

Ricombinazione del DNA

Processo enzimatico con cui l'organizzazione lineare del DNA in un cromosoma viene modificata mediante unioni e rotture.

Gli eventi che caratterizzano la ricombinazione genetica si dividono in almeno 3 classi:

Ricombinazione genetica omologa: riguarda scambi di materiale genetico tra due molecole qualsiasi di DNA (o segmenti della stessa molecola) che possiedono ampie regioni omologhe.

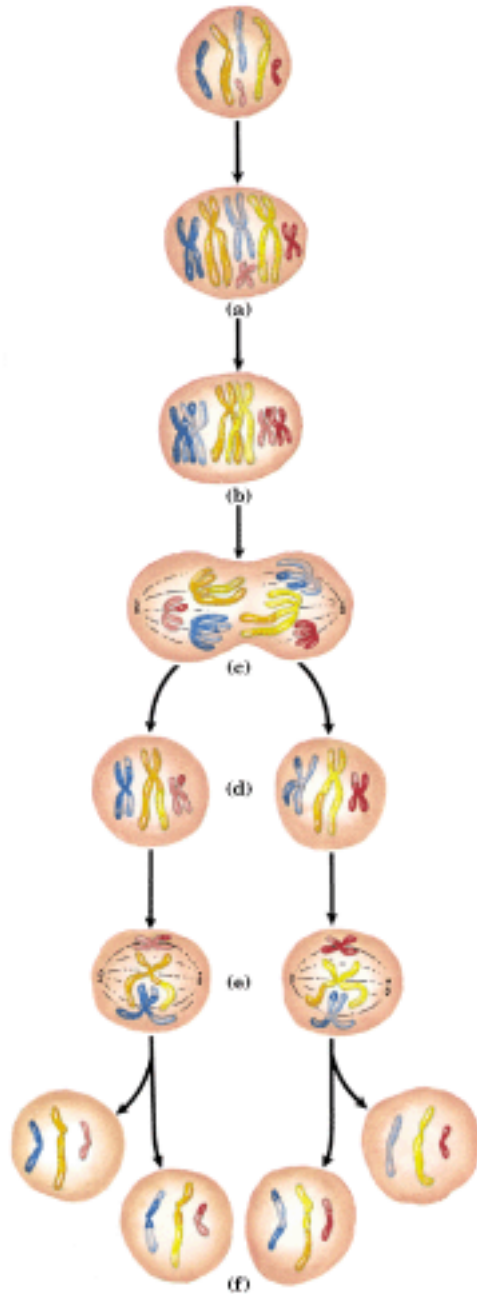
Ricombinazione sito-specifica: in questo caso gli scambi si verificano solo in corrispondenza di una determinata sequenza.

Trasposizione del DNA: riguarda solitamente un breve segmento di DNA con una notevole capacità di spostarsi da una posizione di un cromosoma ad un'altra.

Ricombinazione genetica omologa

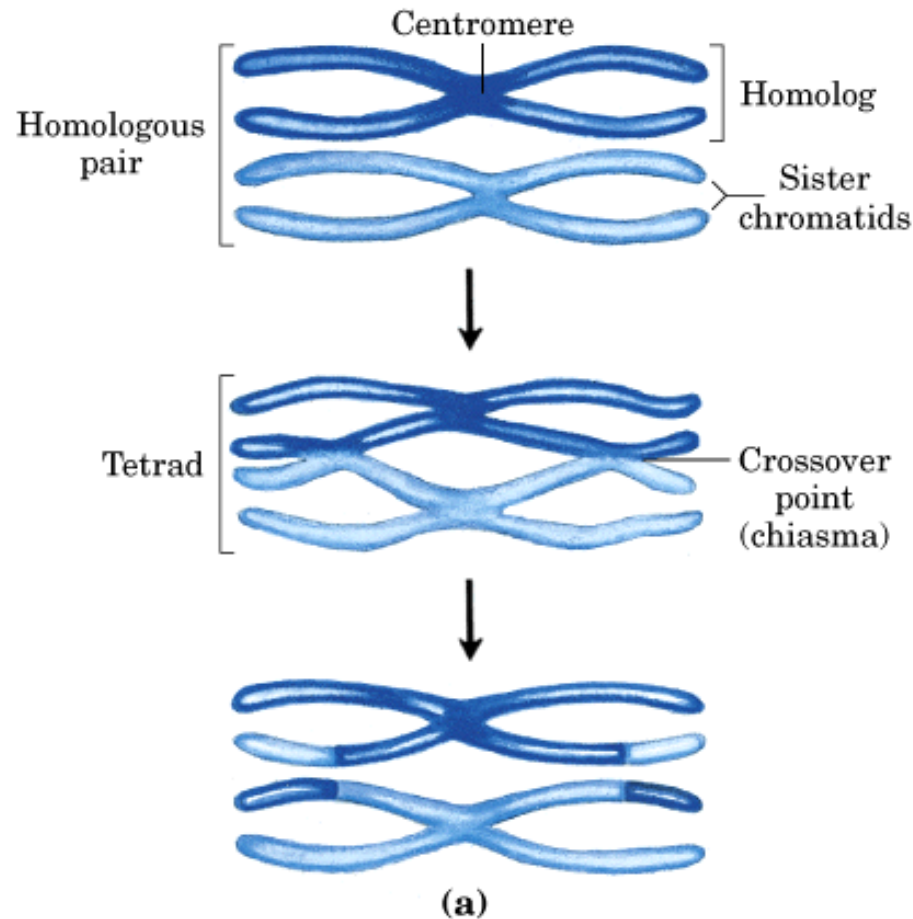
- Nei *batteri* è principalmente un processo di riparazione del DNA. In quel contesto viene definita come **riparazione ricombinativa del DNA**. E' comunemente diretta alla ricostruzione della forcella replicativa quando questa si blocca nei pressi di un danneggiamento del DNA.
- Negli *eucarioti*, invece, la ricombinazione omologa è strettamente legata alla divisione cellulare (assicurando l'ordinata segregazione del DNA) ed al meccanismo di riparazione del DNA. Il fenomeno si verifica con maggiore frequenza durante la meiosi, processo durante il quale una cellula della linea germinale con due serie identiche di cromosomi (cellula diploide) dà origine a un insieme di gameti aploidi (spermatozoi o uova) aventi ciascuno un solo tipo di cromosoma per ogni coppia (cellule aploidi).

