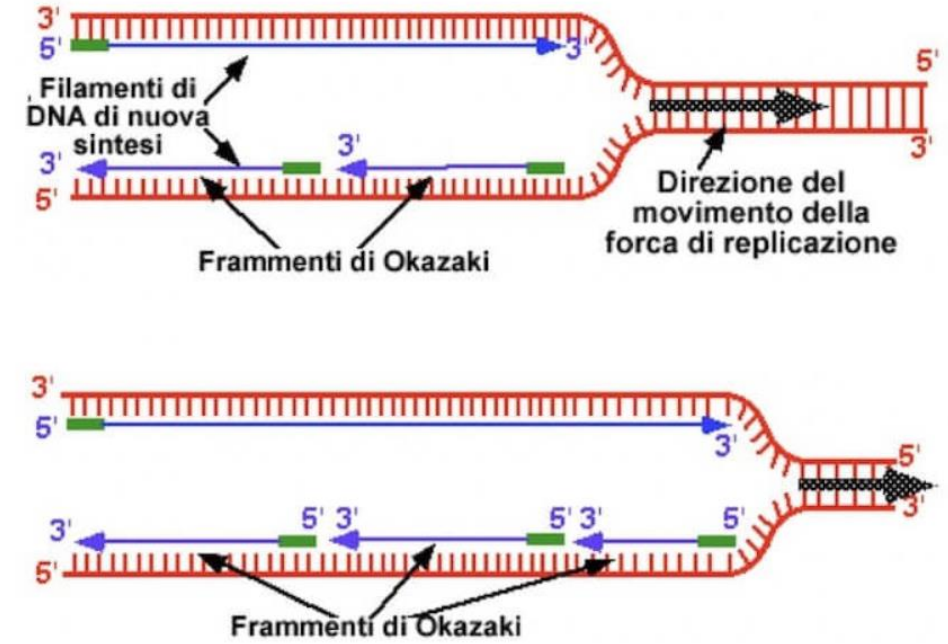
Due forcelle si muovono in direzioni opposte lungo il cromosoma circolare di E. coli.



Problema dell'Orientamento Antiparallelo: Frammenti di Okazaki

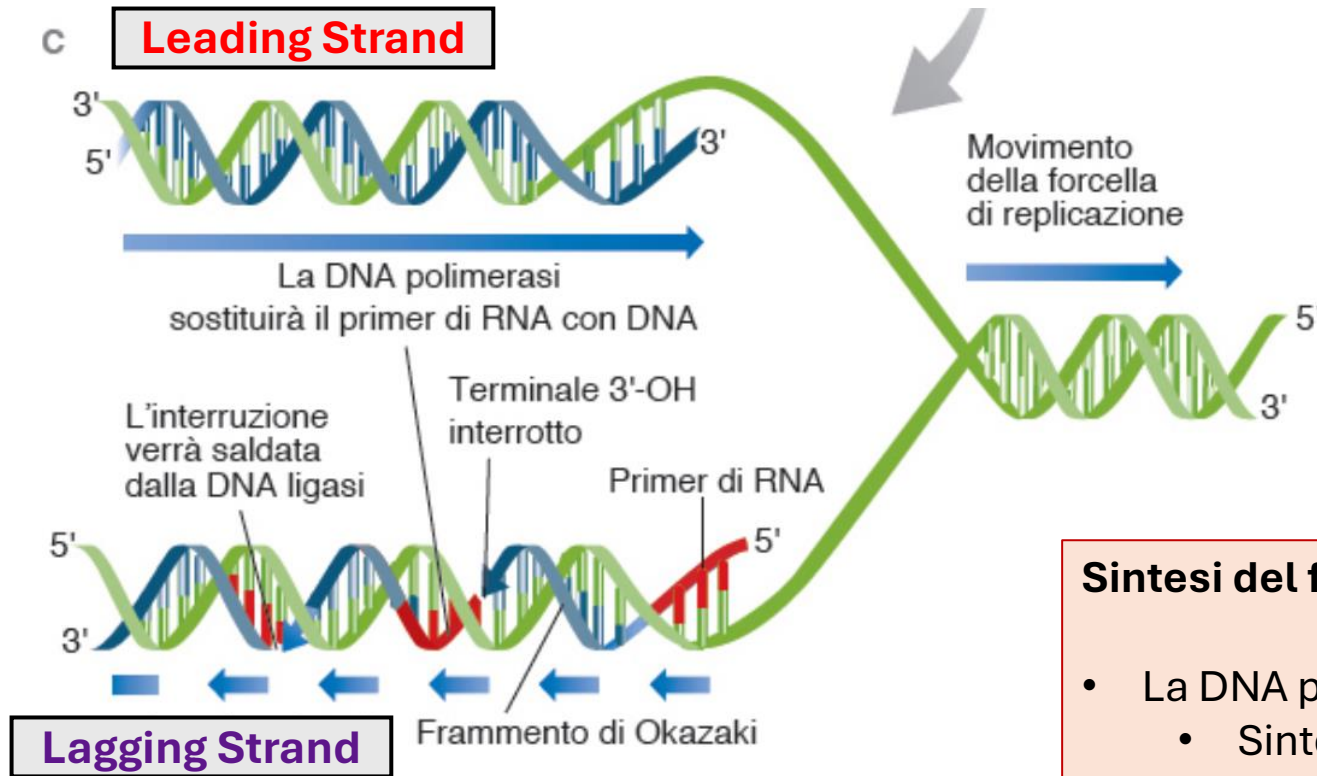


- DNA: i due filamenti parentali hanno orientamento opposto (antiparallelo).
- Ma le **DNA polimerasi funzionano solo in direzione 5'→3'.**



- Identificazione di **segmenti transitori di DNA → frammenti di Okazaki.**
 - Lunghi 1000–2000 nucleotidi in procarioti.
 - Lunghi 100–200 nucleotidi in eucarioti.
- Conclusione: **anche il filamento ritardo, apparentemente “invertito”, è sintetizzato a piccoli tratti in direzione 5'→3'.**

Filamento Guida e Filamento in Ritardo



Struttura della forcella = asimmetrica.

- **Filamento leader (o guida):**
 - **Sintetizzato in modo continuo.**
 - La sintesi avanza insieme alla forcella.
- **Filamento in ritardo:**
 - **Sintetizzato in modo discontinuo.**
 - Serie di brevi frammenti → poi uniti in un filamento continuo.
 - Processo noto come “**cucitura all’indietro**”.

Sintesi del filamento in ritardo

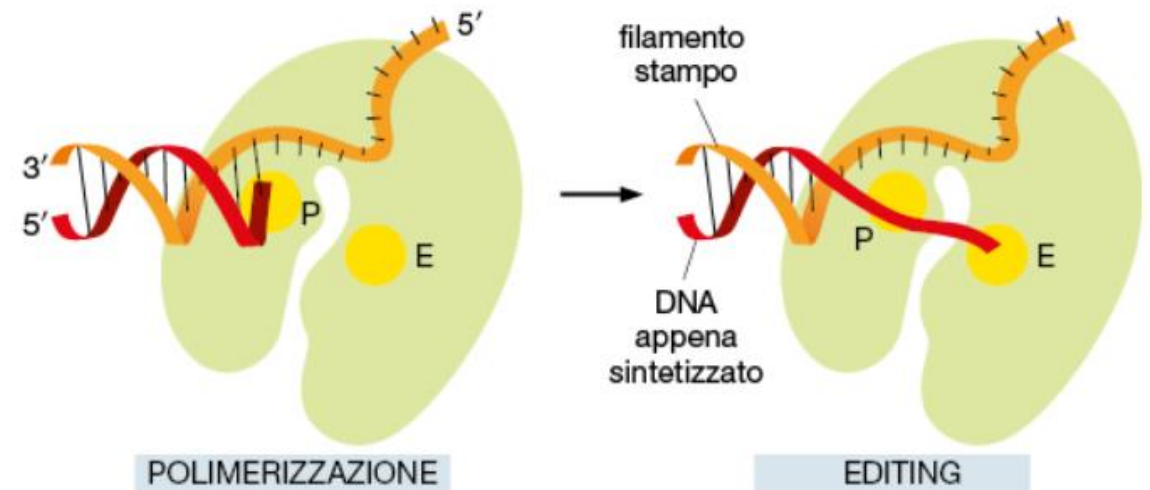
- La DNA polimerasi del filamento in ritardo funziona sempre **5'→3'**:
 - Sintetizza a partire da un breve frammento (Okazaki).
 - Si ferma.
 - Viene riportata vicino alla forcella.
 - Riprende la sintesi dal frammento successivo.
- In questo modo, entrambi i filamenti vengono copiati usando **solo DNA polimerasi con direzione di sintesi 5'→3'**

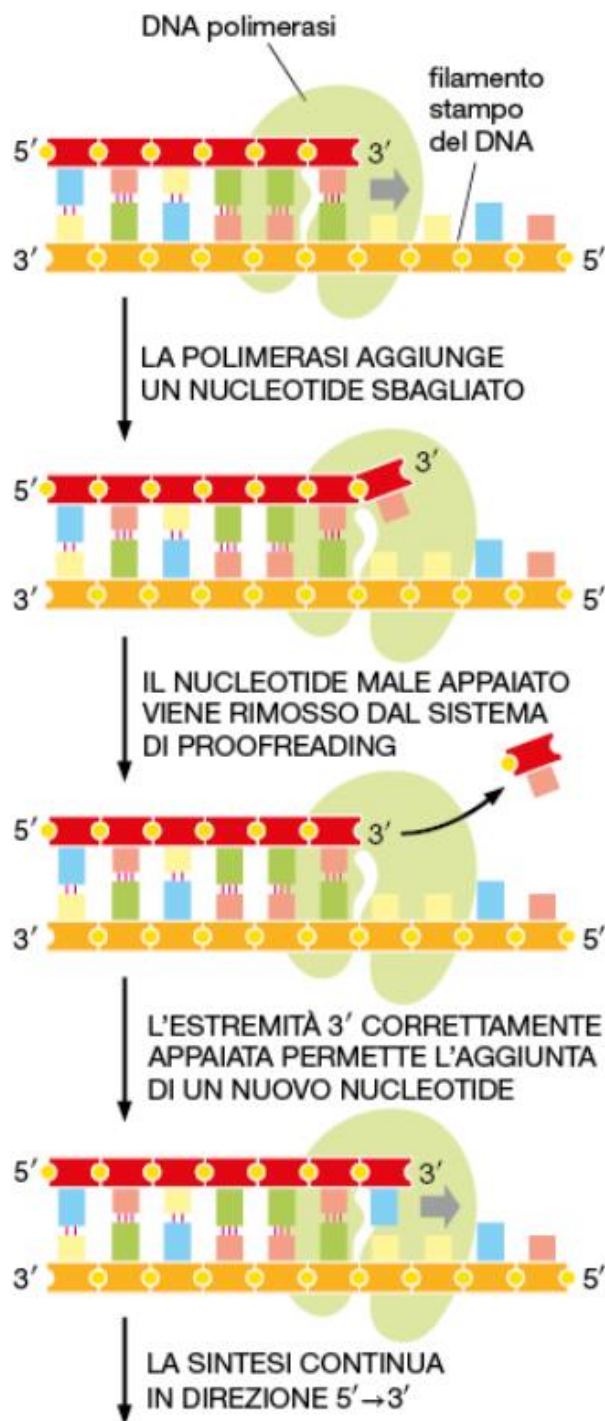
Accuratezza della Replicazione: Proofreading

- Fedeltà della replicazione del DNA: **~1 errore ogni 10^{10} nucleotidi copiati**.
- Questo livello di precisione è superiore a quanto atteso solo dall'appaiamento tra basi complementari.
- Possibili errori:
 - **Appaiamenti anomali** (es. **G–T** con due legami idrogeno).
 - Forme **tautomeriche rare** delle basi (rapporto 1 su 10^4 – 10^5) → appaiamenti scorretti ma **geometricamente compatibili**.

L'alta fedeltà dipende da **più meccanismi di correzione sequenziali**:

1. **Controllo conformazionale della DNA polimerasi** prima dell'aggiunta covalente.
2. **Proofreading esonucleolitico** dopo inserzione errata.
3. **Riparazione degli appaiamenti sbagliati (mismatch repair)** a valle





Primo passaggio: controllo conformazionale

- Dopo l'appaiamento ma prima del legame covalente:
 - La polimerasi subisce un **cambiamento conformazionale**.
 - **Le sue “dita” si chiudono attorno al sito attivo.**
- Questo cambiamento è **più facile se l'appaiamento è corretto**.
- Risultato: i nucleotidi sbagliati hanno minore probabilità di essere incorporati → tendono ad allontanarsi

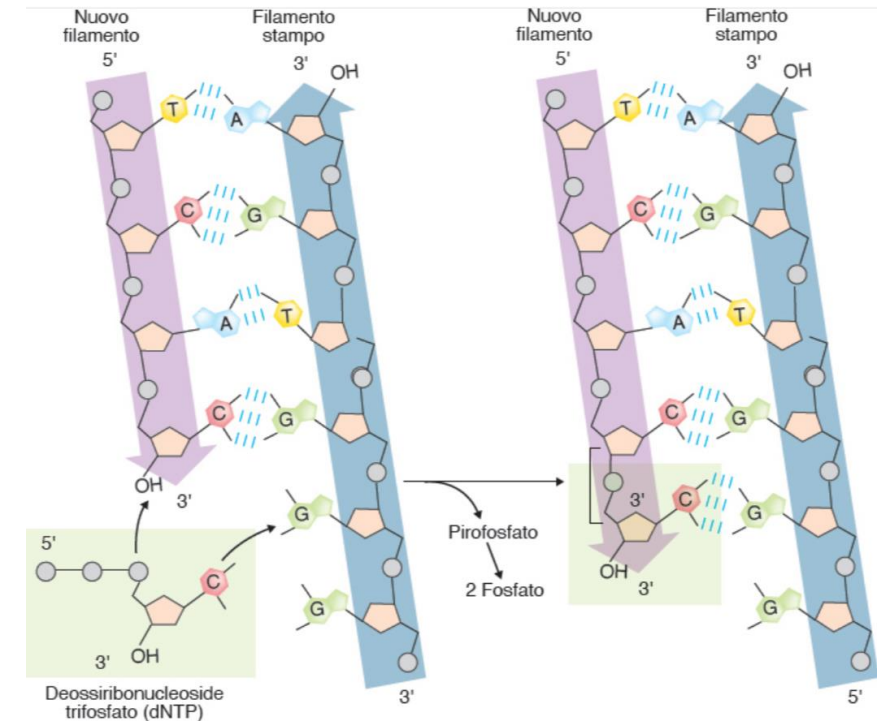
Proofreading esonucleolitico

- **Se un nucleotide errato viene incorporato:**
 - La DNA polimerasi non può proseguire efficacemente, perché richiede un'estremità **3'-OH correttamente appaiata**.
- **La polimerasi utilizza un sito catalitico separato** (o dominio separato).
 - Attività **3'→5' esonucleasica** → rimozione del nucleotide mal appaiato.
 - **Sintesi riprende** dopo aver ripristinato un'estremità 3'-OH corretta.

Necessità della direzione 5'→3'

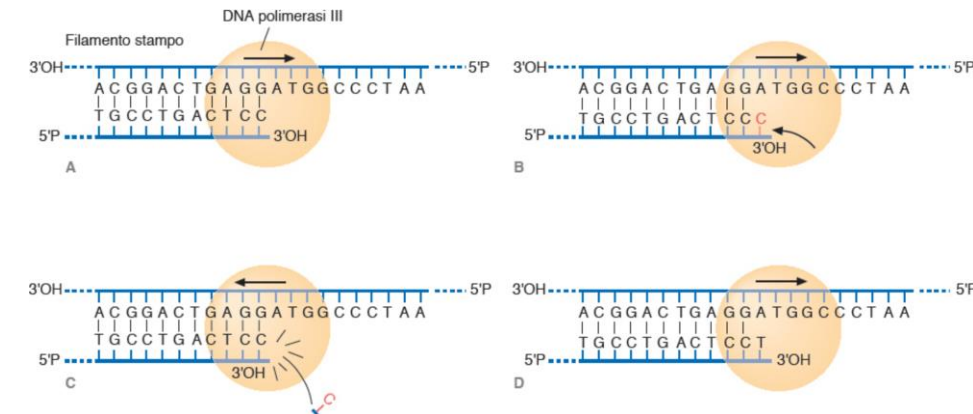
La necessità della direzione di polimerizzazione **5'-3'** della DNA polimerasi deriva dalla sua chimica:

- **L'enzima aggiunge un nuovo nucleotide** al gruppo ossidrilico **libero (-OH)** presente in posizione 3' del filamento preesistente.
- **L'attività di proofreading** che richiede la **rimozione di un nucleotide sbagliato dall'estremità 3'**, cosa che non sarebbe possibile se la sintesi avvenisse in direzione opposta.



Se la sintesi avvenisse in direzione **3'→5'**:

- **L'estremità in crescita dovrebbe portare il trifosfato.**
- **La rimozione di un nucleotide errato lascerebbe un'estremità 5' priva di energia** → impossibile proseguire la sintesi.



Solo la direzione 5'→3' è compatibile con un proofreading efficiente.

