

5.1 Principi generali della replicazione del DNA

La replicazione del DNA è il processo mediante il quale il materiale genetico viene duplicato prima della divisione cellulare, assicurando che ogni cellula figlia riceva una copia completa e fedele del genoma. Questo processo è altamente conservato ed è caratterizzato da un meccanismo semiconservativo, in cui ciascuna molecola figlia contiene un filamento parentale e uno neosintetizzato. La replicazione procede in modo bidirezionale a partire da specifiche regioni chiamate origini di replicazione ed è organizzata in tre fasi principali: inizio, allungamento e terminazione.

5.1.1 Replicazione semiconservativa del DNA

Il modello semiconservativo della replicazione deriva dalla struttura a doppia elica del DNA proposta da Watson e Crick, secondo cui i due filamenti complementari possono fungere da stampo per la sintesi di nuovi filamenti. Questo modello è stato confermato sperimentalmente da Meselson e Stahl, che dimostrarono come, dopo ogni ciclo replicativo, ciascuna molecola di DNA contenga un filamento originale e uno sintetizzato *ex novo*, escludendo i modelli conservativo e dispersivo.

5.1.2 Modalità di replicazione del DNA a doppio filamento

La replicazione del DNA ha origine in sequenze specifiche chiamate origini di replicazione, da cui si sviluppano strutture caratteristiche come la bolla di replicazione e le forcelle replicative. Nella modalità più comune, la replicazione procede bidirezionalmente, con due forcelle che si allontanano dall'origine. Nei procarioti, il DNA circolare viene replicato secondo il modello θ , mentre in alcuni sistemi particolari può avvenire una replicazione a cerchio rotante, unidirezionale. Negli eucarioti, la presenza di origini multiple consente una duplicazione rapida ed efficiente di genomi molto più estesi.

5.2 Organizzazione della replicazione: la fabbrica replicativa

La replicazione del DNA avviene in contesti altamente organizzati chiamati fabbriche di replicazione, in cui il DNA viene processato da complessi multiproteici coordinati. Nei nuclei eucariotici, queste attività sono concentrate in foci di replicazione, strutture dinamiche che riflettono l'ordine temporale con cui diverse regioni del genoma vengono duplicate durante la fase S.



5.2.1 Fattori cis e trans

Il corretto svolgimento della replicazione dipende dall'interazione tra elementi cis-agenti, rappresentati da specifiche sequenze di DNA come origini e siti di terminazione, e fattori trans-agenti, costituiti da proteine ed enzimi mobili. Questa interazione garantisce che il processo inizi nei punti corretti, proceda con alta fedeltà e sia coordinato con il ciclo cellulare.



5.2.2 Repliconi e origini di replicazione

Per gestire la duplicazione del genoma, il DNA è organizzato in unità funzionali chiamate repliconi, ciascuno definito dalla propria origine di replicazione. Nei procarioti, un singolo replicone può comprendere l'intero cromosoma, mentre negli eucarioti ogni cromosoma contiene numerosi repliconi, permettendo una replicazione simultanea in più punti e riducendo i tempi complessivi della fase S.

5.3 Panoramica delle fasi della replicazione

La replicazione del DNA si articola in tre fasi principali. Durante l'inizio, il DNA viene localmente svolto nelle regioni di origine, formando le forcelle replicative. Nella fase di allungamento, i nuovi filamenti vengono sintetizzati in direzione 5'→3', con modalità continua per il filamento guida e discontinua per il filamento lento. La terminazione avviene quando le forcelle si incontrano o raggiungono specifiche regioni terminali, completando la duplicazione e risolvendo eventuali problemi strutturali, come quelli associati alle estremità dei cromosomi eucariotici, grazie all'azione della telomerasi.

5.4 Inizio della replicazione: le origini

La replicazione ha inizio in specifiche sequenze di DNA, le origini di replicazione, che vengono riconosciute da complessi proteici specializzati. Nei procarioti è presente generalmente una singola origine, mentre negli eucarioti esistono migliaia di origini distribuite lungo i cromosomi.

5.4.1 Inizio della replicazione nell'*Escherichia coli*

Nell'*Escherichia coli*, l'origine di replicazione è chiamata *oriC* ed è caratterizzata da sequenze specifiche riconosciute dalla proteina DnaA. Il legame cooperativo di DnaA induce l'apertura locale della doppia elica, processo facilitato da proteine architetturali come HU. Successivamente, l'elicasi DnaB viene caricata sul DNA grazie alla proteina DnaC, formando il complesso di pre-priming. Il sistema è finemente regolato da meccanismi come la metilazione del DNA e il legame della proteina SeqA, che impediscono riattivazioni premature dell'origine.