La meiosi nelle cellule germinali meiotiche



- I cromosomi di una cellula germinale diploide (6 cromosomi; 3 coppie di omologhi) vengono replicati, ad eccezione dei centromeri. Le molecole di DNA così prodotte, attaccate ai relativi centromeri, sono i **cromatidi**.
- In profase I le tre coppie di cromatidi omologhi si allineano e formano tetradi unite da legami covalenti in corrispondenza delle giunzioni degli omologhi (**chiasmi**). A questo livello avviene il crossing over.
- Le coppie di omologhi si separano dirigendosi verso i due poli opposti della cellula in fase di divisione.
- La **prima divisione meiotica** produce 2 cellule figlie, ciascuna con 3 coppie di cromatidi.
- Le coppie di omologhi si allineano al centro della cellula preparandosi alla separazione dei cromatidi (da questo punto in poi chiamati cromosomi).
- La **seconda divisione** meiotica produce 4 cellule figlie, ognuna delle quali ha 3 cromosomi, la metà dei cromosomi delle cellule germinali. I cromosomi sono stati ridistribuiti e ricombinati.

CROSSING OVER



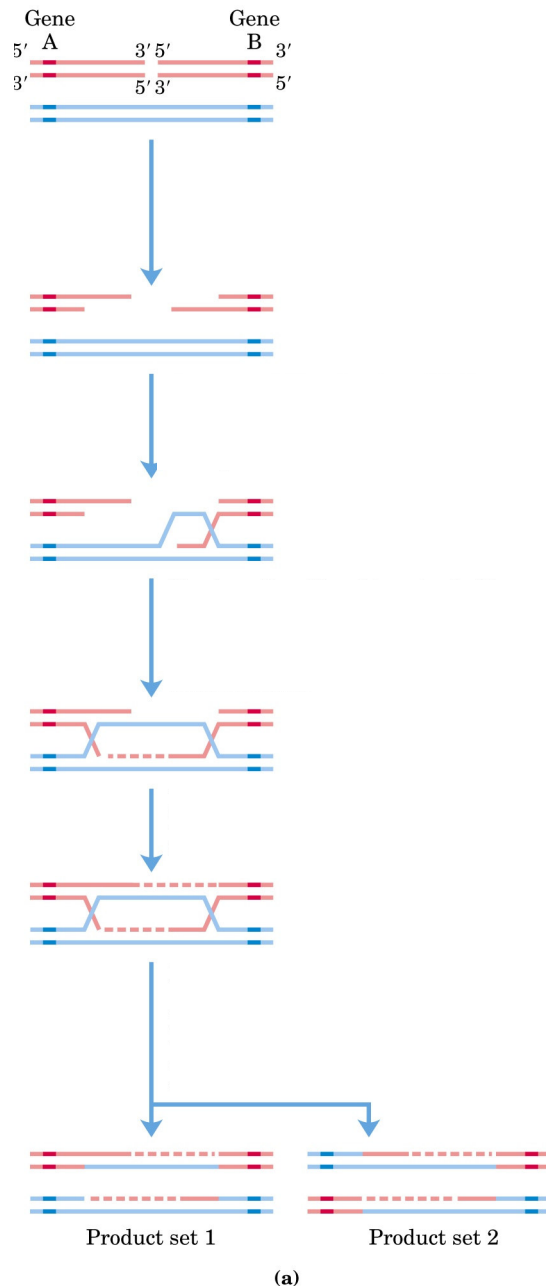
Il crossing over determina uno scambio di materiale genetico.

Esso unisce effettivamente i quattro cromatidi omologhi ed è essenziale per l'adeguata segregazione dei cromosomi nelle successive divisioni meiotiche.