Necessità di un'estremità 3'-OH

La **DNA polimerasi** non può iniziare la sintesi *de novo*.

Necessario un **primer**:

- Fornisce **un'estremità 3'-OH perfettamente appaiata** da cui la polimerasi può partire.

Filamento leader:

- Richiede **un solo primer** all'inizio della replicazione.

Filamento in ritardo:

- Ogni nuovo frammento di **Okazaki** necessita di un primer.

DNA polimerasi:

- Necessita di un'estremità 3'-OH perfettamente appaiata.
- Non può iniziare *de novo* → richiede un primer.
- Alta fedeltà grazie al proofreading.

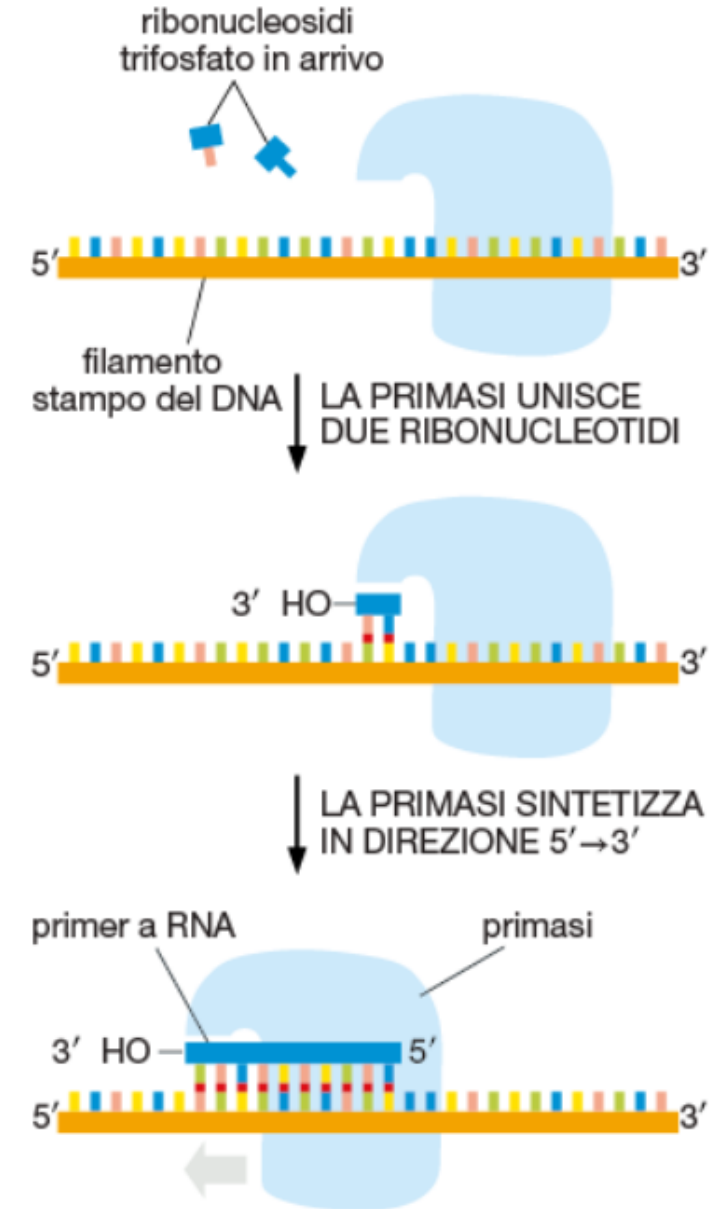
RNA polimerasi:

- Non richiede proofreading esonucleolitico.
- Può iniziare nuove catene senza primer.
- Errori nell'RNA non sono trasmessi e non compromettono l'organismo a lungo termine.

- Errori in RNA/proteine sono **100.000 volte più frequenti** rispetto al DNA.
- Motivo: solo nel DNA gli errori hanno conseguenze permanenti → necessità di massima accuratezza.

La DNA primasi: RNA come stampo e ibridi DNA–RNA

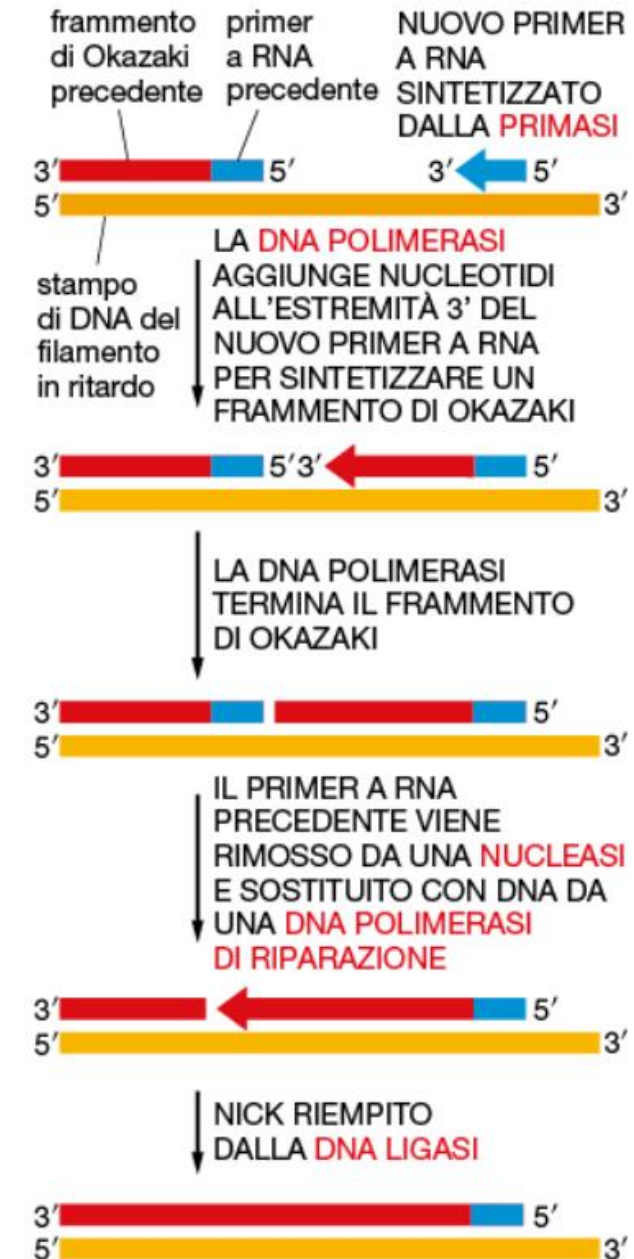
- Enzima specializzato che sintetizza **brevi primer a RNA**.
- Substrati: **ribonucleosidi trifosfato (NTPs)**.
- Primer lunghi circa **10 nucleotidi**.
- Inseriti ogni **100–200 nucleotidi** sul filamento in ritardo.
- Anche sul filamento leader è richiesto un primer, ma solo all'inizio
- L'RNA è simile al DNA e può appaiarsi con esso formando **eliche ibride DNA–RNA**.
- La sintesi dei primer a RNA è guidata dallo **stesso principio di complementarità**.
- **Un primer RNA fornisce un'estremità 3'-OH correttamente appaiata** → allungata dalla DNA polimerasi per avviare un frammento di Okazaki.



Sintesi e Rimozione dei Frammenti di Okazaki

Processo sul filamento in ritardo:

- **DNA polimerasi estende il primer RNA** → Formazione del frammento di Okazaki.
- **Si arresta quando** la polimerasi **incontra il primer RNA precedente**
- **Nucleasi rimuovono i primer RNA** in quanto riconosciuti in eliche ibride DNA–RNA.
- **DNA polimerasi “di riparazione” riempie i vuoti con DNA ad alta fedeltà.**



Azione della DNA Ligasi

Dopo la sostituzione degli RNA primer rimangono dei **nick** (interruzioni).

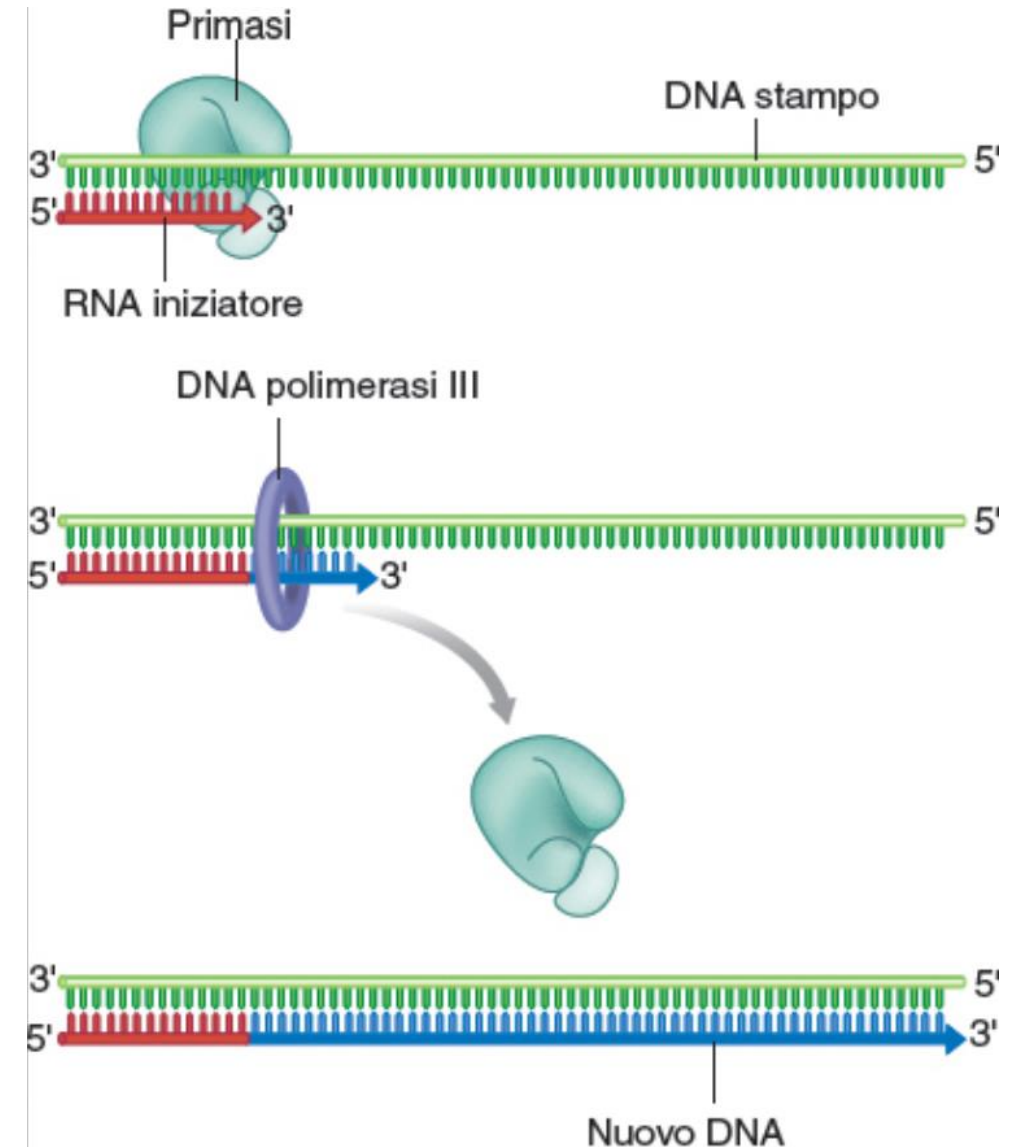
- La **DNA ligasi**:

- Catalizza la formazione del legame fosfodiester tra estremità **3'-OH** e **5'-fosfato** adiacenti.
- Richiede energia da **ATP**.
- Reazione in due passi:
 - Attivazione del fosfato 5'.
 - Formazione del legame con l'ossidrile 3'.



Perché usare primer a RNA e non a DNA?

- L'utilizzo di un RNA come innesco è giustificato dalla **necessità di minimizzare gli errori iniziali**
- È, infatti, opinione diffusa che l'**inizio della replicazione** sia particolarmente **soggetto a imprecisioni**.
- Tuttavia, gli **RNA primer verranno successivamente rimossi e sostituiti con DNA**, garantendo così l'eliminazione di eventuali errori introdotti durante la fase iniziale.
- Uso di RNA = **vantaggio biologico**: I **ribonucleotidi fungono da “marcatori”** → sequenze facilmente riconosciute come provvisorie.
- In questo modo si evita un aumento della frequenza globale di mutazioni.

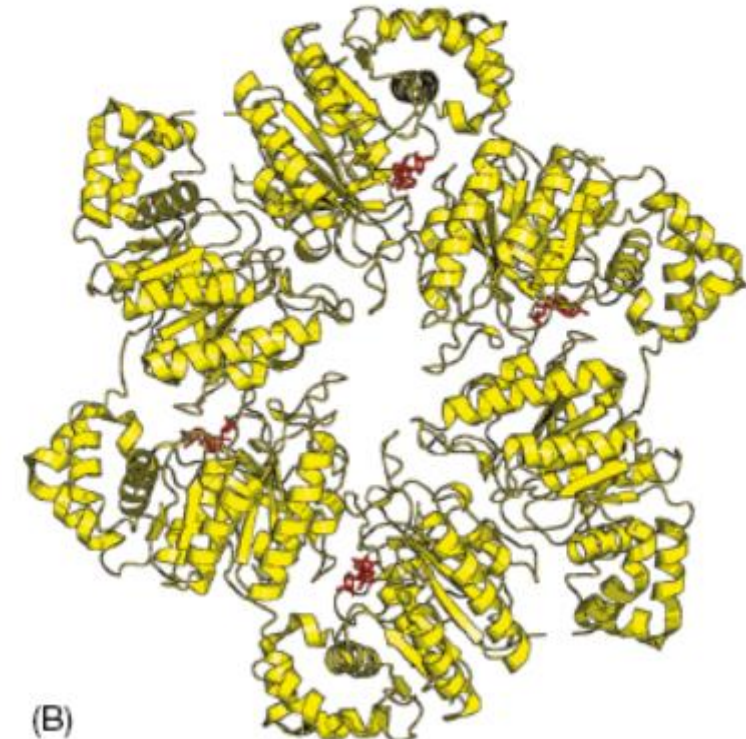
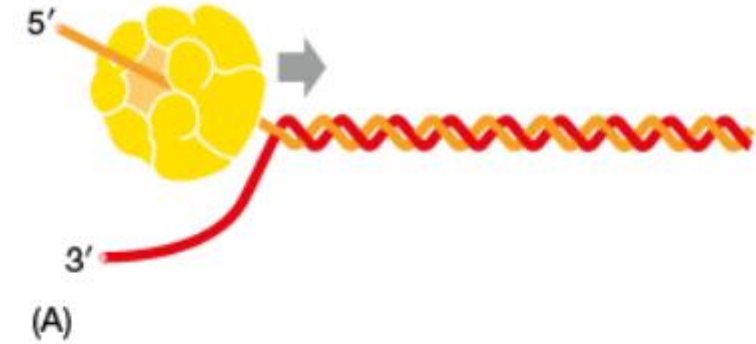


Apertura della doppia elica: DNA elicasi

- Perché la sintesi del DNA proceda, la doppia elica deve essere **aperta davanti alla forcella**.
- Il DNA è estremamente stabile: in vitro occorrono temperature vicine a 100 °C per separare i filamenti.
- La cellula utilizza proteine specializzate:
 - **DNA elicasi** → apre l'elica.
 - **Proteine SSB (Single-Strand DNA-Binding)** → stabilizzano i filamenti aperti.

