

Figura 6.1 Replicazione semi-conservativa.

La doppia elica parentale è rappresentata in grigio. Dopo la replicazione ogni doppia elica è costituita da un filamento parentale (grigio) ed uno di neosintesi (verde).

Figura 6.2 Sintesi di DNA diretta da uno stampo.

Un filamento di DNA parentale (grigio) agisce da stampo per la sintesi di un nuovo filamento complementare (verde), mediante appaiamenti sequenziali dei nucleotidi entranti con lo stampo. L'adenina (A) si appaia con la timina (T), mentre la guanina (G) si appaia con la citosina (C). I nucleotidi che si appaiano correttamente vengono aggiunti all'estremità 3' del nuovo filamento dall'enzima DNA polimerasi. Il nuovo filamento è sempre sintetizzato nella direzione 5'→3'.

Figura 6.3 Replicazione bidirezionale del DNA.

- a) La replicazione del DNA inizia nell'origine di replicazione (in rosso) e si allontana da essa in entrambe le direzioni copiando i due filamenti di DNA. Ciò crea una struttura nota come bolla di replicazione.
- b) Alle estremità della bolla si muovono due forcelle replicative, dove la doppia elica parentale viene continuamente srotolata ed il nuovo DNA (in verde) viene sintetizzato. Il riquadro mostra un ingrandimento di una forcella di replicazione. Il filamento sintetizzato in modo continuo nella direzione 5'→3' è il filamento guida (freccia verde continua), mentre quello sintetizzato in modo discontinuo è il filamento ritardato (corte frecce verdi). Questi frammenti di DNA vengono poi uniti assieme per formare un filamento continuo di DNA.

I FILAMENTI GUIDA E RITARDATO SI RIFERISCONO AI PARENTALI QUINDI NON SONO LE FRECCE VERDI

Figura 6.4 Fasi della replicazione del DNA.

La replicazione del DNA può essere descritta da una serie di passaggi distinti.

Inizio: (1) Caricamento delle elicasi: le elicasi (in arancione) vengono reclutate sull'origine di replicazione (in rosso) da proteine iniziatrici (non mostrate), e la doppia elica di DNA viene aperta per permettere la copiatura di entrambi i filamenti. La piccola bolla di replicazione è ora pronta per iniziare la replicazione del DNA. (2) Sintesi degli inneschi: le primasi (in arancione) sono reclutate dalle elicasi ed iniziano la sintesi degli inneschi di RNA (in turchese) su entrambi i filamenti. Gli inneschi permettono alle DNA polimerasi di iniziare la sintesi dei filamenti di DNA. Per semplicità qui è mostrata solo la primasi batterica. Negli eucarioti il complesso pol α -primasi sintetizza un innesco di RNA seguito da un corto segmento di DNA.

Allungamento: (3) Caricamento della pinza scorrevole: il caricatore della pinza (non mostrato) si lega all'estremità 3' della giunzione innesco-stampo e posiziona la pinza scorrevole (in arancione) attorno al DNA. (4) Reclutamento della polimerasi replicativa (in violetto): l'interazione con la pinza scorrevole posiziona la polimerasi in modo da allungare l'estremità 3' dell'innesco. (5) Movimento bidirezionale della forcella e allungamento dei filamenti: le due forcelle si muovono allontanandosi dall'origine in direzioni opposte ed effettuando la sintesi dei nuovi filamenti di DNA. La sintesi di DNA sul filamento ritardato è discontinua e produce corti segmenti di DNA iniziati nella forcella replicativa ed allungati in direzione 5'→3'.

Terminazione: (6) Una volta che la replicazione è stata completata, la DNA ligasi (non mostrata) salda tutte le interruzioni della doppia elica, portando alla formazione di due molecole di DNA uguali.

→ I telomeri sono trattati più in dettaglio nelle Sezioni 4.11 e 6.11

Figura 6.5 La DNA polimerasi assomiglia ad una mano destra.