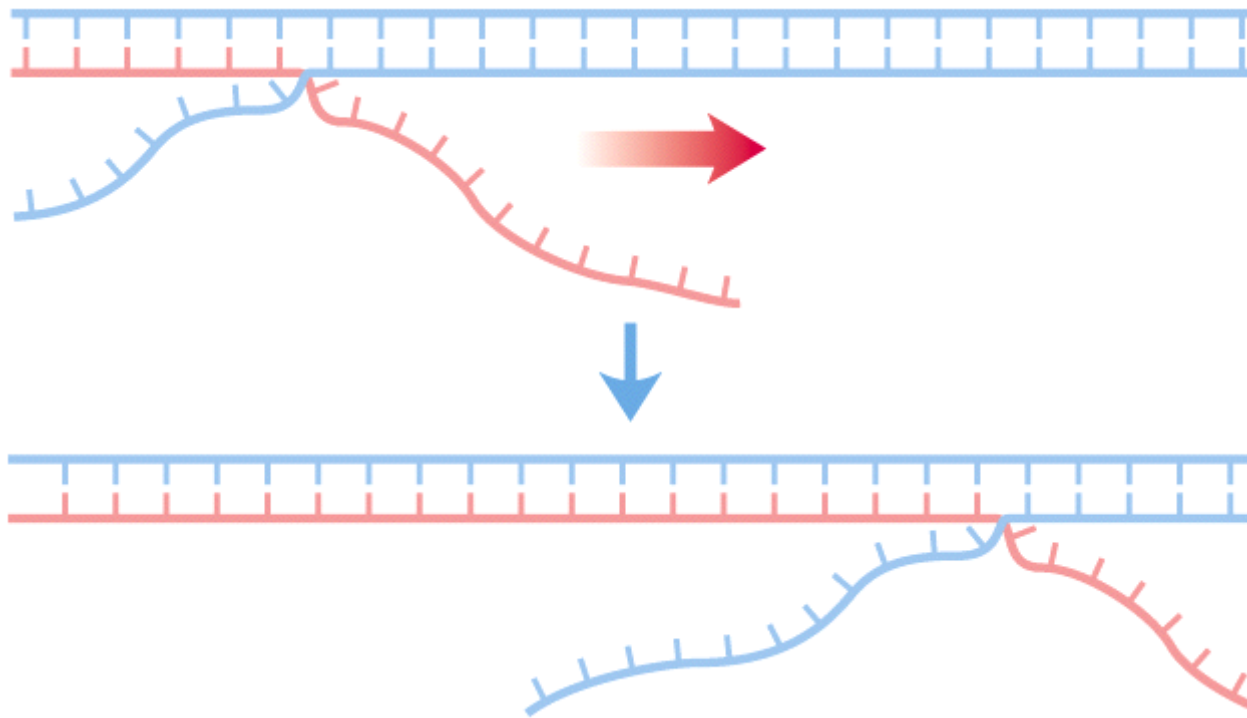
Non si tratta di un processo interamente casuale (infatti esistono degli "hot spot" disseminati lungo i cromosomi)

La frequenza di ricombinazione in una regione che separa due punti di un cromosoma è proporzionale alla distanza tra i due punti, permettendo la determinazione della posizione relativa e della distanza tra differenti geni.