DNA elicasi

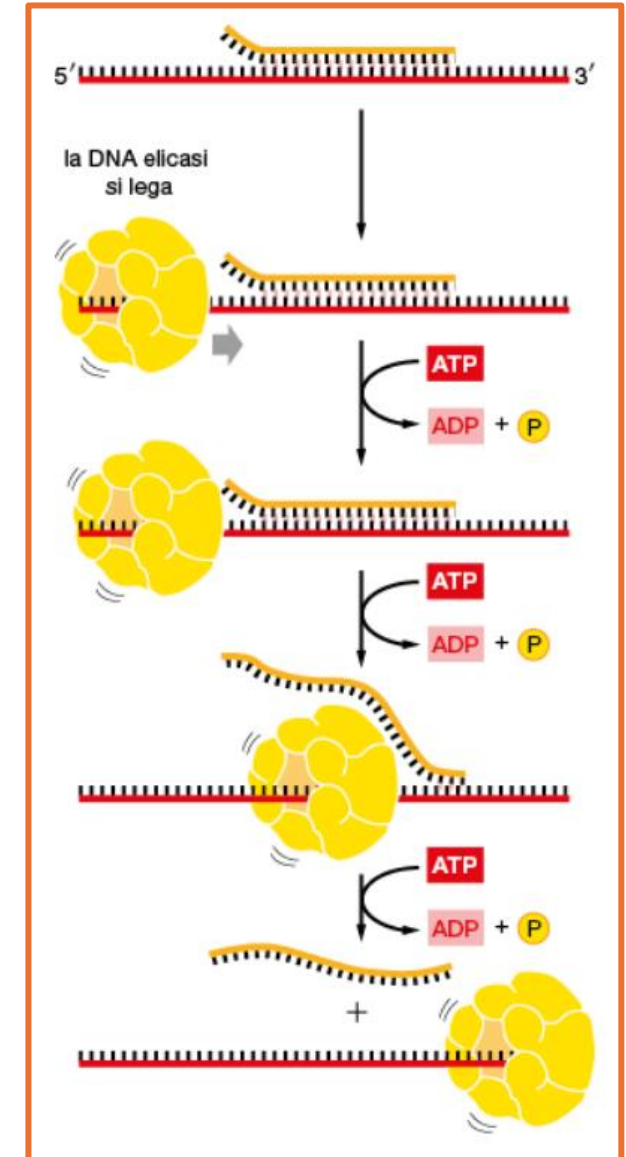
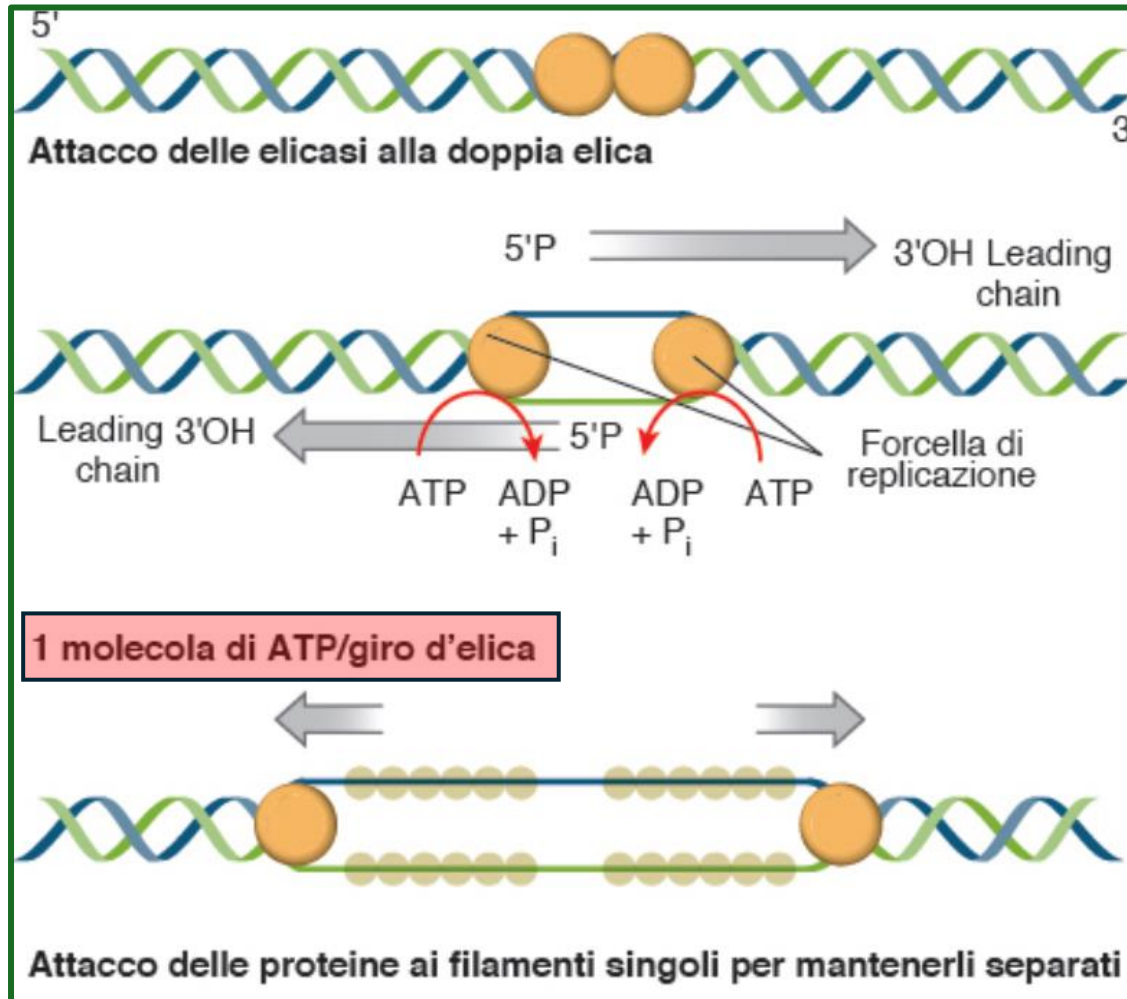
- L'idrolisi ciclica di ATP induce cambiamenti conformazionali.
- L'elicasi avanza lungo il DNA ss come un **cuneo mobile**.
- Forza i due filamenti a separarsi.
- Struttura tipica: **anello esamerico** di 6 subunità (E. Coli) → motore rotatorio che spinge il DNA attraverso il poro centrale.



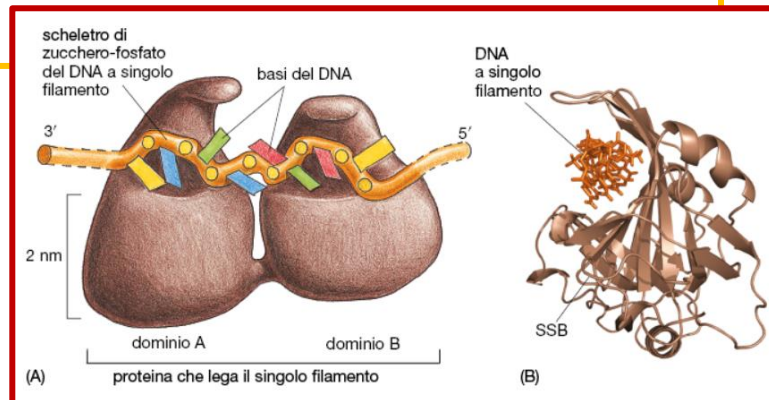
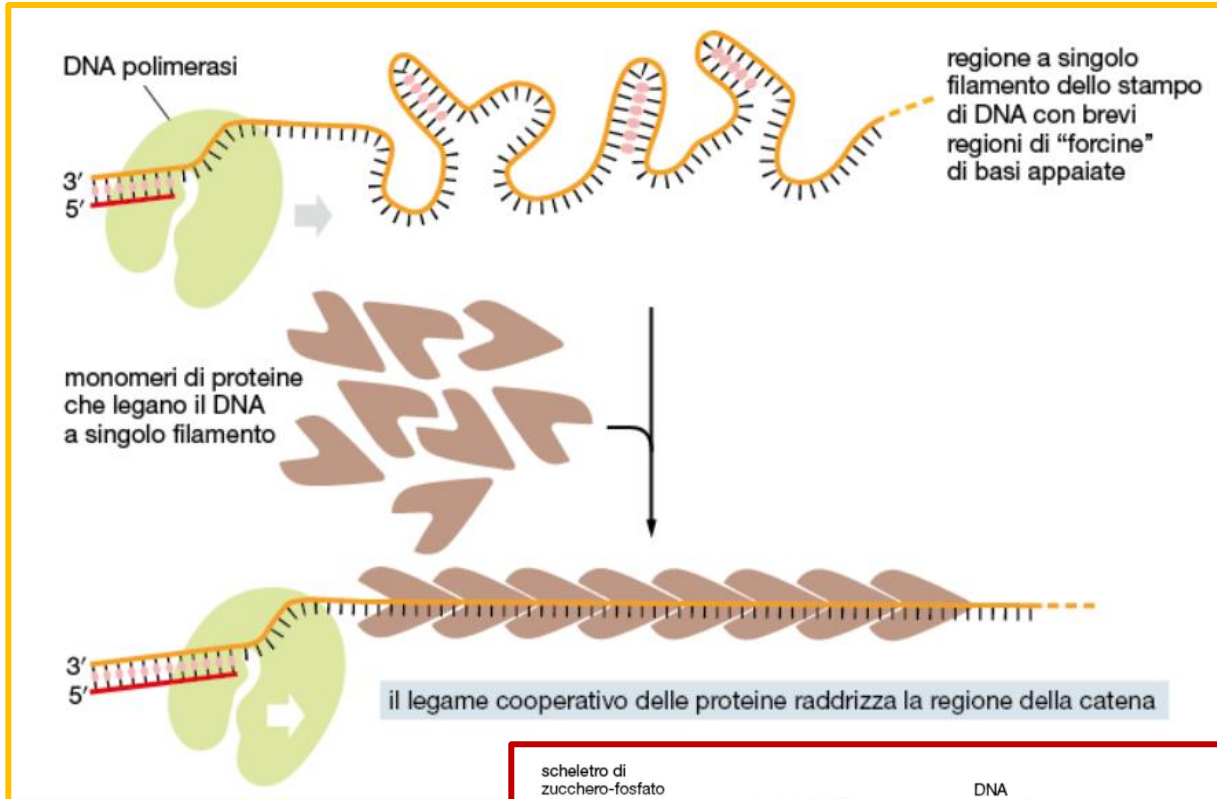
Apertura della doppia elica: DNA elicasi

Direzionalità delle elicasi

- Elicasi si muovono in direzione **5'→3'** lungo ogni filamento.



Apertura della doppia elica: Proteine SSB (Single-Strand DNA-Binding)



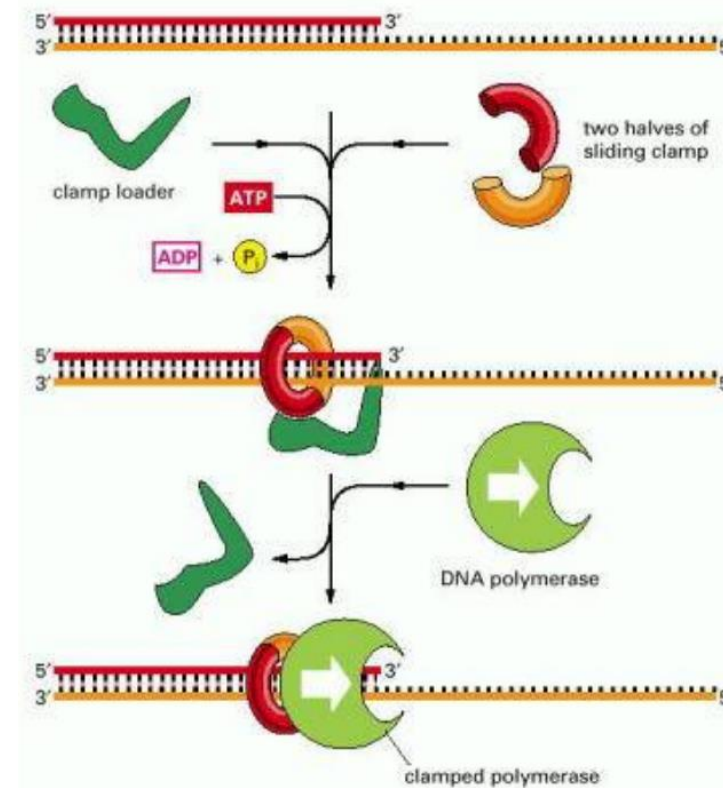
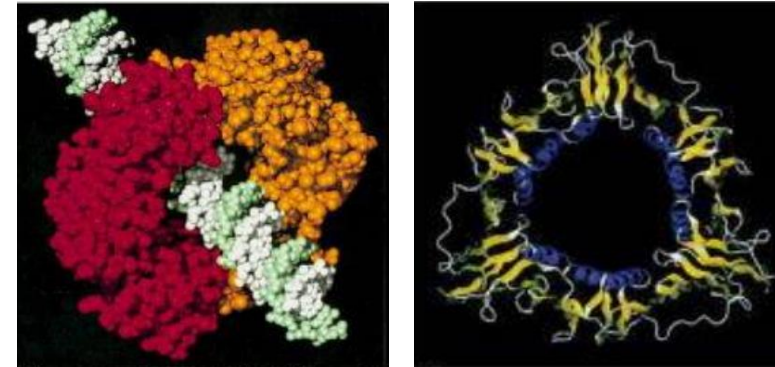
Legano stabilmente il DNA a singolo filamento aperto dalle elicasi.

- Legame **cooperativo** → **formano file continue** di proteine.
- **Raddrizzano lo stampo di DNA.**
- **Impediscono la formazione di eliche a forcina** (strutture secondarie dovute a sequenze complementari interne).
- Necessarie soprattutto sul **filamento in ritardo**.
- **Facilitano l'azione della DNA polimerasi**

La Pinza Scorrevole (PCNA negli eucarioti)

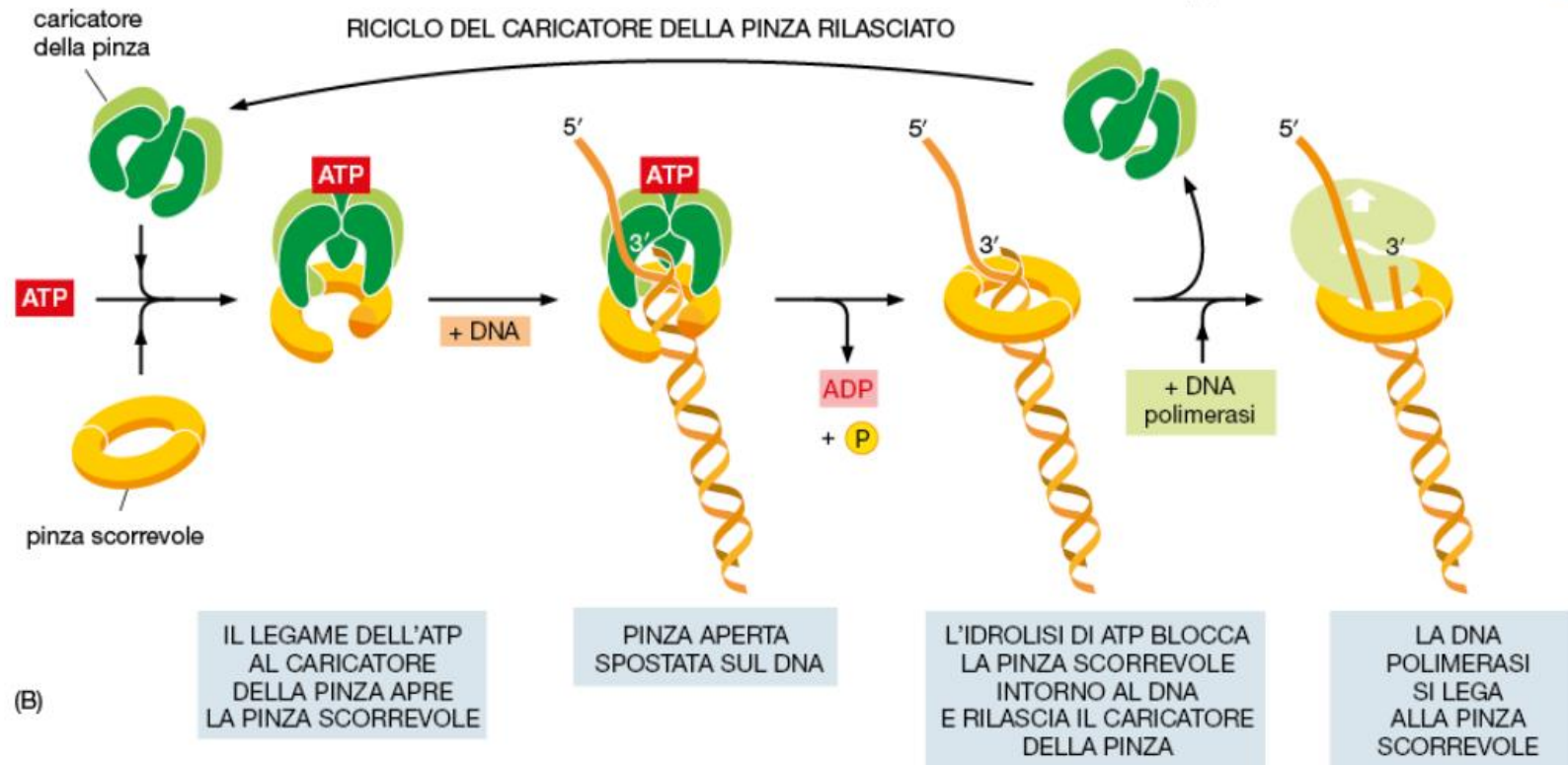
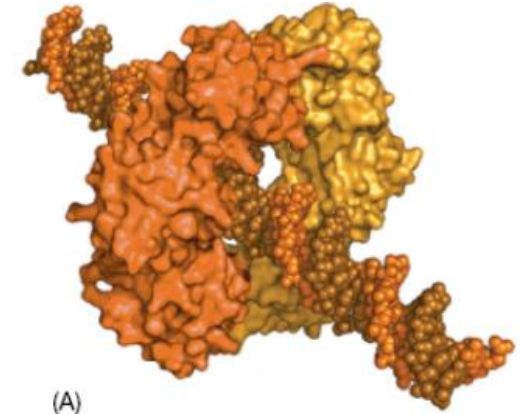
La pinza scorrevole (PCNA negli eucarioti)

- Problema: la **DNA polimerasi** tenderebbe a **staccarsi presto** dal DNA.
- Soluzione: la **pinza scorrevole**:
 - Proteina accessoria che **mantiene la polimerasi saldamente legata al DNA**.
 - Forma un **anello attorno alla doppia elica**.
 - **Un lato interagisce con la DNA polimerasi** → stabilità.
- Caratteristica: **scorre liberamente lungo il DNA mentre la polimerasi avanza**.