- a) Struttura cristallina del frammento di Klenow della DNA polimerasi I di *E. coli*, che contiene i domini della polimerasi e dell'attività 3'→5' esonucleasica, ma è priva del dominio con attività 5'→3' esonucleasica presente nella pol I intatta. La struttura della polimerasi assomiglia ad una mano destra, con il dominio delle dita da un lato, quello del palmo che forma una cavità in cui viene alloggiato il DNA ed il dominio del pollice nella parte superiore. Il dominio dell'esonucleasi in questa classe di polimerasi è situato lateralmente rispetto agli altri tre domini della polimerasi (PDB 1KLN).
- b) Rappresentazione schematica della struttura della polimerasi mostrata in (a). Il dominio del palmo è all'interno della struttura. Il DNA stampo a singolo filamento è situato dietro alle dita nel sito attivo del palmo dove viene catalizzata l'aggiunta dei nucleotidi. Il nucleotide entrante viene unito al 3'OH libero del filamento neosintetizzato nel sito attivo della polimerasi. La nuova doppia elica fuoriesce dalla polimerasi sul lato posteriore.

Figura 6.6 Meccanismo catalitico basato su due ioni metallici.

I gruppi carbossilato di due residui conservati di aspartato nel sito attivo della polimerasi coordinano due ioni metallici (di solito ioni magnesio Mg^{2+} nelle DNA polimerasi) e li mantengono nella corretta orientazione per poter partecipare alla catalisi. Uno ione Mg^{2+} interagisce col gruppo 3'OH del filamento in crescita, mentre l'altro interagisce col nucleoside trifosfato entrante (in verde ed arancione). **Lo ione Mg^{2+} legato al filamento in crescita aumenta la nucleofilicità del gruppo 3' OH, stabilizzando la carica negativa conseguente alla perdita del protone e favorendone l'attacco nucleofilo sul gruppo α -fosforico del nucleoside trifosfato entrante, con la formazione di un nuovo legame fosfoesterico O-P.** I gruppi fosfato β e γ (in arancione) vengono rilasciati e successivamente idrolizzati da una pirofosfatasi. Entrambi gli ioni metallici stabilizzano la struttura dello stato di transizione della reazione. Questo trasferimento di un gruppo fosforico, catalizzato da due ioni metallici, è simile in tutte le polimerasi, incluse le RNA polimerasi.

Figura 6.7 Confronto tra appaiamenti corretti e incorretti.

Nucleotidi appaiati incorrettamente (mismatch) presentano una conformazione molecolare diversa da quella degli appaiamenti corretti (o canonici). La figura mostra le coppie canoniche G-C e T-A, (in grigio), sovrapposte ai mismatch G-T, G-A e G-G (in bianco-rosso). La differenza tra le conformazioni degli appaiamenti corretti ed incorretti è evidente. Si noti quanto siano invece simili le conformazioni delle due coppie canoniche G-C e T-A. Solo i nucleotidi appaiati correttamente si adattano perfettamente al sito attivo della polimerasi.

Da Johnson e Beese (2004).

Figura 6.8 I passaggi della correzione di bozze (“proofreading”).

Se una coppia di basi incorretta viene incorporata, nonostante la discriminazione sulla forma operata dal sito attivo della polimerasi (Figura 6.7), essa può essere rimossa mediante un sistema di correzione. Il nucleotide incorretto (in rosso), presente al terminale 3' del filamento in crescita, viene riposizionato nel sito esonucleasico 3'→5' della polimerasi. Questo spostamento coinvolge la rottura di alcune coppie di basi fra la catena nascente e lo stampo. Nel sito esonucleasico il nucleotide all'estremità 3' viene rimosso dal filamento di DNA e la nuova estremità 3' ritorna nel sito attivo della polimerasi dove riprende l'aggiunta dei nucleotidi.

Figura 6.9 Polimerasi processive e non processive.

- a) Nella sintesi processiva del DNA la polimerasi resta associata al filamento di DNA stampo per molte migliaia di nucleotidi.
- b) Le polimerasi che sintetizzano solo corte regioni di DNA sono di solito non processive o distributive. La polimerasi è legata allo stampo e sintetizza DNA, tuttavia ha una certa probabilità di dissociarsi dal DNA. Una nuova polimerasi può allora legarsi al DNA sull'innesco-stampo e riprendere la sintesi.

→ Vedremo in dettaglio le polimerasi coinvolte nella la riparazione del DNA nel Capitolo 12.

Figura 6.10 Famiglie delle DNA polimerasi.

Figura 6.11 Struttura dell'elicasi E1 del virus del papilloma legata al DNA.