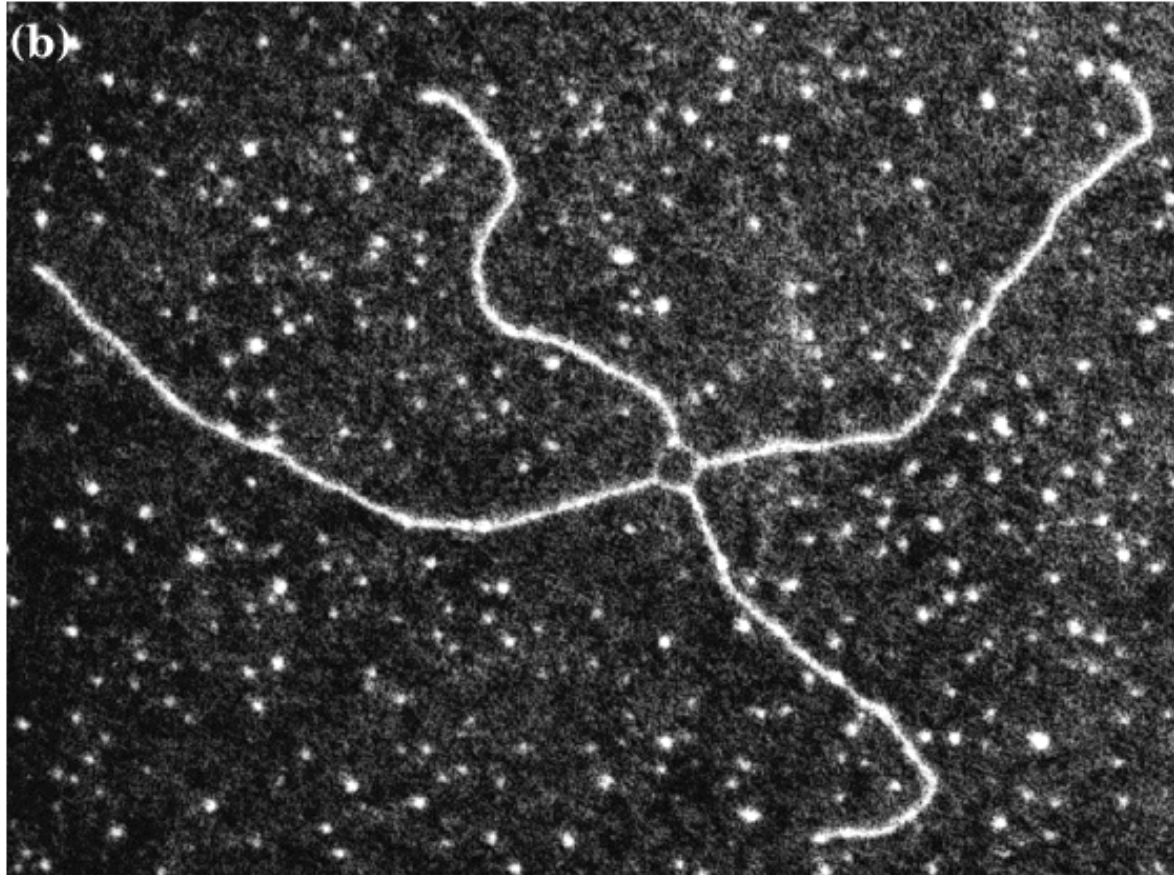
Ricombinazione durante la meiosi



- La rottura della doppia elica in uno dei due omologhi è convertita in un'interruzione (gap) della doppia elica per azione di una esonucleasi. Le catene con estremità 3' vengono degradate meno di quelle con estremità 5', producendo l'estensione della catena singola all'estremità 3'.
- L'estremità 3' libera si appaia con la sequenza complementare sull'omologo intatto. L'altra catena del duplex viene spostata.
- L'estremità 3' viene estesa per l'intervento della DNA polimerasi e della *migrazione della ramificazione*, generando una molecola di DNA con due incroci (**intermedi di Holliday**).
- In seguito, la replicazione del DNA sostituisce il segmento di DNA mancante dal punto in cui ha avuto origine la rottura della doppia elica.
- Il taglio degli intermedi di Holliday da parte di nucleasi specializzate genera uno dei due prodotti ricombinanti qui schematizzati. Nel prodotto 2 il DNA su entrambi i lati della regione sottoposta a riparazione è stato ricombinato.

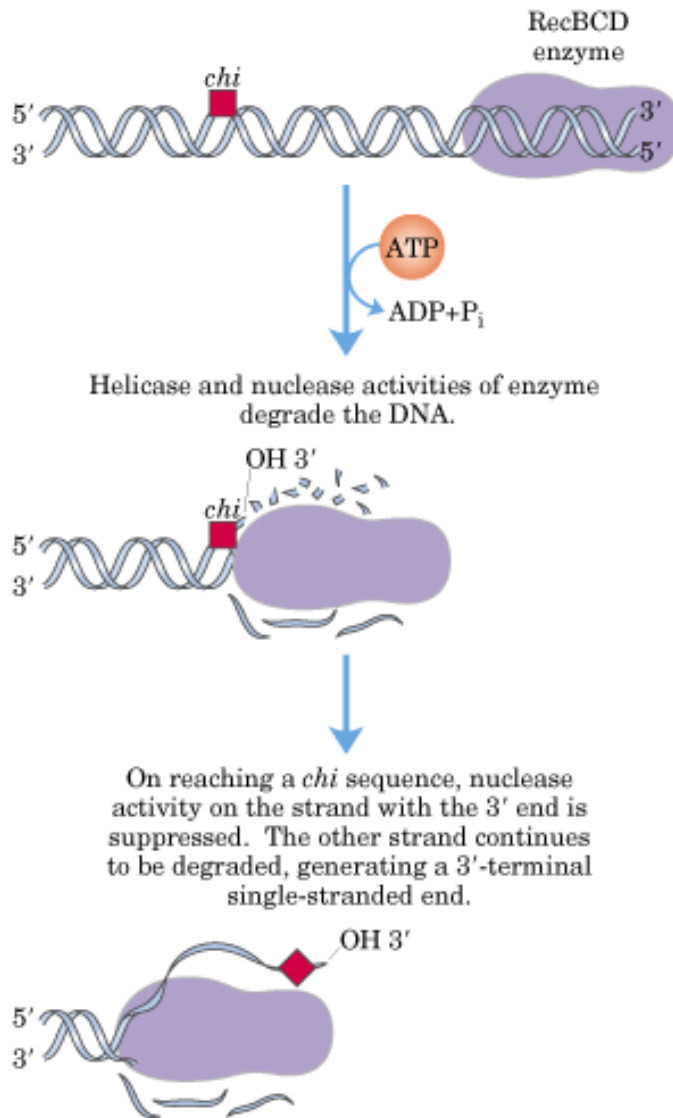


Migrazione della ramificazione: quando una catena stampo si appaia con due diverse catene complementari, nel punto in cui le tre catene complementari si incontrano si forma una ramificazione. La ramificazione migra nel momento in cui una coppia di basi di una delle due catene complementari viene staccata e sostituita da una coppia della seconda catena.



Intermedio di Holliday formato da due plasmidi batterici *in vivo*, osservato al microscopio elettronico.