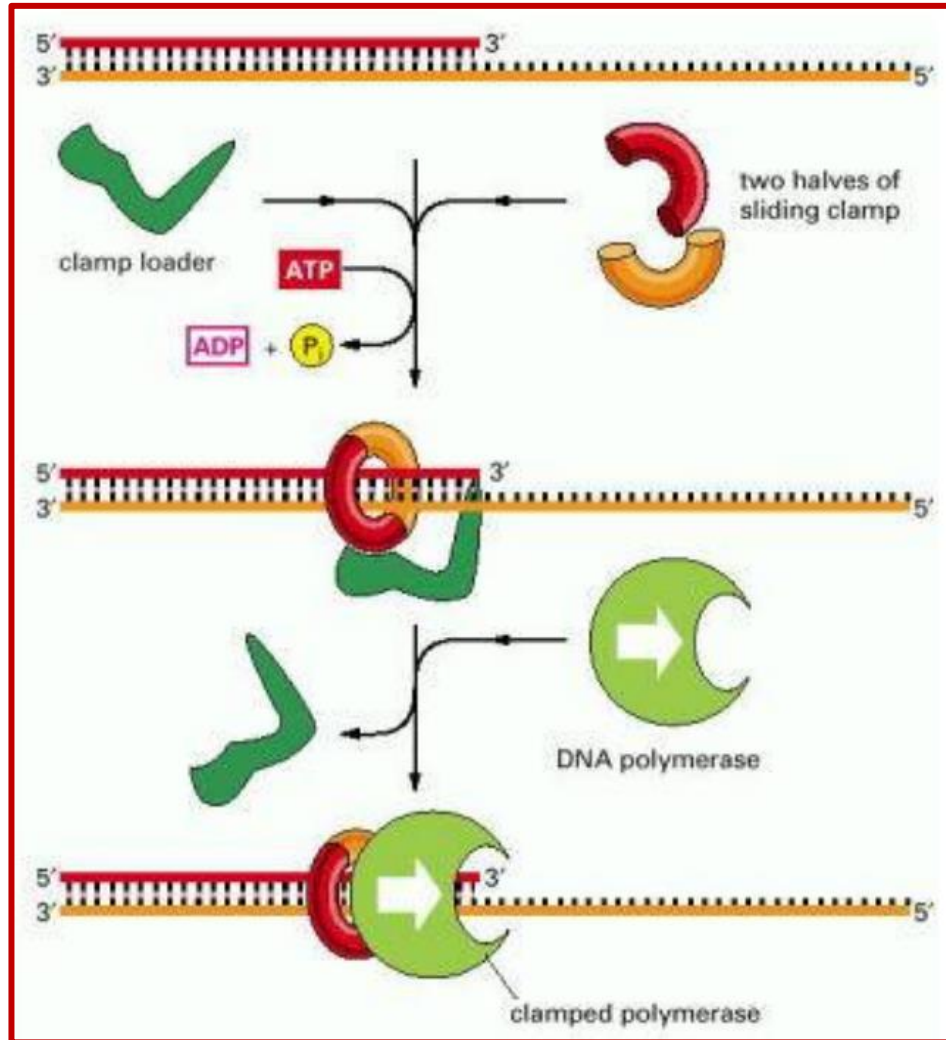
Assemblaggio della Pinza: Caricatore della Pinza

- **L'anello non può chiudersi spontaneamente** → serve il **caricatore della pinza**.
- Funzionamento del caricatore:
 - **Aprire l'anello** della pinza.
 - **“Avvita” la pinza lungo il DNA** fino a incontrare un'estremità 3' di un primer.
 - **Chiusura della pinza** intorno al DNA → Idrolizza ATP.

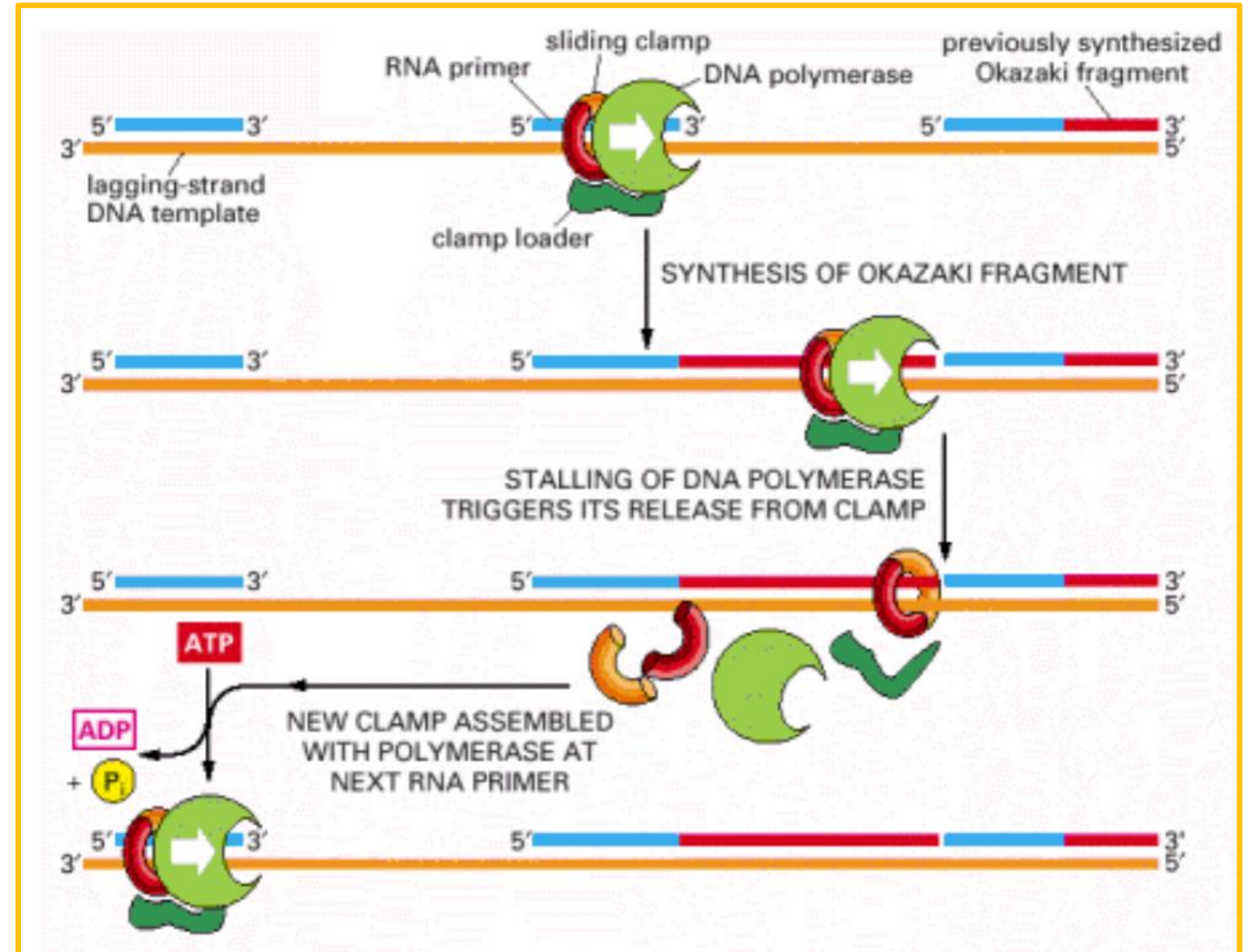


Meccanismo della Pinza e del Caricatore sui Filamenti

Leading Strand



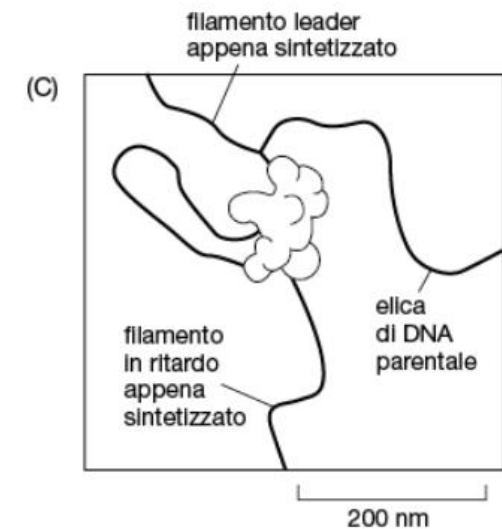
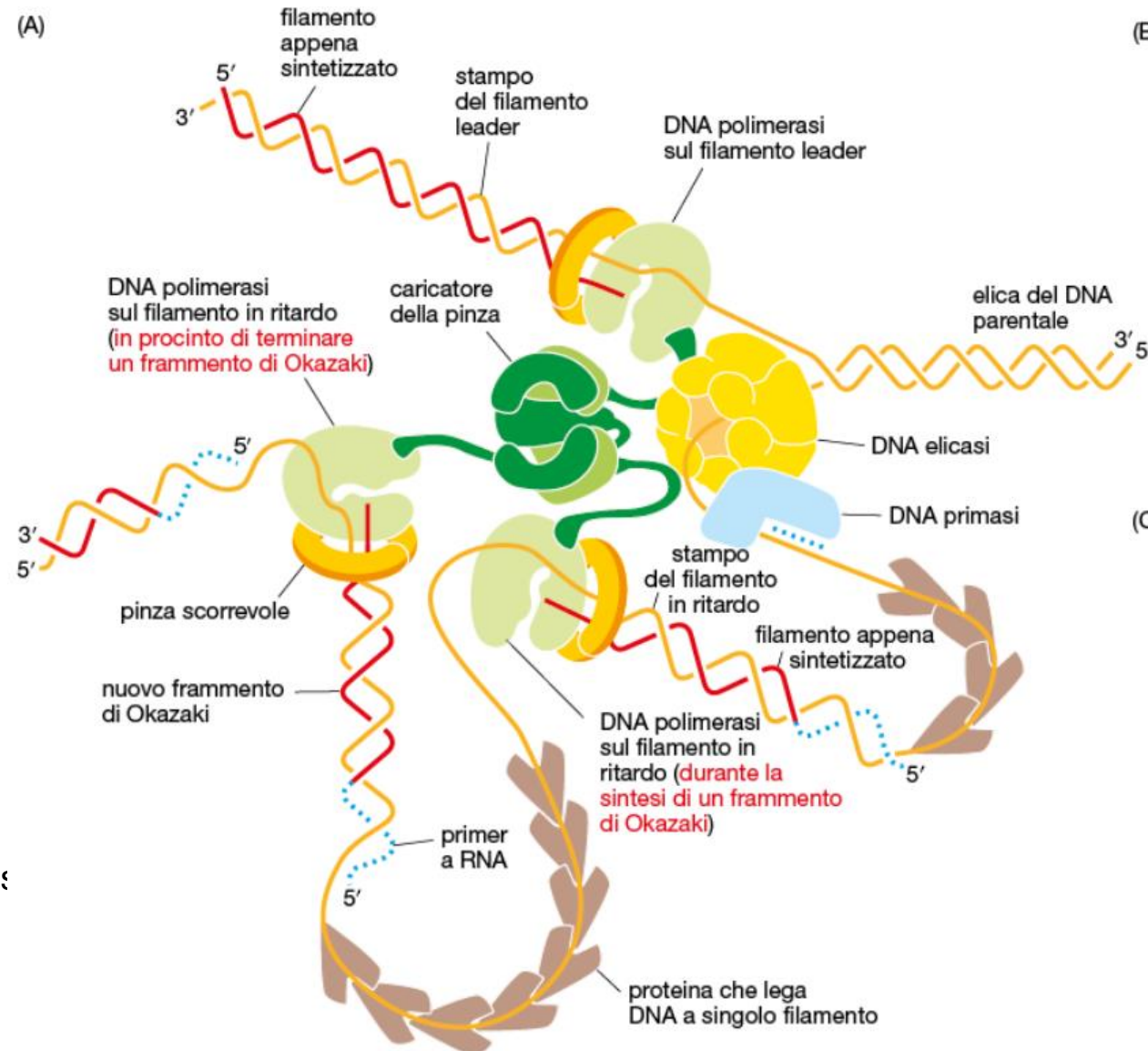
Lagging Strand



Forcella di replicazione batterica (*E. coli*)

Complesso multienzimatico ordinato.

- **DNA elicasi** apre l'elica davanti alla forcella.
- **DNA polimerasi identiche:**
 - 1 sintetizza il **filamento leader** (continuo).
 - 2 lavorano sul **filamento in ritardo**
- **La polimerasi si dissocia** a ogni frammento completato.
- **Resta comunque associata** alla forcella tramite il **caricatore della pinza**, **pronta per riniziare**
- **DNA primasi:** produce i primer RNA per ciascun frammento.
- **Caricatore della pinza + pinza scorrevole:** mantengono la polimerasi stabile.
- Il **filamento in ritardo si ripiega ad ansa** → permette alla polimerasi di restare ancorata al complesso.



Replicazione in Eucarioti

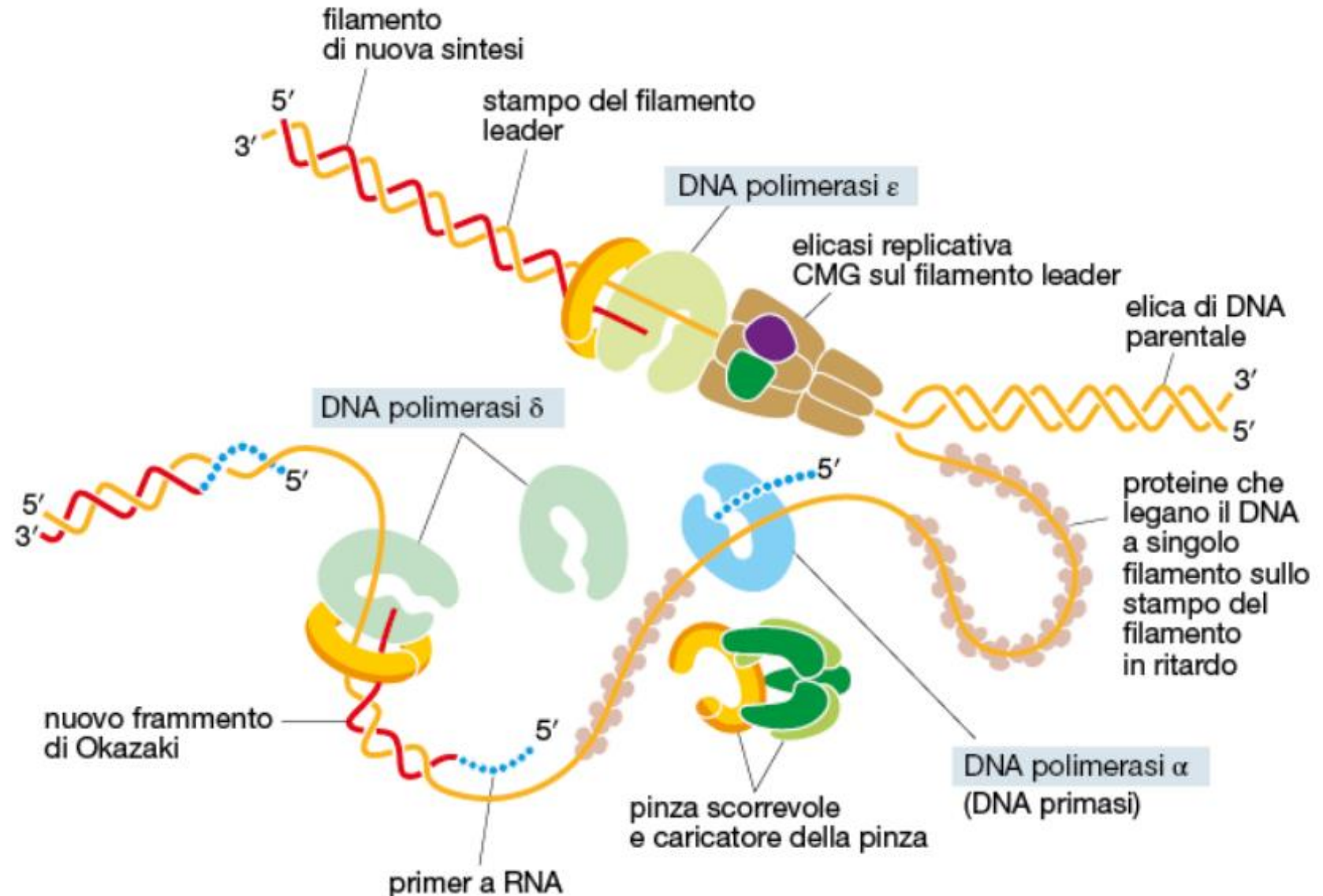
Replicazione negli eucarioti

Principi generali simili:

- Elicasi, polimerasi 5'→3', pinze, caricatori, SSB.

Differenze chiave:

- **Tre DNA polimerasi diverse:**
 - **Pol ϵ** → filamento leader.
 - **Pol α (con primasi integrata)** → avvia i frammenti di Okazaki.
 - **Pol δ** → completa i frammenti (~200 nucleotidi).
- **Elicasi CMG** (11 subunità) → si muove lungo lo stampo del filamento leader.
- SSB eucariotiche formate da **3 subunità diverse** (nei batteri solo 1).