5.4.2 Origini di replicazione negli eucarioti

Negli eucarioti, le origini di replicazione sono più complesse e meno definite a livello di sequenza. Nel lievito, esse corrispondono alle sequenze ARS, riconosciute dal complesso ORC, che funge da piattaforma per il reclutamento di ulteriori fattori come Cdc6 e Cdt1. Questi permettono il caricamento dell'elicasi MCM2-7 e la formazione del complesso pre-replicative. L'attivazione di questo complesso durante la fase S dipende dall'azione coordinata di chinasi specifiche, garantendo che ogni origine venga attivata una sola volta per ciclo cellulare. Nei mammiferi, la selezione delle origini è influenzata da fattori strutturali ed epigenetici piuttosto che da sequenze consenso ben definite.

5.4.3 Proteine leganti DNA a singolo filamento

Una volta separati, i filamenti di DNA devono essere stabilizzati per evitare la formazione di strutture secondarie e la degradazione. Nei procarioti questa funzione è svolta dalle proteine SSB, mentre negli eucarioti dalla proteina RPA. Oltre alla stabilizzazione, queste proteine coordinano l'attività di altri enzimi coinvolti nella replicazione e nella risposta al danno del DNA.

5.4.4 Elicasi e primosoma

Le elicasi sono enzimi motori che utilizzano l'energia dell'ATP per separare i filamenti della doppia elica. Nei procarioti, l'elicasi principale è DnaB, mentre negli eucarioti è rappresentata dal complesso CMG. L'associazione tra elicasi e primasi forma il primosoma, una struttura funzionale che coordina lo svolgimento del DNA con la sintesi degli inneschi necessari per l'inizio della replicazione.

5.4.5 Primasi e sintesi del primer

Le DNA polimerasi non sono in grado di iniziare la sintesi de novo e richiedono un'estremità 3'-OH libera. Questa viene fornita da brevi inneschi di RNA sintetizzati dalla primasi. Nei procarioti la primasi DnaG produce primer brevi, mentre negli eucarioti il complesso Pol α -primasi sintetizza primer ibridi RNA-DNA che vengono successivamente estesi dalle polimerasi replicative principali.

5.5 Fase di allungamento

Durante l'allungamento, il DNA viene sintetizzato in modo continuo sul filamento guida e in modo discontinuo sul filamento lento, a causa dell'antiparallelismo dei filamenti e della direzionalità della DNA polimerasi. Questo rende la replicazione un processo complessivamente semi-discontinuo.

5.5.1 DNA polimerasi

Le DNA polimerasi sono gli enzimi responsabili della sintesi del DNA e possiedono una struttura conservata che ricorda una mano. Oltre all'attività polimerasica, molte presentano attività esonucleasica di correzione che aumenta la fedeltà della replicazione. Nei procarioti, la polimerasi principale è la DNA polimerasi III, mentre la DNA polimerasi I è coinvolta nella rimozione dei primer. Negli eucarioti, le principali polimerasi replicative sono Pol α , Pol ϵ e Pol δ , ciascuna con funzioni specifiche.

5.5.2 Allungamento nella forcella batterica

Nella replicazione batterica, la sintesi del DNA è altamente coordinata. Il filamento lento forma una struttura ad ansa, detta "trombone", che consente la sintesi simultanea dei due filamenti. I primer vengono rimossi dalla DNA polimerasi I e i frammenti di Okazaki vengono uniti dalla DNA ligasi.

5.5.3 Allungamento nella forcella eucariotica

Negli eucarioti, la replicazione è più complessa e dinamica. Il complesso CMG svolge il DNA, mentre RPA stabilizza i filamenti singoli. Le polimerasi replicative vengono caricate tramite PCNA e RFC. La rimozione dei primer avviene attraverso meccanismi che coinvolgono RNasi H1, FEN1 e, in alcuni casi, Dna2.

5.6 DNA ligasi

La DNA ligasi è responsabile della sigillatura dei nick nel DNA, formando legami fosfodiesterici tra nucleotidi adiacenti. Il processo richiede un passaggio intermedio di adenilazione e utilizza NAD⁺ nei batteri e ATP negli eucarioti.

5.7 Terminazione della replicazione

La terminazione avviene quando le forcelle replicative si incontrano. Nei procarioti, questo processo è regolato da sequenze specifiche e dalla proteina Tus, che crea una barriera direzionale. Negli eucarioti, la terminazione avviene in modo più casuale e coinvolge il disassemblaggio dei complessi replicativi e la separazione dei cromatidi fratelli.

5.8 Replicazione del DNA mitocondriale

Il DNA mitocondriale è replicato da un sistema dedicato che coinvolge la DNA polimerasi γ . La replicazione avviene secondo un meccanismo di spostamento del filamento ed è asincrona, con sintesi separata dei filamenti pesante e leggero.

5.9 Rilevanza clinica

Difetti nei meccanismi di replicazione del DNA possono causare instabilità genomica e sono associati a diverse patologie umane, tra cui ritardi dello sviluppo e predisposizione al cancro, evidenziando l'importanza della precisione di questo processo.