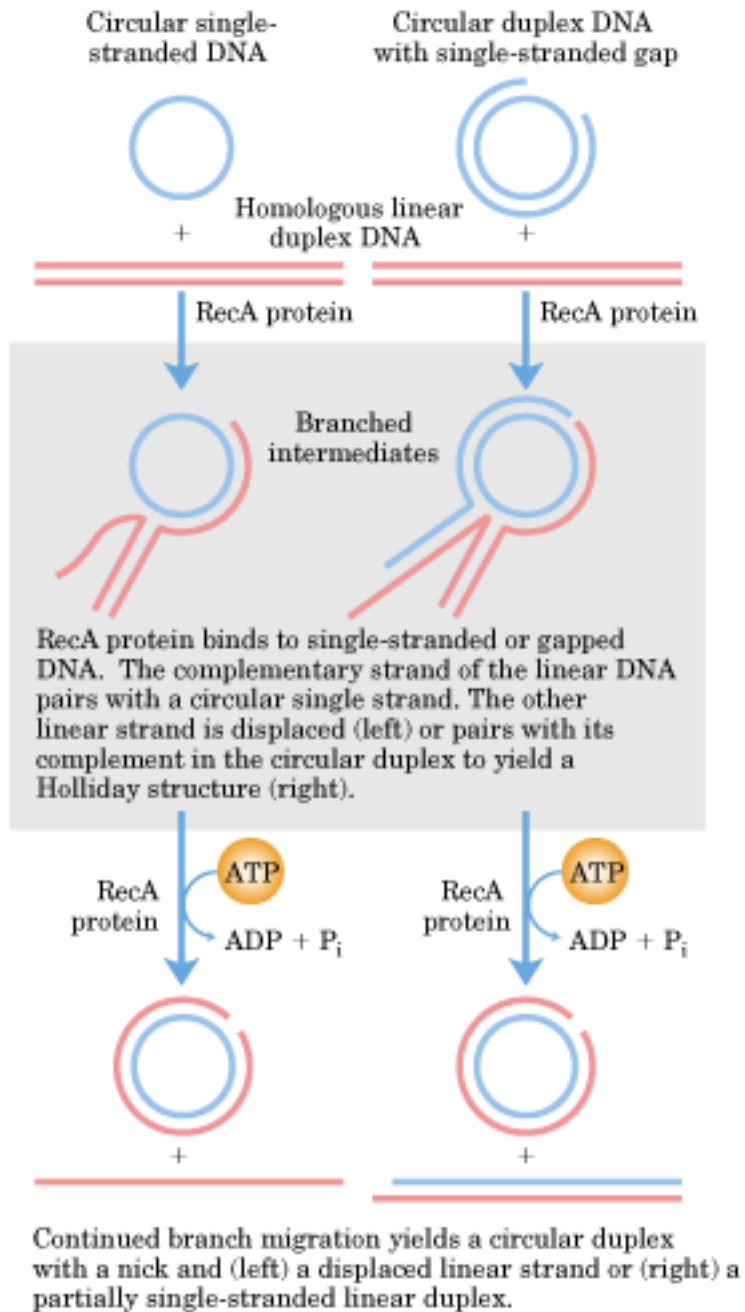
La ricombinazione richiede enzimi specifici



In *E. Coli* gli enzimi importanti per la ricombinazione sono codificati dai geni *recB*, *C* e *D*, che codificano per l'enzima RecBCD, il quale possiede sia attività elicastica che nucleasica.

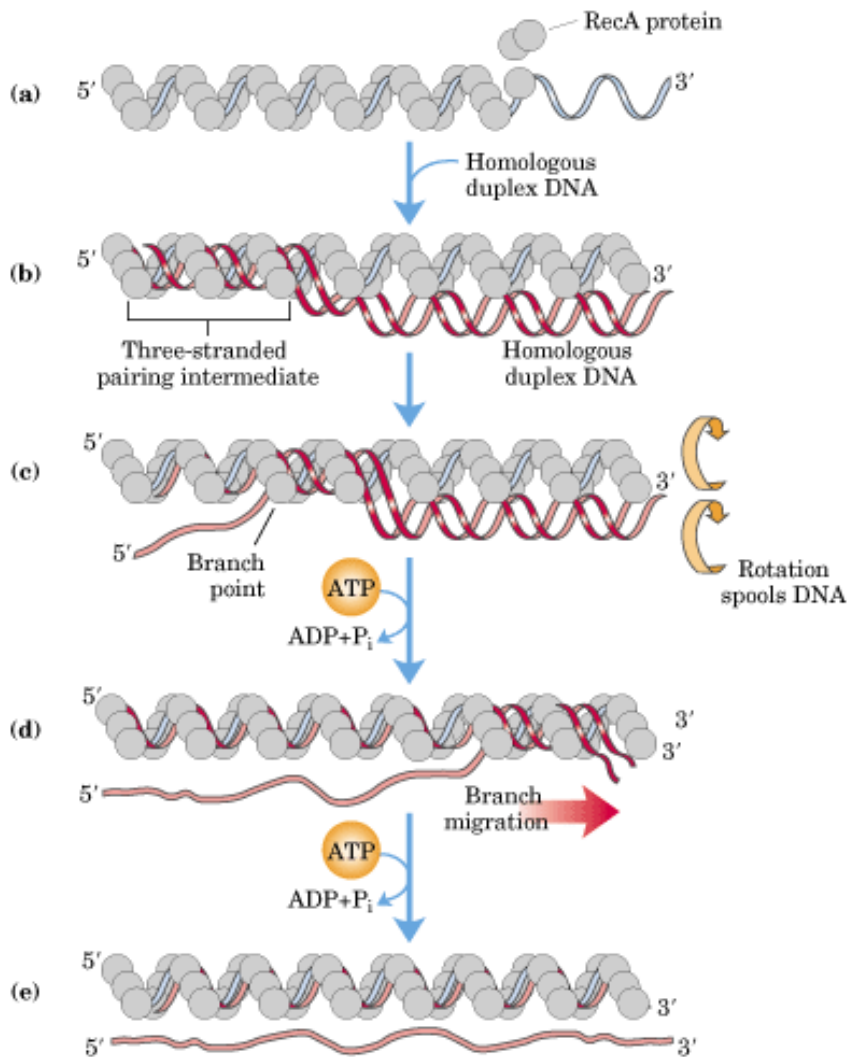
Questo enzima disavvolge e degrada il DNA a partire da un'estremità della doppia elica fino a che non incontra una sequenza *chi*.

L'interazione con *chi* altera l'attività di RecBCD tanto da generare un DNA a catena singola con un'estremità 3' libera, che viene utilizzata per le fasi successive della ricombinazione.