Errori Residui: Riparazione degli Appaiamenti Sbagliati

Errori residui della replicazione

- Nonostante il **proofreading** alcuni errori sfuggono.
- Risultato: **basi male appaiate** restano dietro la forcella di replicazione.
- Questi errori **distorcono la doppia elica** → riconoscibili dalle proteine di riparazione.

MMR negli eucarioti

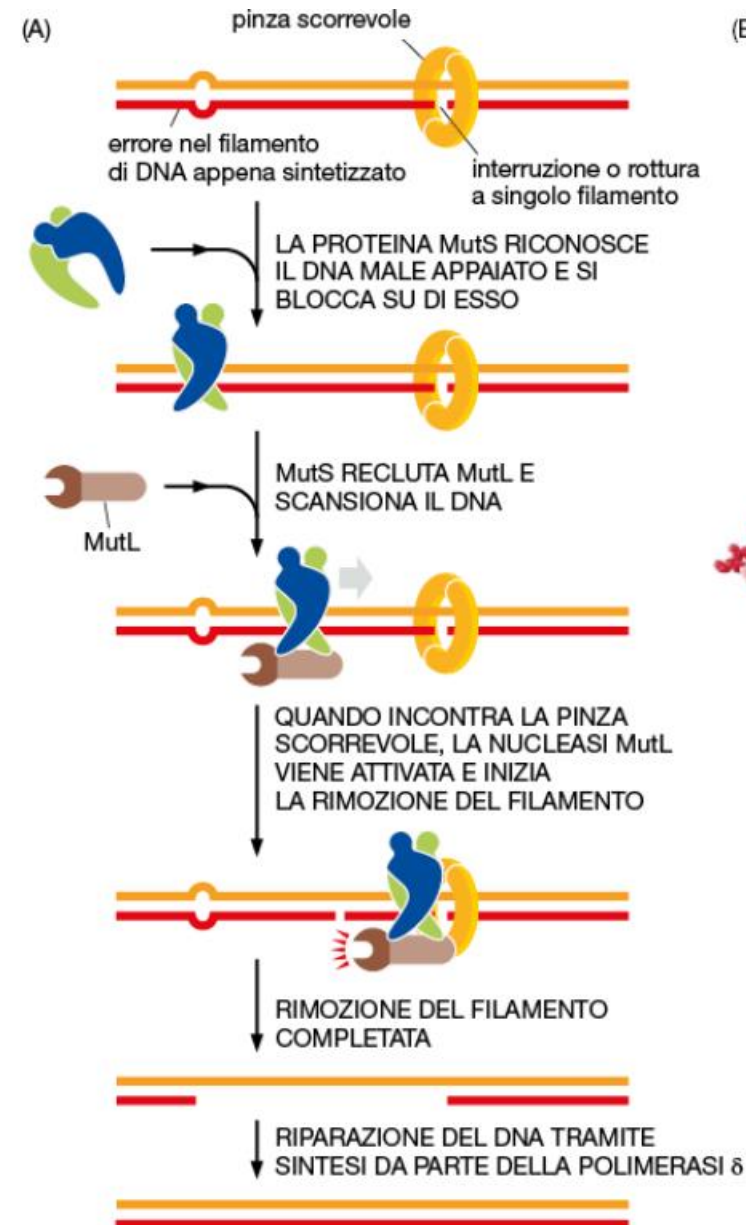
Strategia per distinguere i filamenti:

- **Gap transitori** nel filamento in ritardo (frammenti di Okazaki non ancora uniti).
- **Pinza scorrevole (PCNA)** rimane associata a questi gap → orientamento usato come segnale.

(*E. Coli* Metil A su Sequenze GATC del filamento stampo):

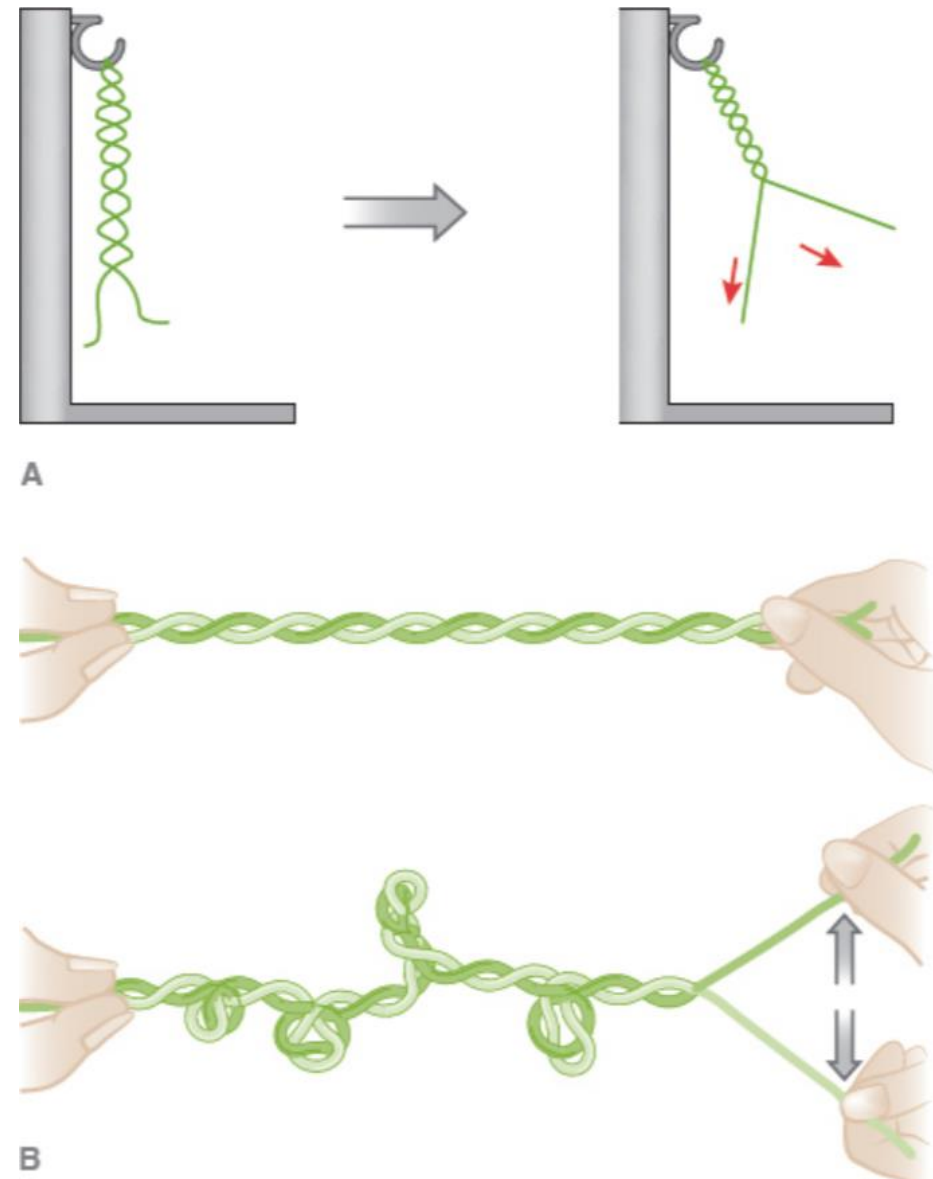
Meccanismo:

- **MutS/L** → riconosce la coppia male appaiata.
- **MutL** → reclutata, scansiona il DNA fino al gap/PCNA.
- Taglio del filamento nuovo da parte di nucleasi.
- Risintesi da **DNA polimerasi δ** .
- Sigillatura con **DNA ligasi**.



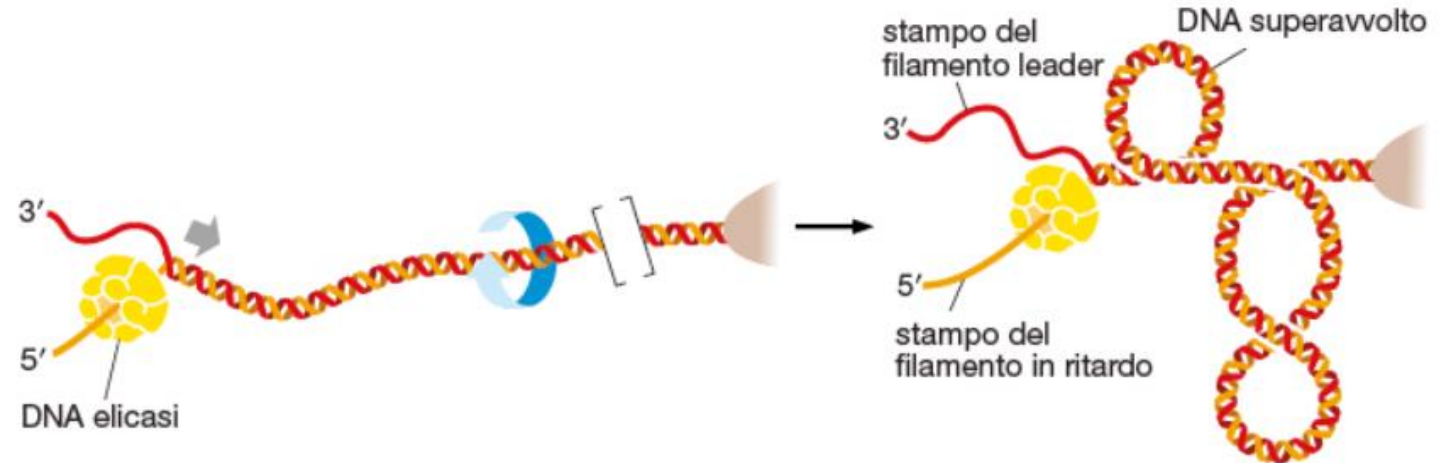
Il Problema dell'Avvolgimento del DNA

- La replicazione deve separare i due filamenti parentali
- Ogni **10 bp replicate** occorre svolgere un giro di elica.
- Ostacoli:
 - **Cromosomi lunghi** → rotazione dell'intero DNA è impraticabile.
 - La forcella in avanzamento genera **superavvolgimento positivo** davanti a sé.
- Se non risolto: la forcella si blocca perché la DNA elicasi non può più progredire.



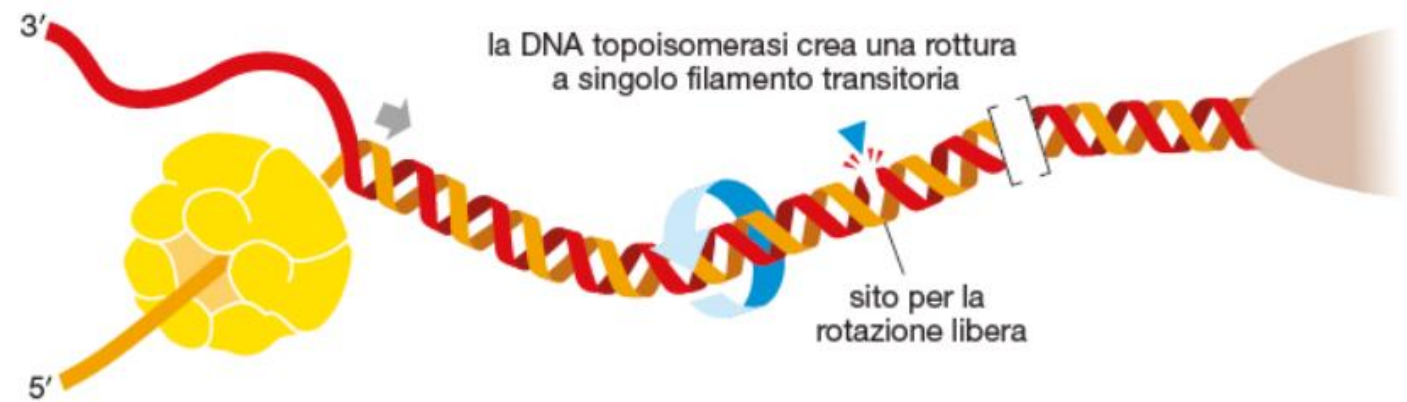
Ruolo delle DNA topoisomerasi

- Enzimi che **alleviano la tensione di superavvolgimento**.
- Funzionano come **nucleasi reversibili**: tagliano temporaneamente il DNA e poi lo richiudono.
- **Legame covalente enzima-DNA conserva l'energia** del legame fosfodiesterico, rendendo la reazione reversibile.



(A) in assenza della topoisomerasi, il DNA non può ruotare rapidamente e lo stress da torsione aumenta

(B) lo stress da torsione viene alleviato in parte dal superavvolgimento del DNA

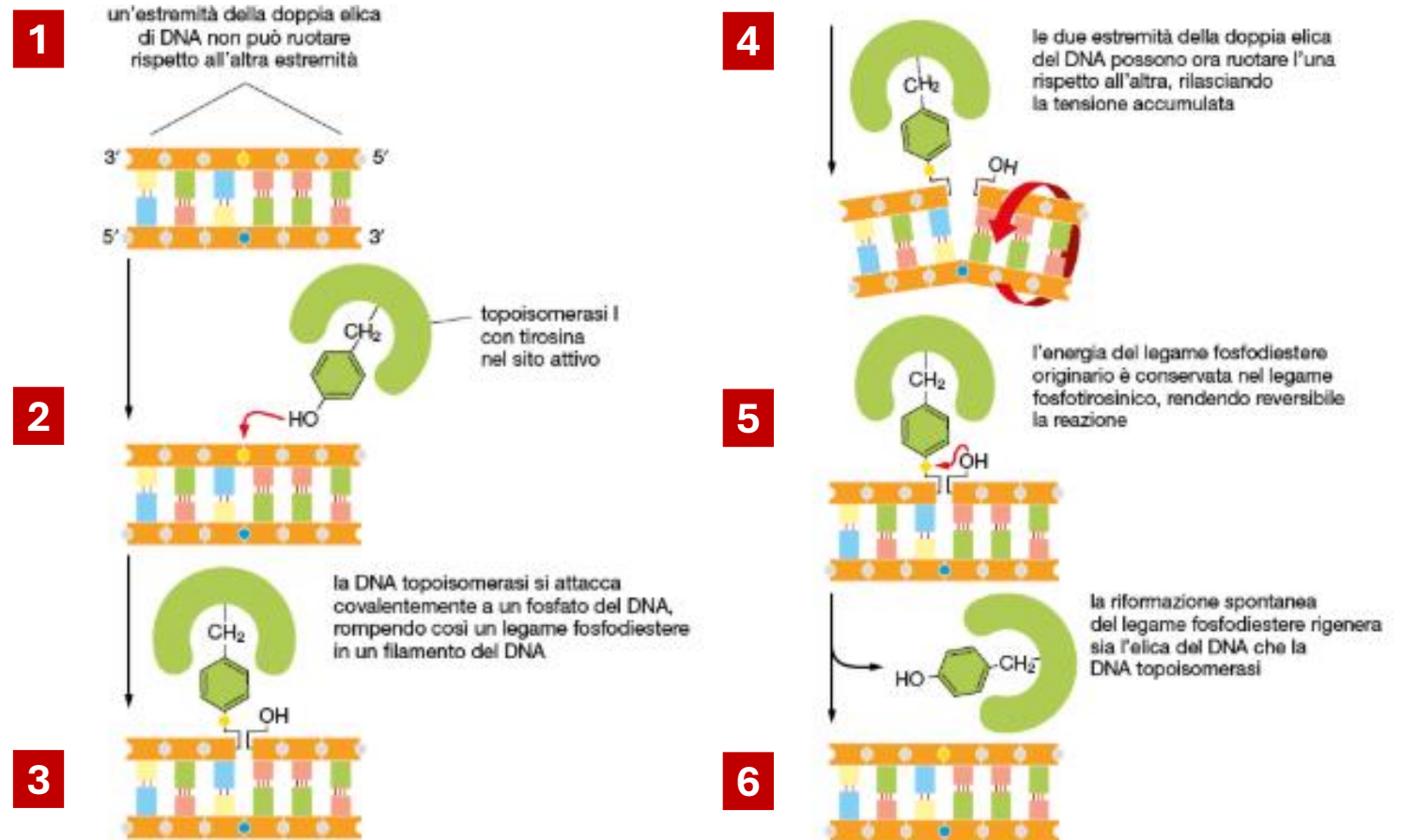


(C) lo stress da torsione a valle dell'elicasi viene rilasciato grazie alla rotazione libera del DNA intorno al legame fosfodiesterico opposto alla rottura a singolo filamento; la stessa molecola di DNA topoisomerasi che genera la rottura la richiude