La proteina elicasi ha una forma ad anello composto da sei subunità identiche (PDB 2GXA). La struttura mostra che un singolo filamento di DNA si adatta perfettamente nel foro centrale dell'elicasi. Sono stati evidenziati cinque punti di contatto fra i fosfati del DNA a singolo filamento e specifici loop (eliche) della proteina, che ne permettono il movimento lungo il DNA. Da Enemark e Joshua-Tor (2006).

Figura 6.12 Meccanismo d'azione della elicasi.

I cinque punti di contatto fra i fosfati del DNA a singolo filamento (in grigio) e le subunità dell'elicasi (in arancione), permettono all'elicasi di avanzare lungo il DNA. Ogni sito di legame del DNA sulla proteina è in contatto con un solo nucleotide. L'idrolisi di ATP ed il successivo rilascio di ADP, seguiti da un nuovo ciclo di legame di ATP all'interfaccia fra le subunità, determina l'avanzamento della proteina. L'idrolisi di ATP porta a rilascio del DNA mentre il legame di una nuova molecola di ATP, permette alla subunità liberata di legarsi al successivo fosfato disponibile sul DNA a singolo filamento, scortandolo lungo il canale in una serie di passaggi che si ripetono ciclicamente.

Figura 6.13 Superavvolgimento del DNA a monte della forcella di replicazione.

Durante lo srotolamento del DNA operato dall'elicasi a livello della forcella di replicazione, a monte della forcella, l'avvolgimento elicoidale ("twist") del DNA si traduce in superavvolgimenti (writhe), man mano che la forcella avanza. Il DNA di un cromosoma batterico circolare, o di un cromosoma eucariotico è topologicamente chiuso. Per evitare il blocco della forcella di replicazione, i superavvolgimenti dovranno essere eliminati dalle topoisomerasi.

→ La relazione fra avvolgimento ("twist"), superavvolgimento ("writhe") e numero di legame ("linking number") è stata trattata nel Capitolo 2.

Figura 6.14 Tre diversi meccanismi con cui le topoisomerasi rilassano i superavvolgimenti del DNA.

- a) Le topoisomerasi di tipo IA tagliano il DNA a singolo filamento e favoriscono il passaggio di un filamento attraverso l'altro.
- b) Anche le topoisomerasi di tipo IB tagliano il DNA a singolo filamento, permettendo al terminale libero di srotolarsi per rimuovere i superavvolgimenti prima di essere risaldato.

c) Le topoisomerasi di tipo II tagliano entrambi i filamenti di DNA facendo passare un segmento di DNA a doppio filamento attraverso la rottura. Il meccanismo con cui le topoisomerasi di tipo II rilassano i superavvolgimenti è mostrato più in dettaglio nella Figura 6.15.

Dalla Figura 1 di Corbett e Berger (2004).

Figura 6.15 Le topoisomerasi di tipo II rompono il DNA a doppio filamento per permettere il passaggio di un segmento a doppia elica.

Una topoisomerasi di tipo II taglia entrambi i filamenti di una molecola di DNA permettendo ad un segmento a doppia elica intatta di passare attraverso l'apertura. Ciò permette anche di separare due doppie eliche concatenate. (1) La topoisomerasi lega due segmenti di DNA a doppia elica (notare che, a questo punto, l'elica blu è sopra l'elica rossa). (2) La doppia elica rossa viene tagliata e la doppia elica blu viene fatta passare attraverso l'apertura. (3) L'elica rossa viene risaldata e l'elica blu ora si trova sotto a quella rossa. L'inversione della posizione delle due doppie eliche, determina un cambiamento del "writhe" e la rimozione di superavvolgimenti.

→ Rivedere la relazione fra superavvolgimento ("writhe"), avvolgimento ("twist) e numero di legame ("linking number") nella Sezione 2.5.

Figura 6.16 Struttura delle pinze scorrevoli.

- a) La pinza scorrevole di *E. coli* è composta da due proteine β identiche, ognuna delle quali formata da tre domini simili. La dimerizzazione forma un anello a sei domini (PDB 2POL).
- b) La pinza scorrevole eucariotica è una struttura ad anello formata da un trimero della proteina PCNA, che presenta due domini simili (PDB 1AXC). La struttura delle due pinze scorrevoli è molto simile nonostante le differenze nel numero di subunità e nella loro sequenza. Durante la replicazione, il DNA scorre nel foro centrale dell'anello.
Da O'Donnell *et al.* (2001).