- Un altro enzima, la **proteina RecA**, dirige i passaggi centrali del processo di ricombinazione omologa: l'appaiamento dei due DNA omologhi, la formazione degli intermedi di Holliday e la migrazione della ramificazione.
- Lo scambio di catene implica la separazione di una catena di DNA a doppia elica dalla sua catena complementare ed il trasferimento della prima catena ad un'altra catena per formare un nuovo DNA duplex (eteroduplex).
- Il trasferimento è graduale e comporta la formazione di un intermedio ramificato.
- La conversione dell'intermedio nei prodotti finali coinvolge la migrazione della ramificazione mediata dalla proteina RecA.
- La reazione può interessare 3 catene (sinistra) oppure lo scambio può avvenire fra due duplex omologhi (quattro catene complessivamente) (destra). In quest'ultimo caso, l'intermedio ramificato è una struttura di Holliday.

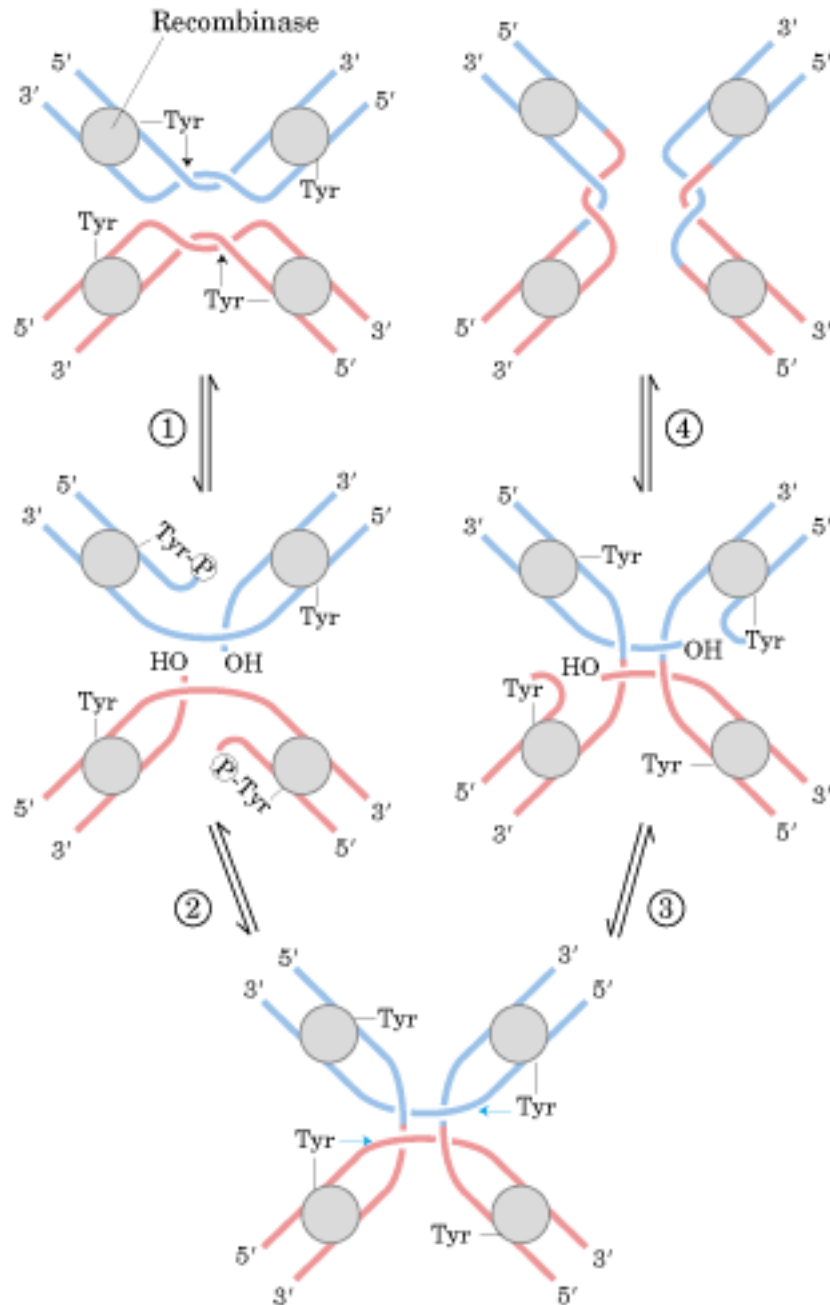
Modello per lo scambio di catene di DNA mediato dalla proteina RecA



- La proteina RecA forma un filamento attorno ad un DNA a catena singola.
- Un duplex omologo viene incorporato in questo complesso.
- La rotazione del DNA nella direzione indicata provoca un'azione di avvolgimento che sposta la regione a tripla elica da sinistra a destra. All'interno della tripla elica, una delle catene del duplex si appaia alla catena singola. L'altra catena del duplex viene spostata, e all'interno del filamento si forma un nuovo duplex.
- Proseguendo la rotazione, la catena viene completamente staccata.