Topoisomerasi di tipo I

Topoisomerasi di tipo I

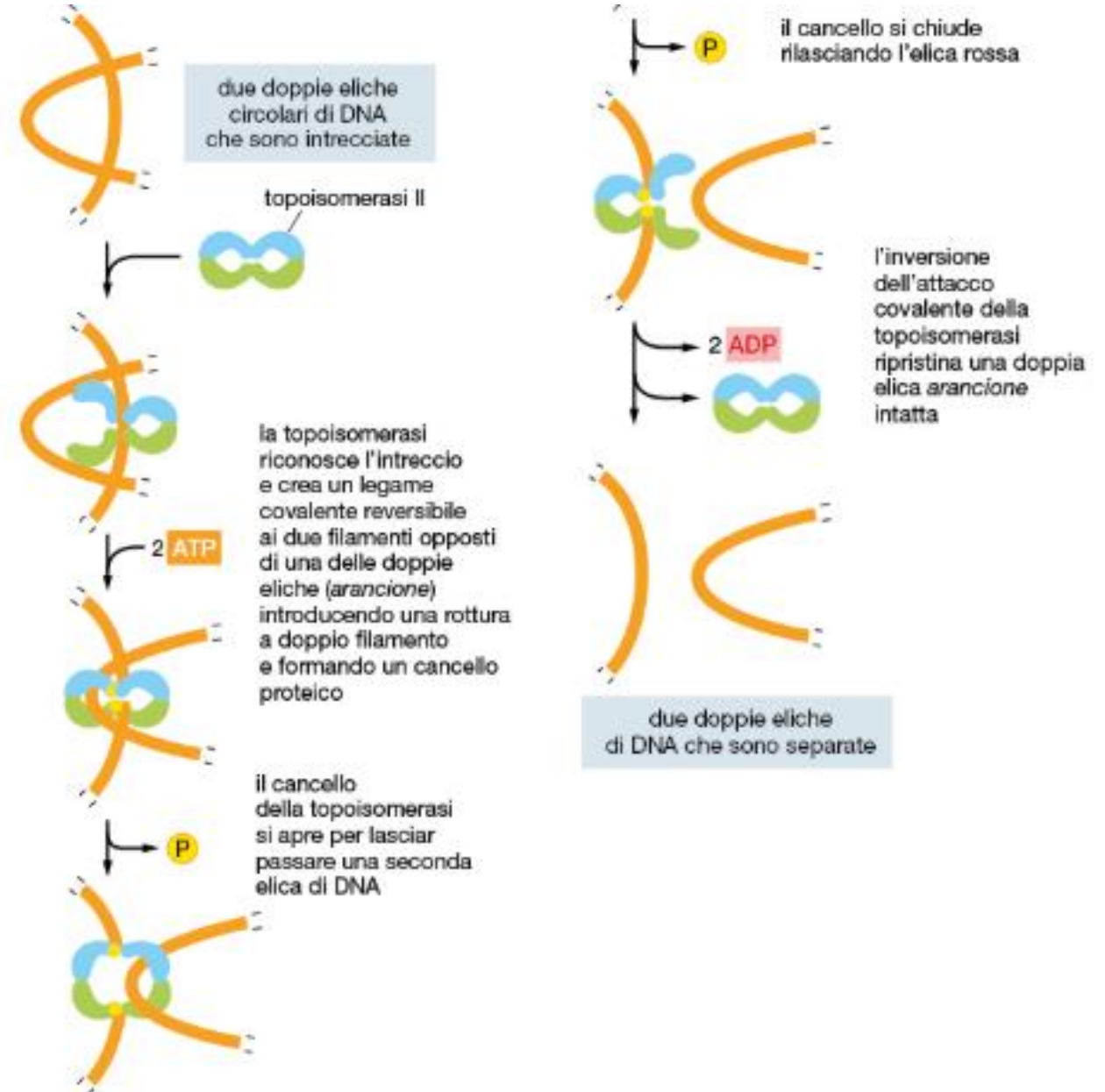
- Producono un **nick a singolo filamento**.
- **Consentono la rotazione libera** dell'elica intorno al filamento opposto.
- **La religazione avviene senza bisogno di ATP** → il legame covalente transitorio conserva energia.
- Risultato: **rilascio rapido della tensione davanti alla forcella**.



Topoisomerasi di tipo II

Topoisomerasi di tipo II

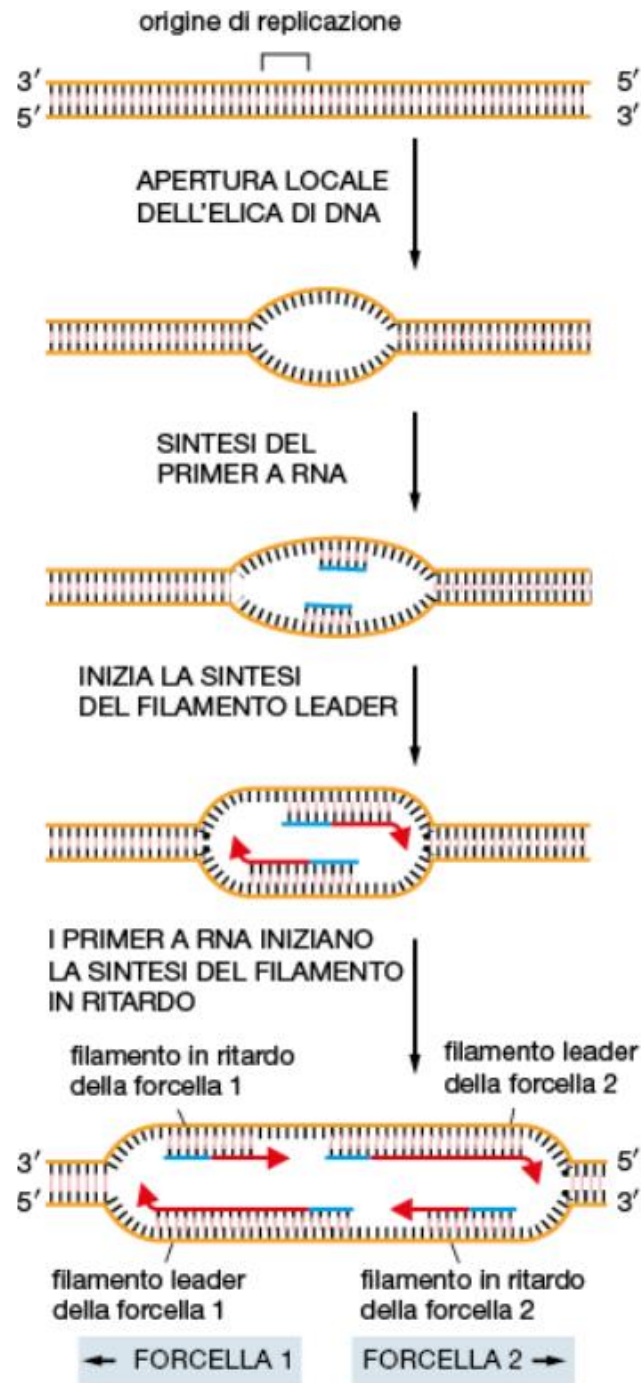
- Producono una **rotta transitoria a doppio filamento**.
- **Meccanismo in 3 fasi (richiede ATP):**
 - **Taglio** reversibile di una **doppia elica** → **formazione di un varco**.
 - **Passaggio** di un'altra doppia elica attraverso il varco.
 - **Riligazione** e rilascio.
- Funzioni:
 - Riduzione dei superavvolgimenti.
 - Separazione di molecole di DNA intrecciate (decatenazione).



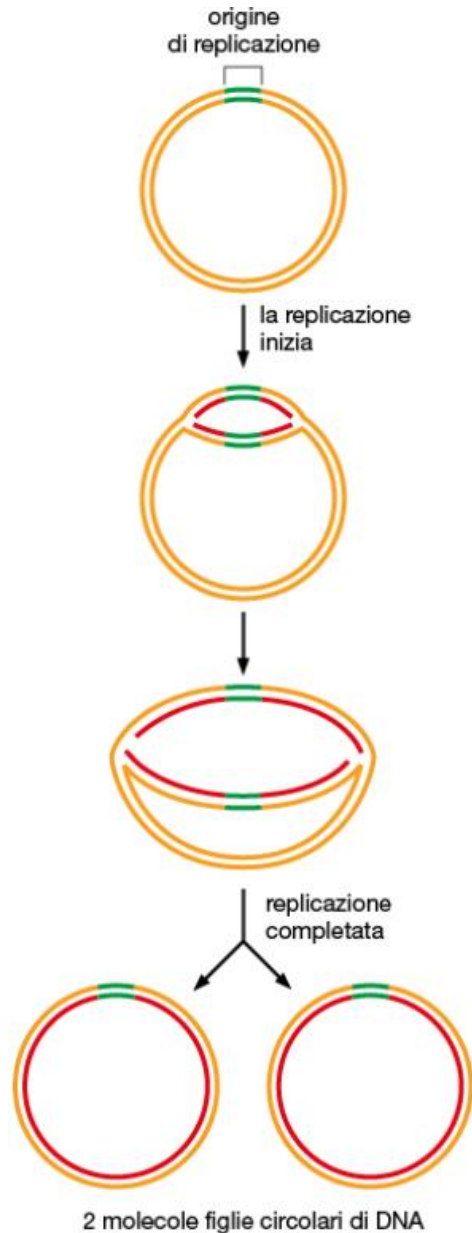
La sfida dell'inizio della replicazione

Come e dove si formano le forcelle di replicazione?

- La replicazione deve avvenire:
 - **Nel momento opportuno.**
 - **Nei siti precisi** (origini di replicazione).
- Problemi particolari da superare:
 - Grande lunghezza dei cromosomi eucariotici.
 - DNA compattato nei nucleosomi.



L'Inizio della Replicazione nei Procarioti



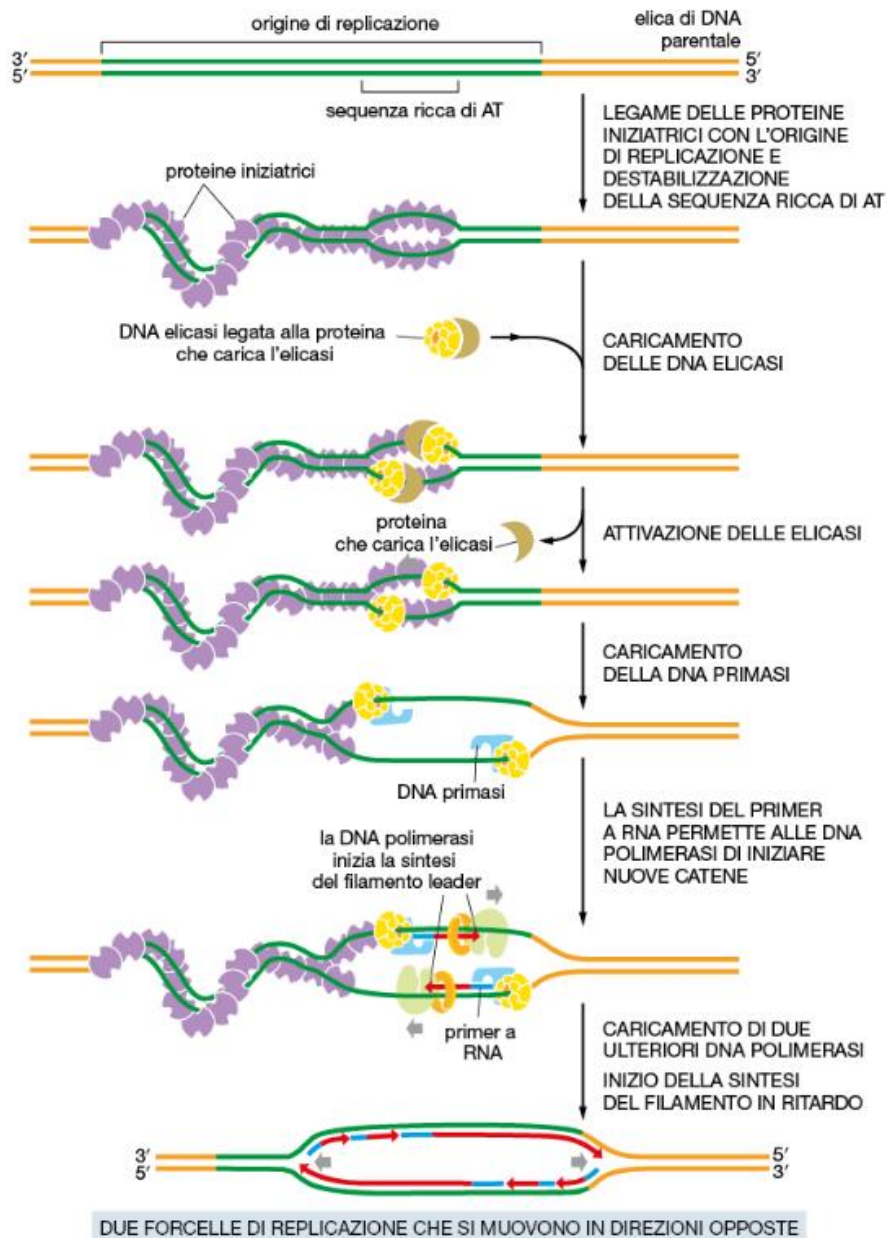
Origini di replicazione

- Punti del DNA in cui la doppia elica viene aperta → **origini di replicazione**
- **DNA di alcune centinaia di bp** (nei procarioti e lieviti).
- Sequenze specifiche che reclutano **proteine iniziatrici**.
- Ricche di **coppie AT** → più facili da aprire (meno legami H).

Cromosomi batterici

- Genoma = **molecola circolare di $4,6 \times 10^6$ bp**.
- Un'**unica origine** di replicazione.
- **Due forcelle** che procedono in direzioni opposte (~ 1000 nt/sec) fino a incontrarsi a metà cromosoma (Figura 5.25).

Assemblaggio all'origine (*E. coli*)



1. **Proteine iniziatrici (DnaA)** si legano a siti specifici → formano complesso proteina-DNA.
2. **Introducono stress torsionale** → apertura delle **regioni AT**.
3. **Reclutamento di elicasi (DnaB)** con il suo **caricatore** (DnaC).
4. **Caricamento di due elicasi** in orientamento opposto sui filamenti ssDNA.
5. **Caricatori si dissociano** → elicasi si attivano → **apertura del DNA**.
6. **Primasi (DnaG)** sintetizza i primi primer RNA.
7. Assemblaggio delle proteine rimanenti → due forcelle complete si muovono in direzioni opposte.

Origine di Replicazione in Eucarioti

Necessità di origini multiple

- Cromosomi molto più grandi → necessaria una **strategia diversa**.
- **Decine di migliaia di origini** distribuite lungo ogni cromosoma.



Replicazione in eucarioti (osservazioni moderne)

- Ogni divisione cellulare utilizza **30 000–50 000 origini**.
- Il genoma contiene un numero ancora maggiore di origini potenziali (~10×).
- **Origini diverse attivate in tipi cellulari differenti** → regolazione coordinata con l'espressione genica.
- **Le origini non si accendono simultaneamente** → attivazione ordinata e temporizzata.
- **Le forcelle**, indipendentemente dalla posizione, **si muovono tutte a velocità simile** (~50 nt/sec).

Origini e complesso ORC

ORC in Eucarioti

- Distanziate in media ogni **30 000 bp**.
- **Solo una parte viene utilizzata** in ogni ciclo.

Sequenze minime necessarie per un'origine:

- **Sito di legame per ORC (Origin Recognition Complex)** → grande proteina multisubunità.
- **Tratto ricco di AT** → più facile da aprire.
- **Siti accessori** per altre proteine che favoriscono l'assemblaggio di ORC (es. rimodellatori di cromatina).

Origini e domini tridimensionali

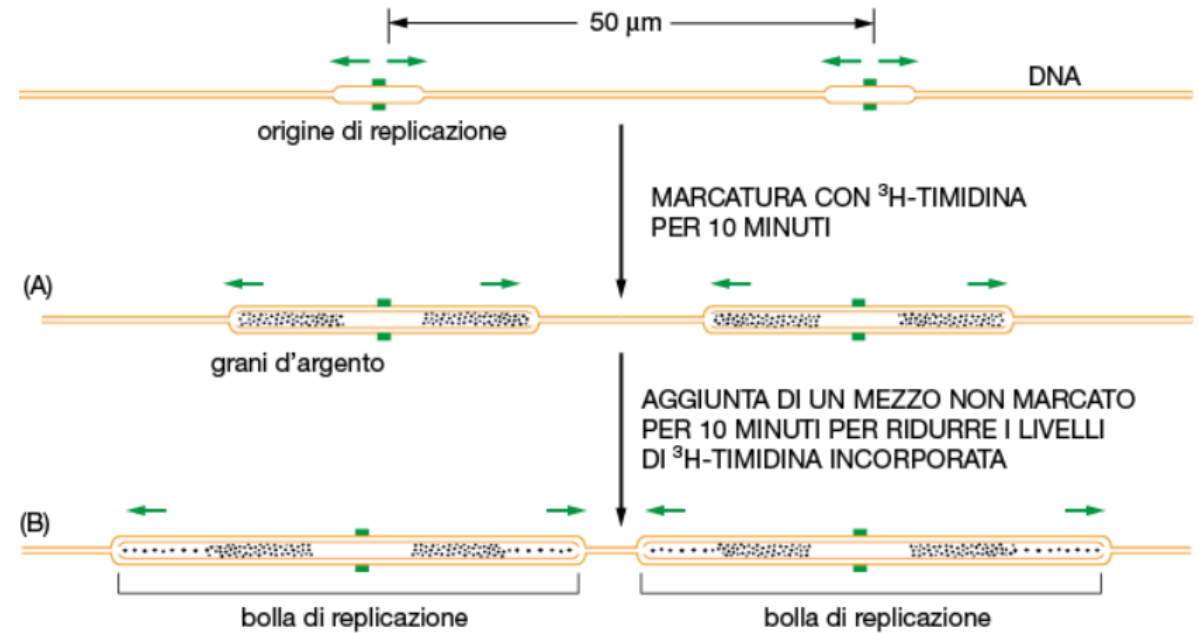
- Origini **vicine tendono ad attivarsi insieme**.
- Le origini sembrano organizzate in **domini cromosomici 3D**.