Figura 6.17 Struttura del caricatore della pinza scorrevole.

- a) Struttura del co-cristallo del caricatore della pinza scorrevole (fattore di replicazione C, RFC) e della pinza scorrevole PCNA, con il DNA modellato sulla struttura (PDB 1SXJ e 3GLF). PCNA è mostrato in arancione, mentre ogni subunità di RCF è rappresentata con un colore diverso. La pinza RCF forma un'elica che segue l'avvolgimento del DNA.
- b) Rappresentazione schematica del complesso RFC/PCNA/DNA, che mette in risalto ognuna delle 5 subunità di RFC ed il modo con cui il DNA posiziona nel complesso.

Figura 6.18 Assemblaggio della pinza scorrevole sul DNA.

La pinza scorrevole viene assemblata sul DNA, a livello dell'innescamento, dal caricatore della pinza.

- 1) Il legame dell'ATP al caricatore della pinza (in blu) porta alla sua associazione con la pinza scorrevole (in arancione) e all'apertura dell'anello della pinza.
- 2) Il complesso aperto 'caricatore della pinza-pinza scorrevole' ha un'alta affinità per il terminale 3' della giunzione innescamento sul DNA.
- 3) Il legame del DNA innesca l'idrolisi dell'ATP, con conseguente chiusura della pinza e rilascio del caricatore della pinza.

4) La pinza scorrevole recluta la DNA polimerasi (in violetto) sulla giunzione innesco-stampo per iniziare l'allungamento.

Figura 6.19 L'inizio della replicazione avviene in siti specifici sul DNA.

Le origini di replicazione sono di solito costituite da alcune sequenze specifiche sul DNA (tratti arancioni), che legano con elevata affinità la proteina iniziatrice (in verde). Il legame della proteina iniziatrice a queste sequenze, causa l'apertura della doppia elica in una vicina regione ricca in AT (in rosso). Alcune proteine della replicazione, come la DNA elicasi (in arancione), si legano al DNA srotolato ed iniziano a reclutare altre proteine necessarie per la replicazione.

Figura 6.20 Avvolgimento della proteina iniziatrice DnaA attorno al DNA.

- a) Struttura a spirale della DnaA oligomerica, attorno a cui si avvolge il DNA (PDB 2HCB).
- b) Rappresentazione schematica del DNA avvolto attorno alla DnaA legata all'ATP e successivo srotolamento della sequenza dell'origine ricca in AT.

Da Erzberger JP *et al.*, *Nature Structural and Molecular Biology* 2006; **13**:676-683.

Figura 6.21 Inizio della replicazione del DNA nell'origine *oriC* di *E. coli*.

- 1) La proteina iniziatrice DnaA si lega con alta affinità a tre elementi di DNA ("DnaA Boxes") nell'origine di *E. coli*. Il legame della DnaA al DNA è cooperativo (il legame delle prime subunità favorisce quello delle subunità successive) mentre l'ATP favorisce l'oligomerizzazione a forma di elica destrorsa di queste proteine.
- 2) L'avvolgimento del DNA attorno al complesso e la proteina DnaA stessa favoriscono lo srotolamento locale di una regione adiacente ricca in AT.
- 3) Il caricatore dell'elicasi DnaC lega l'elicasi DnaB e la carica sul DNA a singolo filamento.
- 4) Successivamente DnaC si dissocia e l'origine è pronta per reclutare la primasi ed altre proteine della replicazione.

→ L'acetilazione degli istoni è stata descritta nella Sezione 4.5, mentre la regolazione della trascrizione sarà trattata nel Capitolo 8.

Figura 6.22 Origine di replicazione del lievito *S. cerevisiae*.

Le origini di replicazione in *S. cerevisiae* contengono due sequenze interne (A e B1), che insieme legano il complesso di riconoscimento dell'origine (ORC). L'elemento A contiene una regione di 11 bp, detta "ARS di consenso", la cui sequenza è altamente conservata in tutte le origini del lievito in gemmazione. L'origine di replicazione contiene anche una regione meno conservata (B2), che funge da sito principale per l'apertura della doppia elica del DNA. Alcune origini del lievito in gemmazione contengono una terza regione (B3, non mostrata), che lega un fattore proteico aggiuntivo (Abf1, non mostrato), che aiuta a regolare l'attività dell'origine, probabilmente controllando i confini dei nucleosomi in ARS.