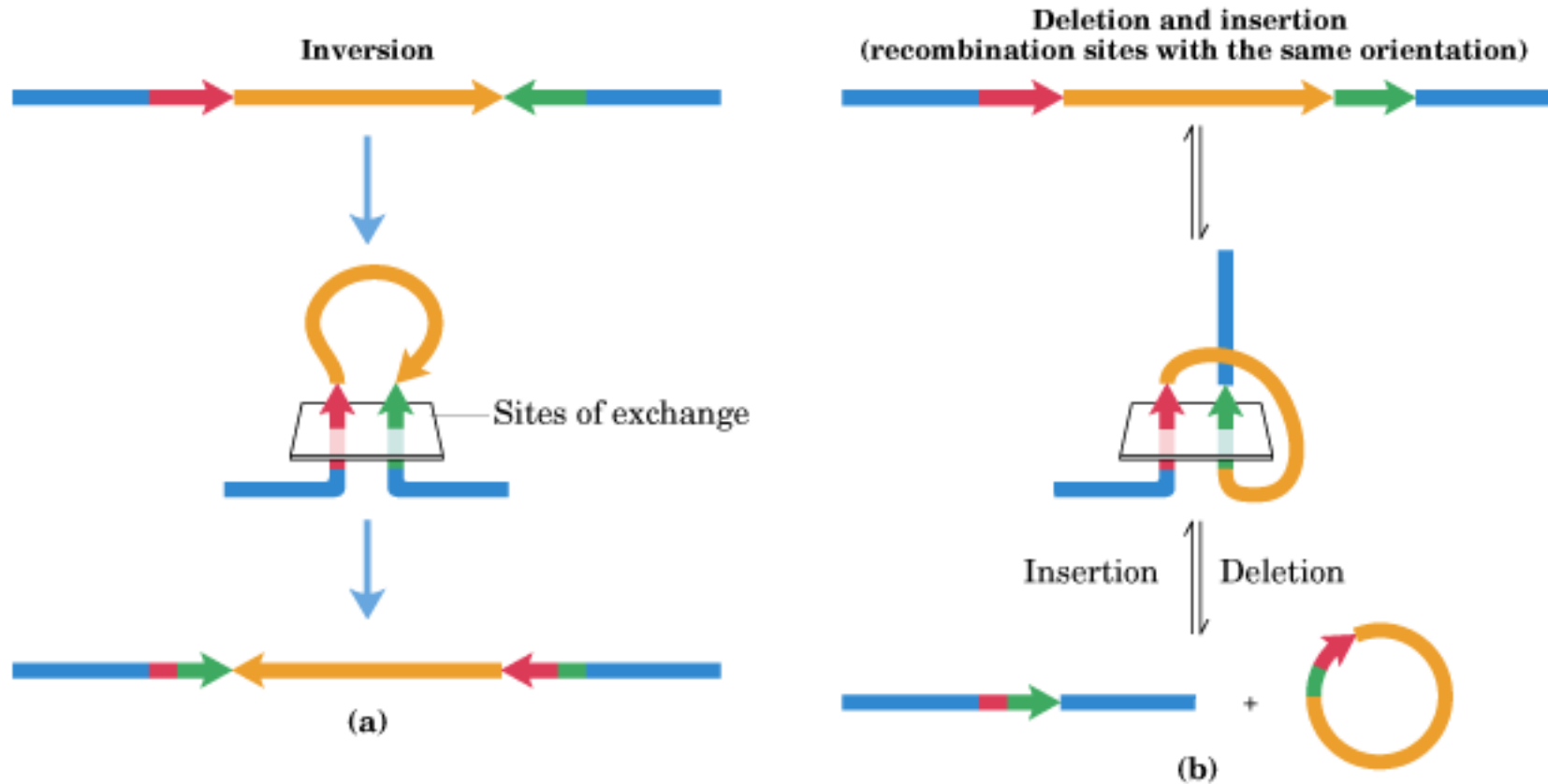
Ricombinazione genetica sito-specifica

- E' limitata a sequenze specifiche
- Le reazioni di questo tipo di ricombinazione avvengono in ogni cellula, ma le loro funzioni sono altamente specializzate e variano ampiamente fra una specie e l'altra.
- Tali funzioni comprendono la regolazione dell'espressione genica, la stimolazione di riarrangiamenti programmati del DNA che avvengono durante lo sviluppo e i riarrangiamenti del DNA legati al ciclo di replicazione di alcuni virus e plasmidi.
- Il sistema della ricombinazione sito-specifica è costituito da un enzima denominato ***ricombinasi*** e da una breve e peculiare sequenza di DNA (20-200 bp) su cui agisce la ricombinasi (***sito di ricombinazione***).



- **Fase 1:** La ricombinasi (formata da 4 subunità identiche) si lega ad una sequenza specifica detta sito di ricombinazione. Una catena di ciascun DNA viene tagliata in un punto particolare all'interno del sito di ricombinazione. Il gruppo OH di una tirosina presente nel sito attivo funziona da nucleofilo, producendo un legame covalente fosfotirosinico fra l'enzima ed il DNA.
- **Fase 2:** Le catene tagliate si uniscono ad un nuovo partner formando un intermedio di Holliday.
- **Fase 3 e 4:** La reazione si completa con un processo simile a quanto visto nelle prime due fasi. La sequenza originale del sito di ricombinazione viene rigenerata dopo che il DNA fiancheggiante il sito si è ricombinato.