Backup system:

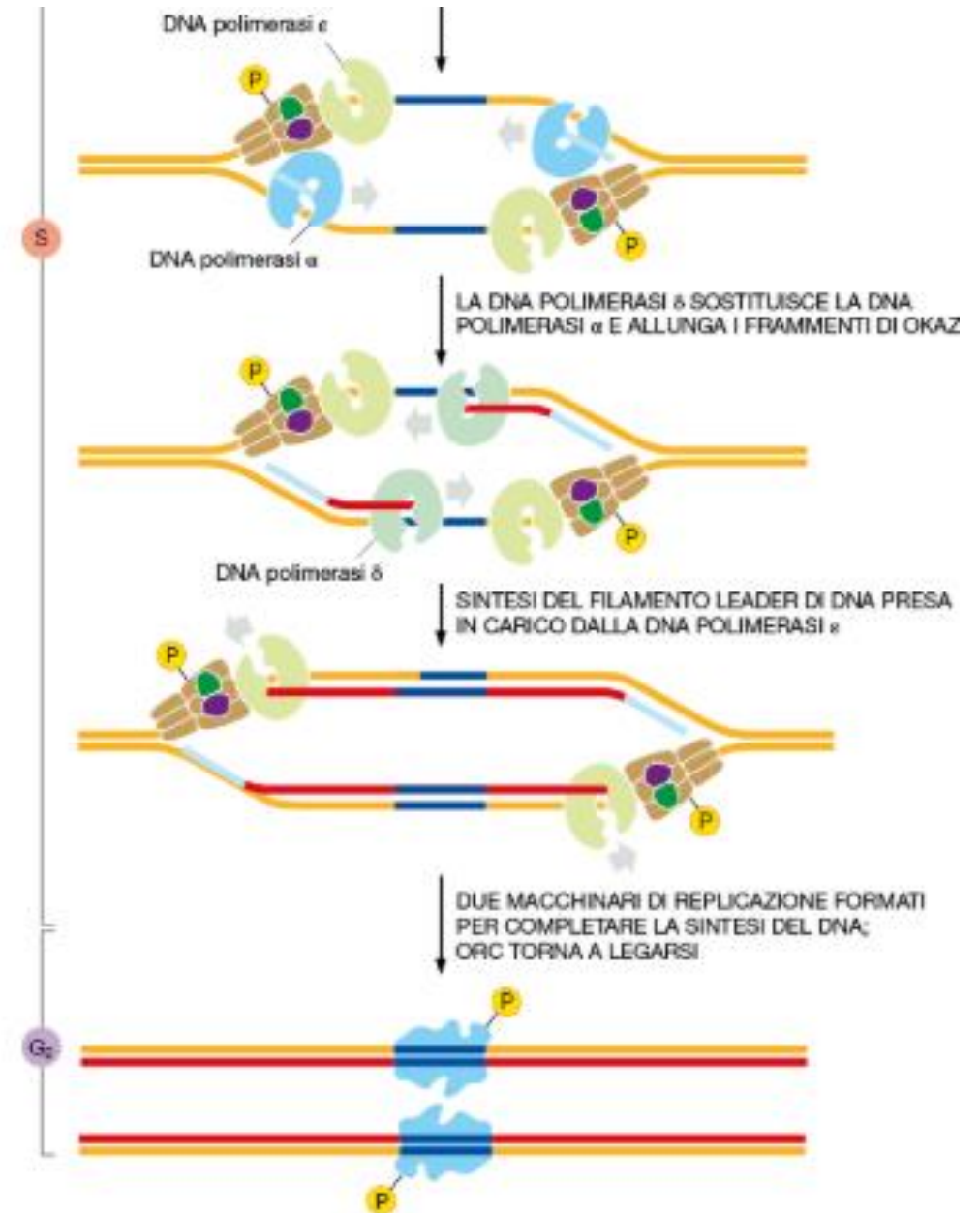
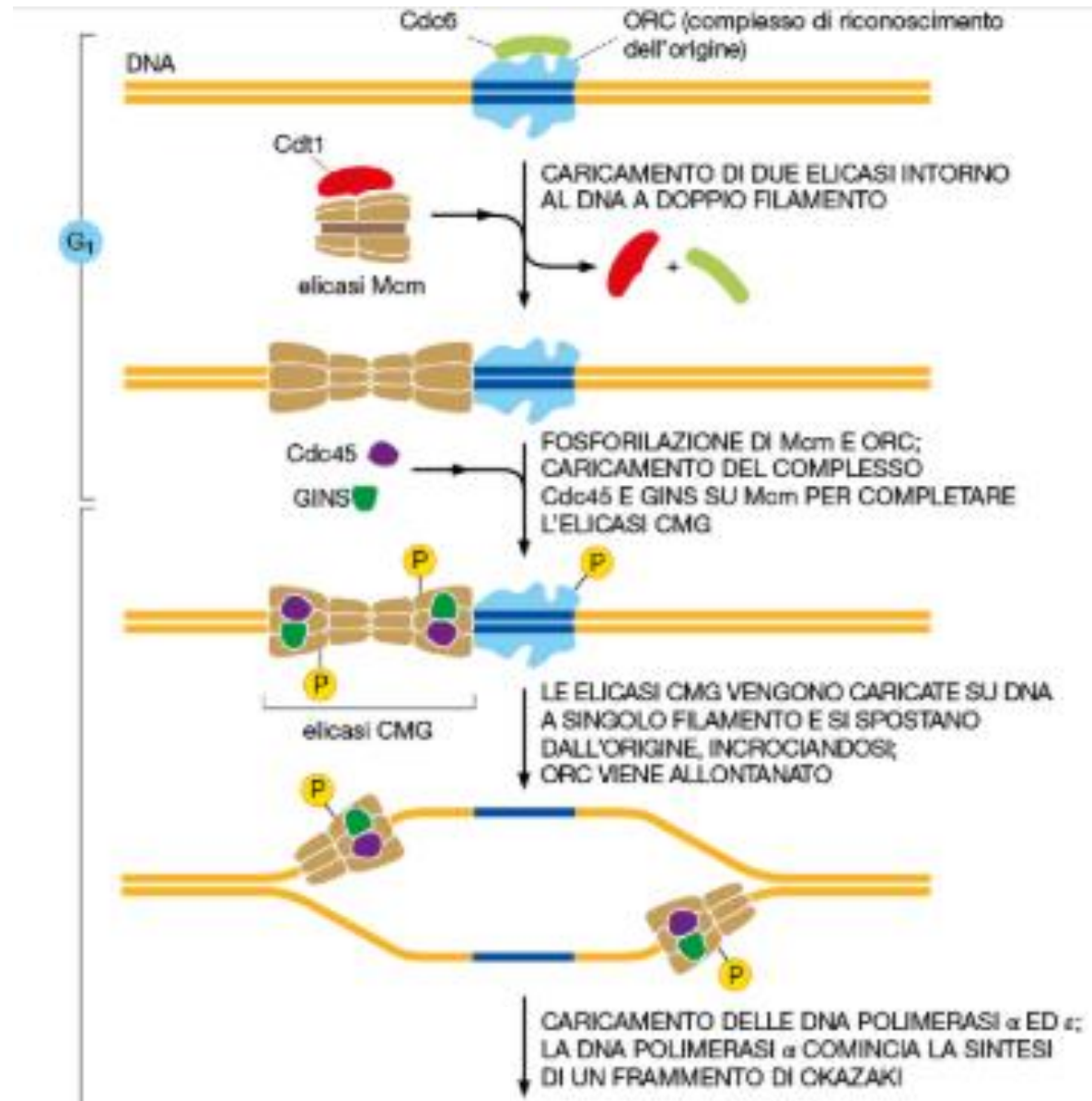
Solo **una parte delle origini** disponibili **viene usata**. Le altre rimangono come **riserva** in caso di fallimento locale.

Bolle di replicazione:

- Come nei procarioti, ogni origine attiva genera **due forcelle che si muovono in direzioni opposte**.
- Le forcelle **si fermano quando incontrano altre forcelle o l'estremità cromosomica**.



Origine di Replicazione in Eucarioti



Strategie di replicazione

Replicazione e ciclo cellulare

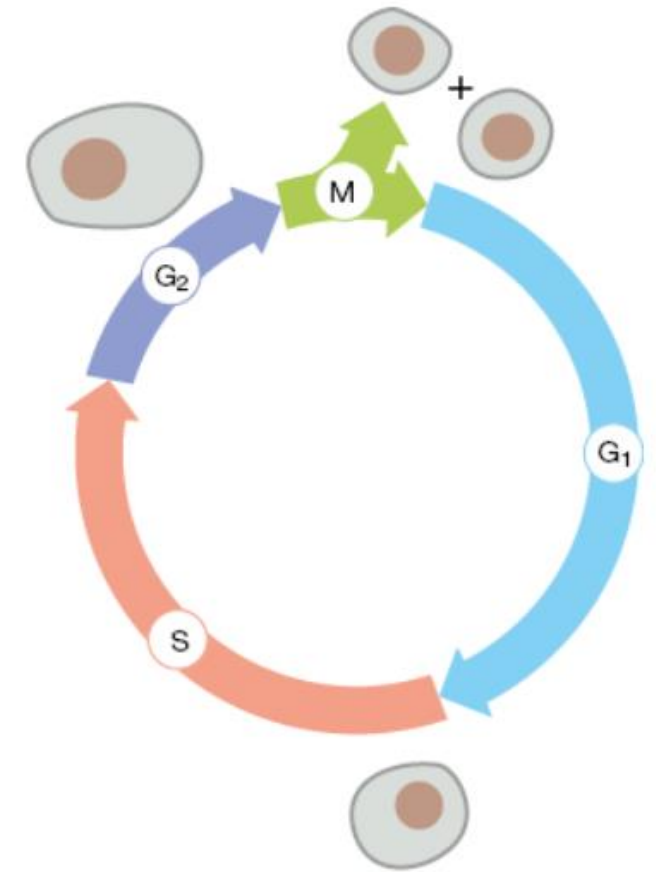
- **Nei batteri** → **replicazione continua** in condizioni di crescita.
- **Negli eucarioti** → replicazione limitata alla **fase S del ciclo cellulare** (Durata: Cellule di mammifero → ~8 ore)

Al termine della fase S:

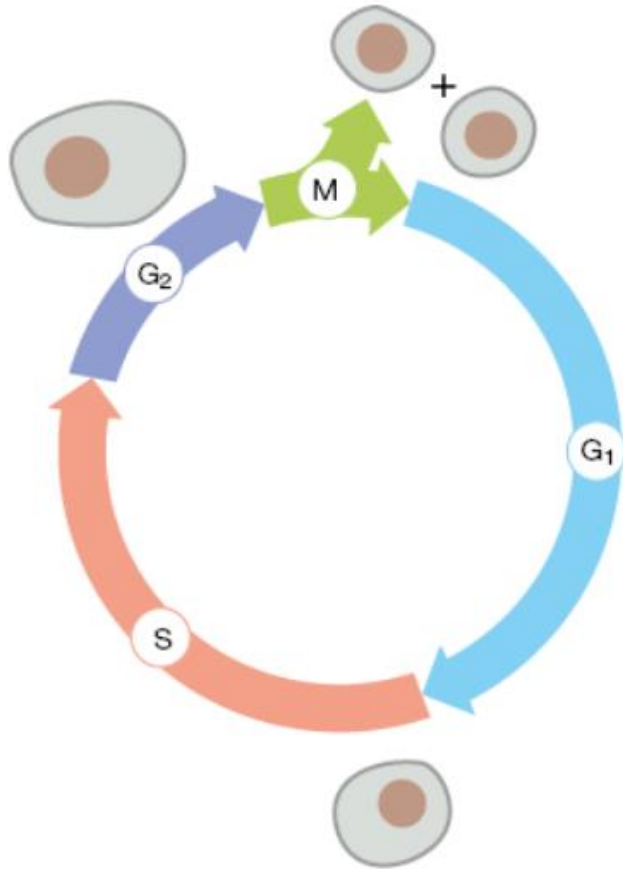
- Ogni cromosoma è duplicato in due copie unite al centromero.
- Pronte per essere separate nella successiva **fase M (mitosi)**.

Negli eucarioti: ORC (Origin Recognition Complex) regola l'intero processo:

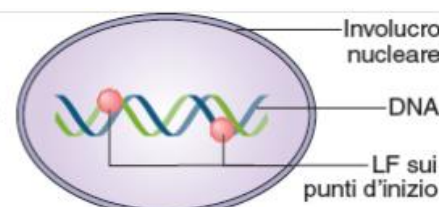
- Assicura che ogni origine si attivi **una sola volta per ciclo cellulare (Licensing Factor, LF), durante la Fase S.**
- Coordina con i segnali del ciclo cellulare (**si spegne in Fase M**).



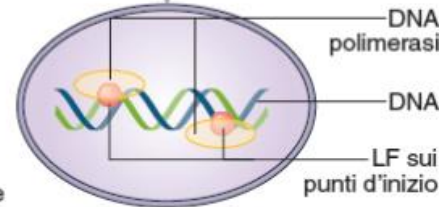
Strategie di replicazione (Licensing Factor)



Fase G1 precoce
Mancano gli enzimi per la duplicazione del DNA



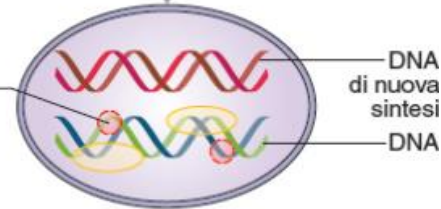
Fase G1 tardiva
Gli enzimi per la duplicazione del DNA vengono sintetizzati e si localizzano in corrispondenza del LF già ancorato ai punti di inizio della duplicazione



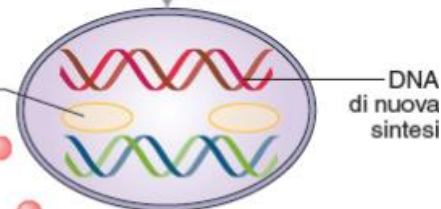
Fase S

Degradazione di LF

LF nel citosol, privo di segnali di localizzazione nucleare



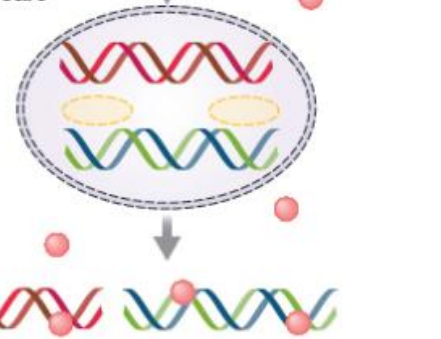
DNA polimerasi non trova punti di inizio



Fase M

Scomparsa involucro nucleare

DNA polimerasi degradata



LF può associarsi alla cromatina dopo la disgregazione dell'involucro nucleare, per funzionare nella fase S successiva

- Per una corretta replicazione del genoma eucariotico è, ovviamente, necessario che ogni origine di replicazione venga usata una sola volta ad ogni ciclo cellulare.
- Questo compito fondamentale è affidato al **Licensing Factor (LF)**, una proteina che viene sintetizzata solo durante la **fase G1** del ciclo cellulare.
- Essa entra nel nucleo e **assicura** che le prime **proteine del complesso** di riconoscimento dell'origine (**ORC**) **si posizionino correttamente sul DNA**.
- Una volta che la duplicazione è iniziata le proteine **LF vengono estromesse o sono disattivate**, mediante degradazione o espulsione dal nucleo.
- La combinazione della sintesi dei LF esclusivamente durante la fase G1, del loro ruolo all'interno dei complessi ORC, e della loro successiva inattivazione garantisce che ogni origine di replicazione venga attivata una sola volta per ciclo cellulare

Forcella e nucleosomi

- La forcella di replicazione deve attraversare nucleosomi pre-esistenti.
- Complessi di **rimodellamento della cromatina** e **chaperon istoniche**:
 - Destabilizzano DNA-istone.
 - Permettono avanzamento anche in eterocromatina condensata.
- Dietro la forcella rimangono ~**600 nt di DNA libero** → rapidamente ricoperti da nucleosomi neoformati.