Figura 6.23 Le primasi catalizzano la sintesi di un corto frammento di RNA, che funge da innesco per la replicazione del DNA.

- a) La primasi eucariotica fa parte del complesso DNA polimerasi α -primasi, qui mostrato in forma semplificata: la primasi eucariotica nativa (in arancione) è un enzima a due subunità, come la polimerasi α (in rosa).
- b) Le primasi batteriche (in arancione) sono RNA polimerasi monomeriche. Quella di *E. coli* è nota anche come DnaG.

Figura 6.24 Lo scambio delle polimerasi.

Negli eucarioti l'innescò di RNA è sintetizzato dal complesso polimerasi α -primasi (in rosa), che si lega al DNA a singolo filamento rivestito della proteina RPA, che lega i filamenti singoli. Il complesso sintetizza inizialmente un innescò di RNA, poi passa alla sintesi di DNA. La polimerasi viene presto rimpiazzata da una polimerasi più processiva, δ o ϵ . Lo scambio delle polimerasi è la conseguenza del legame del caricatore della pinza (in blu) alla giunzione fra il terminale 3' dell'innescò e il DNA stampo a singolo filamento. Il caricatore della pinza posiziona la pinza (in arancione) sul DNA, che a sua volta recluta la polimerasi δ o ϵ (in violetto).

Figura 6.25 Maturazione dei frammenti di Okazaki in *E. coli*.

Sul filamento ritardato, la DNA polimerasi III sintetizza nuovo DNA partendo dal terminale 3' di un innescò fino a raggiungere l'estremità 5' dell'innescò del precedente frammento di Okazaki. Quando la polimerasi III incontra il 5' dell'innescò, si stacca dal DNA e viene sostituita dalla polimerasi I. L'attività esonucleasica 5'→3' della DNA polimerasi I rimuove l'innescò di RNA, mentre la sua attività polimerasica sintetizza DNA per colmare la sequenza a singolo filamento. Al termine della sua azione, la DNA polimerasi I lascia un'interruzione nello scheletro di DNA ("nick"), che viene saldata dalla DNA ligasi, precedentemente reclutata dal legame al caricatore della pinza.

Figura 6.26 Maturazione dei frammenti di Okazaki negli eucarioti.

La DNA polimerasi δ continua a sintetizzare DNA oltre il terminale 5' del frammento di Okazaki precedente, spiazzando il singolo filamento che contiene l'innescò di RNA a partire dall'estremità 5'. L'esonucleasi Fen1 taglia poi il filamento spiazzato, lasciando un'interruzione nello scheletro di DNA ("nick"), che viene saldata dalla DNA ligasi. PCNA è l'acronimo di "proliferative cell nuclear antigen" ovvero antigene nucleare della cellula in proliferazione.

Figura 6.27 La bolla di replicazione.

- a) Bolla di replicazione che mostra la direzione di sintesi del DNA sui filamenti guida e ritardato.
- b) Bolla di replicazione che mostra le due forcelle replicative con i filamenti ritardati ripiegati ad ansa, per permettere alle polimerasi associate a ciascuna una forcella di sintetizzare DNA compatibilmente con la direzione in cui si muove la forcella.

Figura 6.28 La forcella replicativa di *E. coli*.

I filamenti guida e ritardato sono accoppiati grazie alla formazione di un'ansa. Il filamento ritardato è mostrato ripiegato ad ansa unitamente ad un frammento di Okazaki completo (1) e ad una molecola di DNA polimerasi III, che sta completando la sintesi del successivo frammento di Okazaki (2). Un nuovo innescò è in via di sintesi da parte della primasi nell'ansa del filamento ritardato. Il filamento guida viene sintetizzato in modo continuo e l'intera forcella si sta muovendo verso destra. Il replisoma che si muove con la forcella contiene due molecole di DNA polimerasi III legate ad una pinza scorrevole e tenute assieme dalla proteina τ (non mostrata).

Figura 6.29 La replicazione dei cromosomi circolari genera molecole concatenate.

La replicazione di una doppia elica di DNA circolare porta a due doppie eliche figlie intrecciate o concatenate che vengono separate dalle topoisomerasi di tipo IA (passaggio 3) o dalle topoisomerasi di tipo II (passaggio 4).

Figura 6.30 Due forcelle convergenti creano DNA intrecciato.