Dinamica degli istoni durante la replicazione

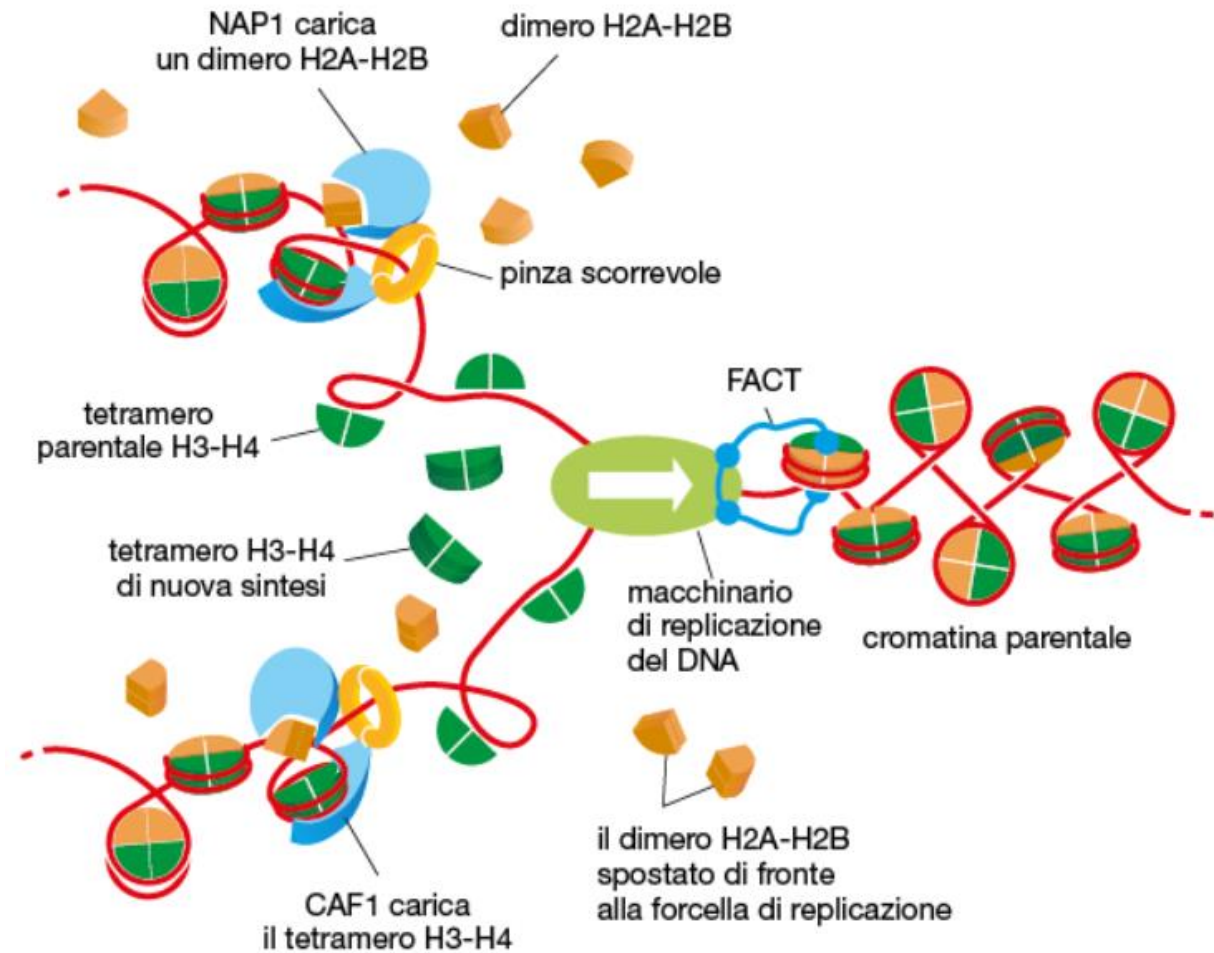
Quando un nucleosoma è superato dalla forcella:

- Ottamero si dissocia in:
 - **Tetramero H3-H4** → rimane vicino alla forcella, associato alle elicasi CMG.
 - **Dimeri H2A-H2B** → rilasciati completamente, possono migrare su cromosomi diversi.

Assemblaggio dietro la forcella:

- **Tetrameri H3-H4 parentali** distribuiti casualmente ai duplex figli.
- **Tetrameri H3-H4 nuovi** completano gli spazi.
- **Dimeri H2A-H2B** → per metà vecchi e metà nuovi.

Risultato: nucleosomi figli = per lo più **ibridi vecchi/nuovi**.



DNA Polimerasi Procariotiche ed Eucariotiche

TABELLA 4.1 DNA polimerasi procariotiche ed eucariotiche.

Enzimi	Direzione della sintesi	Attività esonucleasica	Funzioni possibili
<i>Procariotici</i>			
Polimerasi I	5' → 3'	3' → 5' 5' → 3'	Riempimento dei "gap" lasciati dalla rimozione dell'innesco; riparazione del DNA
Polimerasi II	5' → 3'	3' → 5'	Riempimento dei "gap" lasciati dalla rimozione dell'innesco; riparazione del DNA
Polimerasi III	5' → 3'	3' → 5'	Enzima principale della replicazione
Polimerasi IV	5' → 3'	?	Enzimi che polimerizzano nonostante esista un danneggiamento del DNA
Polimerasi V	5' → 3'	?	
<i>Eucariotici</i>			
Polimerasi α	5' → 3'	3' → 5'	Forma il complesso della primasi e permette l'inizio della polimerizzazione del DNA a valle dell'innesco di RNA
Polimerasi β	5' → 3'	Nessuna	Riparazione del DNA
Polimerasi γ	5' → 3'	3' → 5'	Enzima della replicazione dei mitocondri
Polimerasi δ	5' → 3'	3' → 5'	Enzima della replicazione sul lagging strand
Polimerasi ε	5' → 3'	3' → 5'	Enzima della replicazione sul leading strand
Polimerasi ζ	5' → 3'	?	Enzimi che polimerizzano nonostante esista un danneggiamento del DNA
Polimerasi η	5' → 3'	?	

Terminazione della replicazione

Batteri (E. coli):

- Replicazione inizia da un'unica origine.
- **Le forcelle si incontrano nel lato opposto del cromosoma.**
- **Sequenze specifiche** → **bloccano le forcelle** e ne favoriscono il disassemblaggio.
- Gaps riempiti da DNA polimerasi di riparazione + ligasi; **cromosomi separati da topoisomerasi.**

Eucarioti:

- **30.000–50.000 eventi di terminazione** per fase S.
- **Terminazione per incontro frontale di due forcelle** → disassemblaggio dell'elicasi CMG tramite ubiquitinazione.
- Proteine si dissociano, DNA ligasi e polimerasi di riparazione completano i tratti mancanti.



Il Problema dell'Estremità Cromosomica

Filamento in ritardo: ultimo primer a RNA non può essere sostituito → perdita di DNA a ogni divisione.

Eucarioti: risolto tramite **telomeri**:

- Sequenze ripetute **GGGTTA** (nel genoma umano).
- Ripetute migliaia di volte.
- Formano strutture protettive specializzate.

La telomerasi

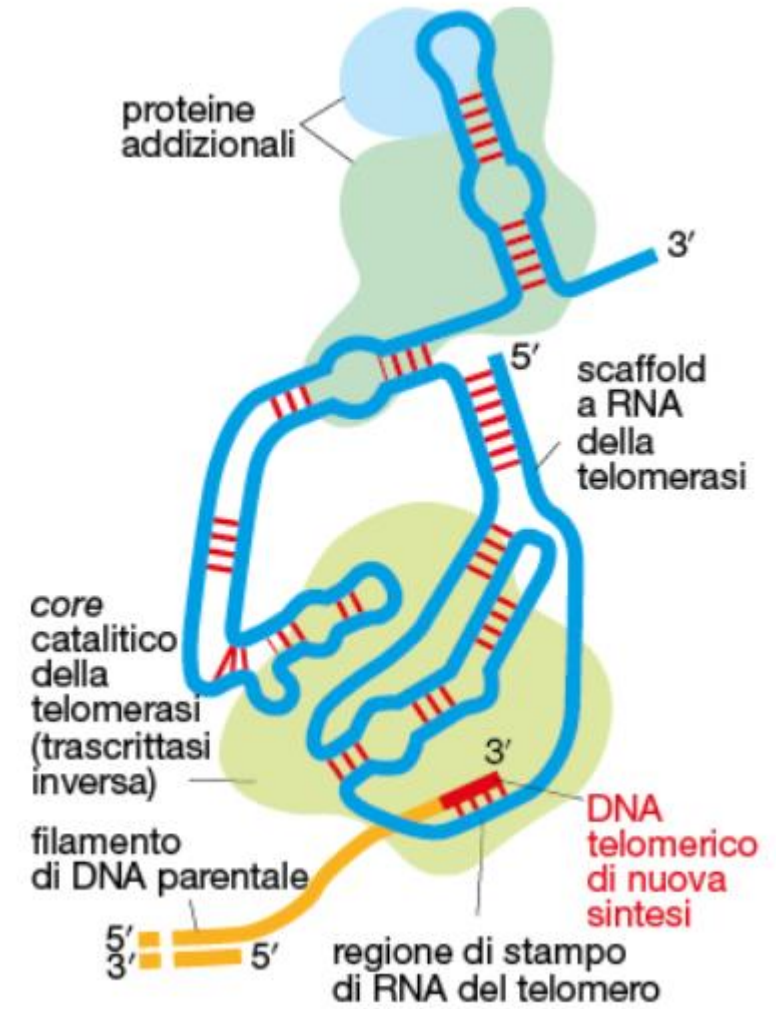
Enzima **ribonucleoproteico**:

- Subunità proteiche + RNA (stamp template).
- Attività di **trascrittasi inversa** → sintetizza DNA a partire dal proprio RNA.

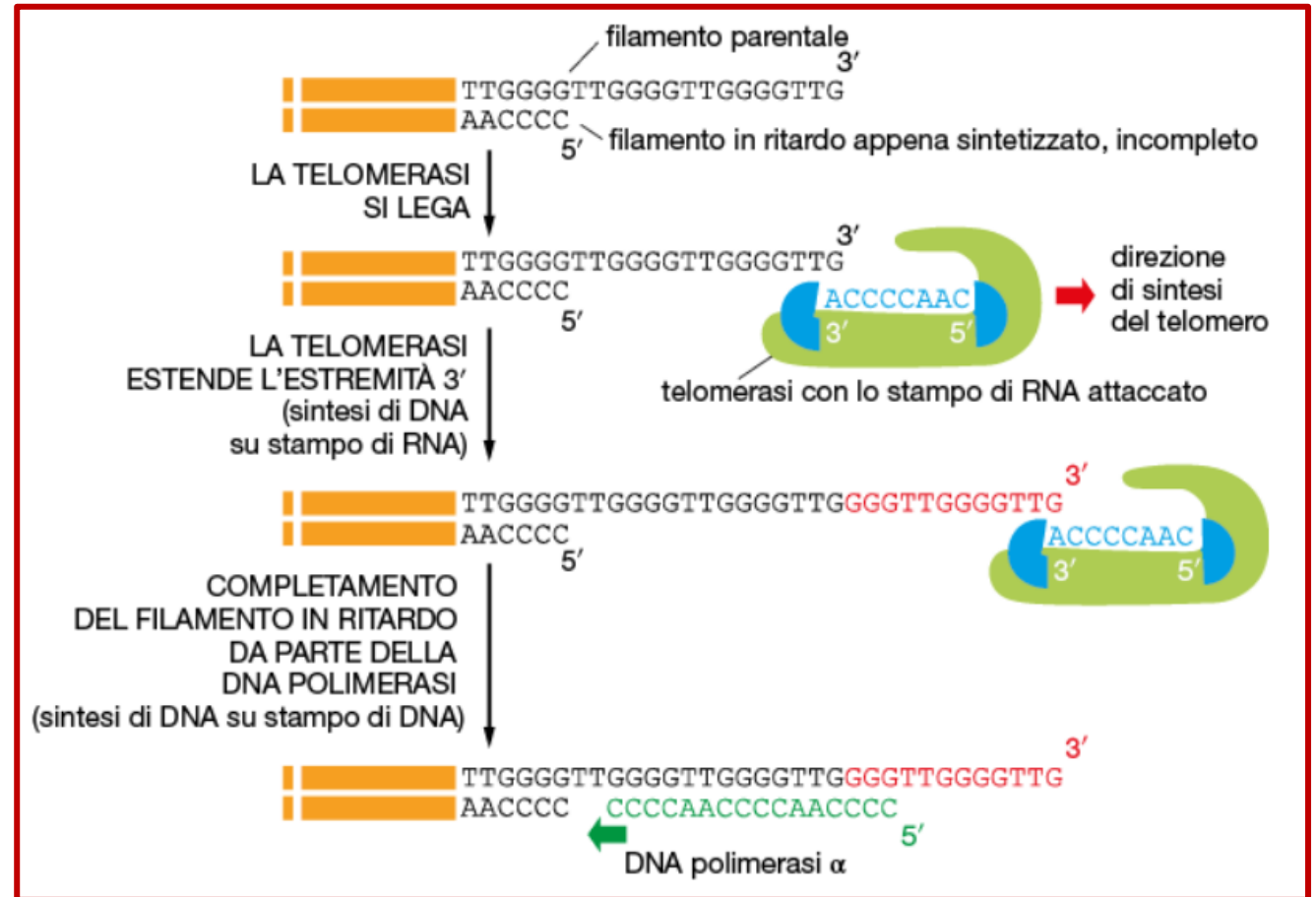
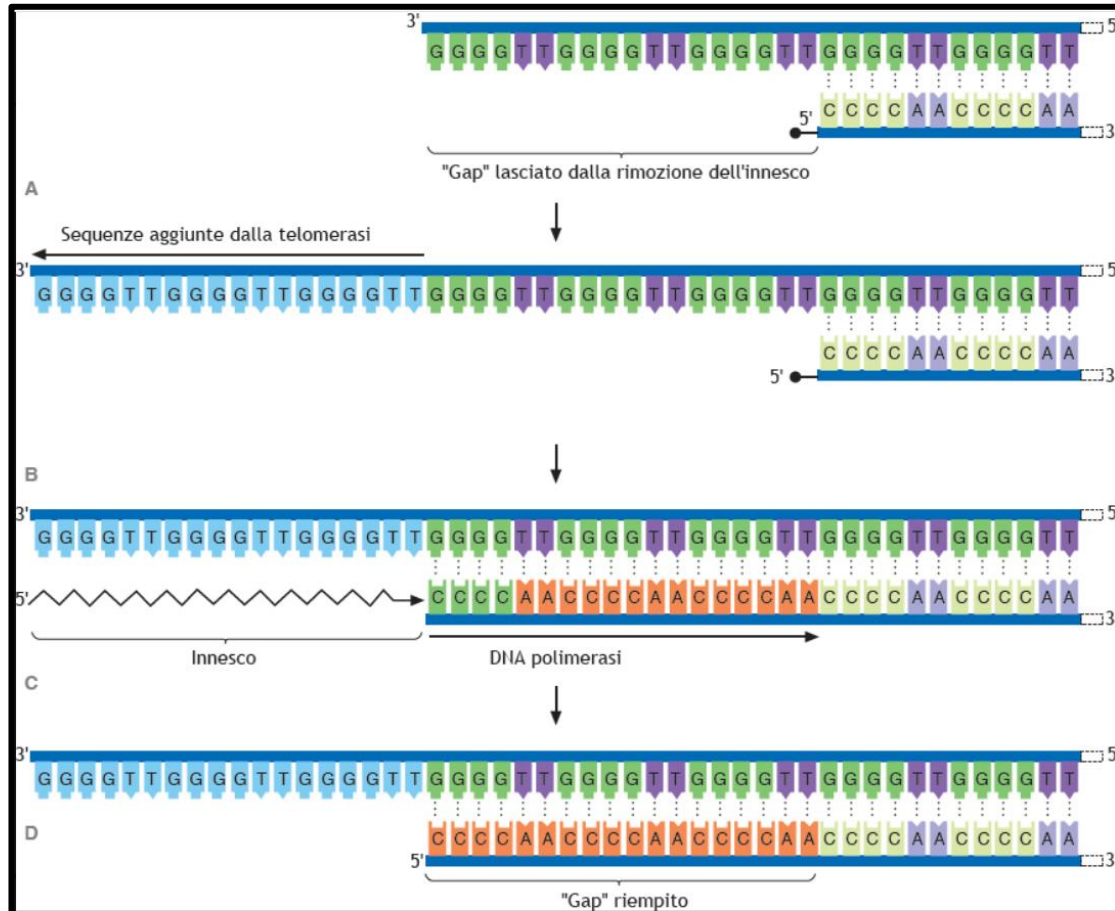
Funzione:

- **Estende il filamento parentale 3'.**
- Permette alla **DNA polimerasi** convenzionale di **completare** la copia del **filamento in ritardo**.

- Garantisce la **replicazione completa delle estremità cromosomiche**.



Meccanismo della Telomerasi



Protezione dei telomeri

Protezione dei telomeri

- Le estremità non devono essere confuse con rotture accidentali.
- Esistono quindi **due strutture protettive**:
 - **Shelterin: complesso proteico** che “cappuccia” i telomeri.
 - **Anse T (T-loop): l'estremità a singolo filamento si ripiega** sulla doppia elica → maschera la terminazione.
- Prevenzione di fusione cromosomica e instabilità genetica.

Regolazione della lunghezza telomerica

- **Equilibrio dinamico** tra accorciamento e allungamento.
- **Cellule staminali e germinali**: telomerasi attiva → lunghezza mantenuta.
- **Cellule somatiche**: bassa attività telomerasica → progressivo accorciamento (100–200 basi/divisione).

Quando i telomeri diventano troppo corti:

- Attivazione **risposta al danno al DNA**.
- Arresto permanente della proliferazione → **senescenza replicativa**.