Nei cromosomi lineari, quando due forcelle convergenti replicano la regione di DNA interposta, determinano l'avvolgimento in una struttura a superelica delle due molecole figlie complete. Questa struttura viene risolta da una topoisomerasi prima che i cromosomi si separino.

Figura 6.31 Il problema della replicazione delle estremità.

Dopo l'inizio della replicazione, la sintesi dei filamenti guida e ritardato procede fino alla fine del DNA cromosomico. Durante la replicazione, gli inneschi di RNA dei frammenti di Okazaki adiacenti vengono rimossi e sostituiti con DNA sfruttando il 3'OH del frammento di Okazaki successivo. I frammenti vengono infine saldati fra loro dalla DNA ligasi. Tuttavia, gli inneschi che si trovano alle estremità del cromosoma, una volta rimossi, non possono essere sostituiti con DNA in quanto manca un gruppo 3'OH. Quando questi filamenti incompleti saranno replicati nel successivo ciclo di sintesi del DNA, la sequenza di quell'innesco verrà inevitabilmente persa.

Figura 6.32 La risoluzione del complesso di replicazione può portare alla perdita dell'ultimo frammento di Okazaki.

La figura mostra una forcella di replicazione in cui il DNA a singolo filamento è legato dalle proteine SSB. Quando la forcella replicativa raggiunge l'estremità del cromosoma, il complesso di replicazione viene disassemblato. Dato che il filamento ritardato forma un'ansa, per permettere la sintesi coordinata dei filamenti guida e ritardato, può capitare che il complesso si dissolva prima che l'ultimo frammento di Okazaki sia stato completato. Ciò comporta la perdita di un frammento della sequenza del filamento ritardato. Anche il filamento guida può subire la perdita di una piccola regione a seguito del collasso della forcella.

Figura 6.33 Meccanismi per risolvere il problema della replicazione delle estremità.

La tabella elenca alcuni dei meccanismi usati da una varietà di organismi per evitare la perdita DNA alle estremità dei cromosomi durante la replicazione.

Figura 6.34 Allungamento dei telomeri da parte della telomerasi.

La telomerasi si lega al DNA a singolo filamento ricco in GT all'estremità di un telomero. La parte terminale del filamento di DNA che contiene il 3'OH si appaia con la regione dell'RNA della telomerasi che funge da stampo (sequenza AACCCCAAC in verde). Nella fase di allungamento, le sequenze telomeriche vengono copiate ripetutamente, usando come guida lo stampo ad RNA, e come innesco il terminale 3'OH del DNA (nucleotidi in rosso). Una volta raggiunta l'estremità dello stampo ad RNA, la telomerasi avanza, riposizionando il nuovo terminale 3' del DNA nella posizione più interna dell'RNA stampo per iniziare un altro ciclo di allungamento. La telomerasi non si dissocia dal DNA durante la traslocazione e può aggiungere, in modo processivo, centinaia di

nucleotidi. Siccome il processo prevede la copiatura ciclica della stessa sequenza dello stampo, il DNA telomerico presenterà sequenze ripetute.

Figura 6.35 Segregazione degli istoni.

La replicazione dei cromosomi negli eucarioti procede di pari passo con la duplicazione della cromatina e del DNA. Quando la forcella di replicazione scorre sulla cromatina, metà dei vecchi istoni “core” H3 e H4 (palline chiare) vanno a finire su un filamento di DNA figlio e metà sull’altro, mentre il nucleosoma intero viene ricostituito a valle della forcella. Gli istoni “core” H3 e H4 neosintetizzati (palline scure) vengono quindi caricati su entrambe le molecole figlie, per mantenere un rapporto di un nucleosoma ogni circa 200 bp. L’eredità dei vecchi istoni H3 e H4, da parte di ciascuna molecola figlia di DNA, permette la trasmissione dello stato modificato degli istoni in ogni regione del DNA su entrambi i neo cromosomi.

Figura 6.36 Assemblaggio dei nucleosomi da parte di Caf1.

Le proteine istoniche H3 e H4 neosintetizzate ed acetilate, in associazione con Asf1, si assemblano formando un **eminucleosoma**. Questo **eminucleosoma** acetilato si lega alla proteina Caf1, che assieme ad Asf1 facilita il posizionamento degli istoni sul DNA.

Figura 6.37 Caricamento mediato da Caf1 dei tetrameri H3-H4 sul DNA in replicazione.

Per caricare i nucleosomi con gli istoni H3 e H4 neosintetizzati (1), Caf1 e Asf1, legati ad un **eminucleosoma** contenente H3 e H4 acetilati, interagiscono con la pinza scorrevole PCNA (2) e depositano il tetramero H3-H4 sul DNA. Altri fattori di assemblaggio della cromatina, fra cui FACT (non mostrato), assemblano poi il tetramero H2A-H2B sul tetramero H3-H4 per formare un nucleosoma completo (3). La spaziatura fra nucleosomi è regolata dai complessi di rimodellamento della cromatina, mentre gli istoni vengono sottoposti ad altre modificazioni chimiche, come la deacetilazione (4). Caf1 ed Asf1 caricano solo i tetrameri H3-H4 sul DNA neosintetizzato a valle della forcella. Per semplicità è mostrato solo uno dei due rami della forcella.

Figura 6.38 Il legame di ATP da parte di DnaA regola l’attivazione di *oriC*.

La proteina DnaA legata all’ATP oligomerizza, legandosi in siti specifici (in arancione) in *oriC*. Il DNA si avvolge attorno all’oligomero che determina l’apertura della doppia elica, come descritto in Figura 6.20. L’elicasi DnaB viene caricata dalla proteina DnaC (non mostrata) sul DNA srotolato. Successivamente viene sintetizzato l’innesco e caricata la pinza scorrevole che a sua volta recluta la DNA polimerasi III. L’interazione fra pinza scorrevole, DNA polimerasi III, proteina Hda (non mostrata) e DnaA stimola l’idrolisi dell’ATP legato alla DnaA. La DnaA legata all’ADP non è più in grado di oligomerizzare né di legarsi al DNA e quindi si dissocia dalla doppia elica. Questo è uno dei diversi livelli di regolazione che impediscono la riattivazione prematura di *oriC*.

Figura 6.39 *oriC* contiene diverse sequenze GACT bersaglio della Dam metilasi.

Prima della replicazione, i siti GATC situati all’interno di *oriC* e sovrapposti a quelli a cui si lega la proteina DnaA (in arancione), sono metilati (triangoli blu) su entrambi i filamenti. Alcune molecole di DnaA legate all’ATP (palline verdi) si legano a questi siti, rendendo possibile l’inizio della replicazione, come descritto in Figura 6.38. Per un breve periodo dopo l’inizio, i siti GATC della nuova doppia elica risultano emimetilati (il filamento parentale è metilato mentre il filamento neosintetizzato non è stato ancora metilato). La proteina SeqA si lega a questi siti emimetilati, impedendo alla DnaA di legarsi nuovamente ad *oriC*. Dopo un certo lasso di tempo SeqA si dissocia, rendendo così possibile la metilazione completa dei siti GATC da parte della Dam metilasi

e quindi l'inizio della replicazione nella cellula figlia. SeqA si lega anche al promotore emimetilato del gene *dnaA*, impedendo la sintesi di nuove molecole di DnaA fino a quando il promotore di *dnaA* non verrà completamente metilato.

Figura 6.40 Assemblaggio del complesso pre-replicativo

Quando è legato all'origine, ORC recluta altre due proteine, Cdc6 e Cdt1, per formare un complesso più grosso, responsabile del caricamento sul DNA del complesso Mcm2-7, formato da sei subunità. Non è ancora chiaro quante copie di ciascun componente sono presenti nel complesso. Per semplicità sono mostrate due sole copie del complesso Mcm2-7, posizionate in modo da potersi muovere in direzione opposta sul DNA dopo l'attivazione dell'origine.

Figura 6.41 Il complesso pre-replicativo viene attivato per dare inizio alla replicazione mediante fosforilazione da parte della proteina Cdc6.

Le proteine Cdk e la chinasi Cdc7 di fase S innescano l'attivazione dell'origine fosforilando Cdc6. Sia Cdc6 che Cdt1 vengono allontanate dall'origine e Cdc6 viene poi degradata. L'attivazione dell'origine porta anche all'attivazione dell'elicasi Mcm2-7 e all'apertura della doppia elica di DNA. Le proteine RPA (non mostrate) si legano al DNA a singolo filamento per prevenirne il riavvolgimento, successivamente il complesso polimerasi α -primasi inizia la sintesi dell'innesco e del DNA.