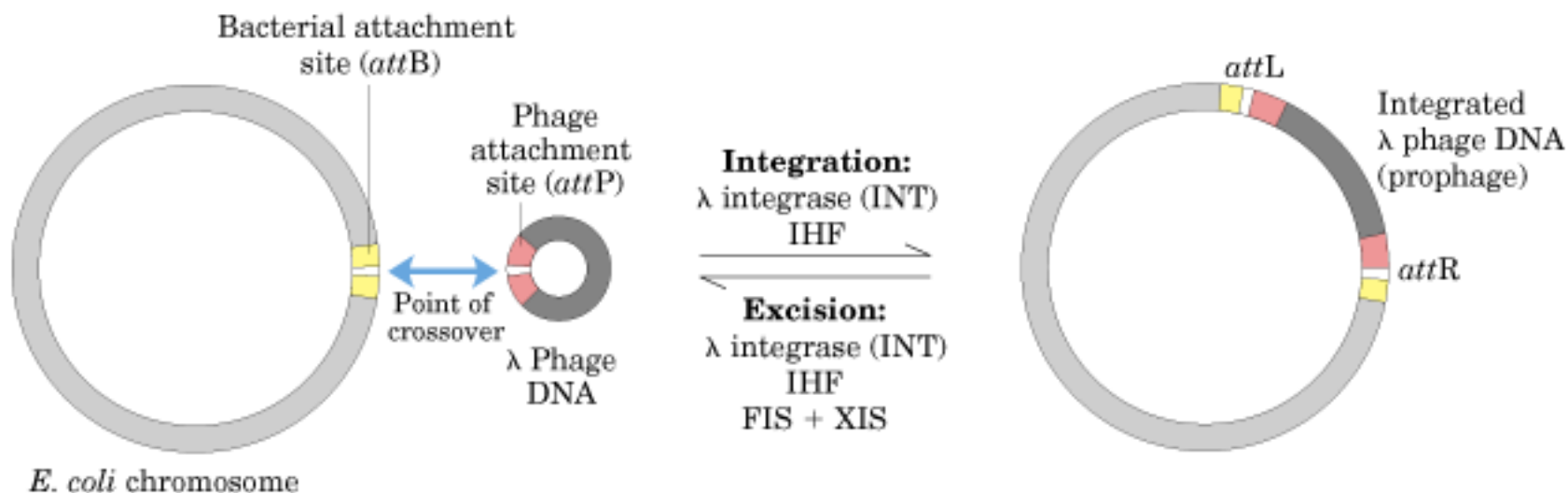
Effetti della ricombinazione sito-specifica



Se i siti di ricombinazione (rosso e verde) hanno un orientamento opposto sulla stessa molecola di DNA, ne risulta una **INVERSIONE**

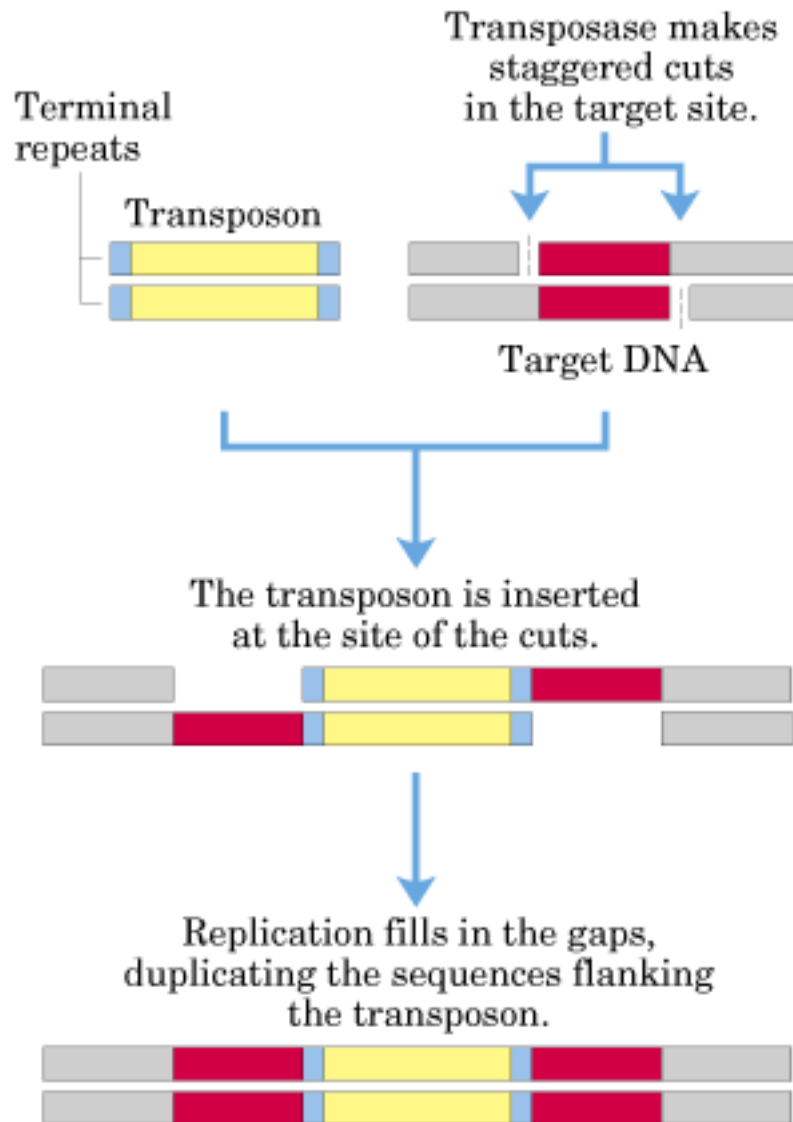
Se i siti di ricombinazione (rosso e verde) hanno lo stesso orientamento su una molecola di DNA, ne deriva una **DELEZIONE**; su due molecole di DNA ne deriva una **INSERZIONE**.

Integrazione e rimozione del DNA del batteriofago λ nel sito bersaglio del cromosoma



Il sito di attacco sul DNA del fago λ (*attP*) possiede solo 15 bp completamente omologhe al sito batterico (*attB*). La reazione genera due nuovi siti d'attacco (*attR* ed *attL*) che fiancheggiano il DNA fagico integrato. La ricombinasi è la λ **integrasi** (o **proteina INT**). Le proteine **FIS** (codificata dal batterio) e **XIS** (codificata dal fago), insieme alla proteina **IHF** (codificata dal batterio) procedono alla rimozione del DNA fagico.

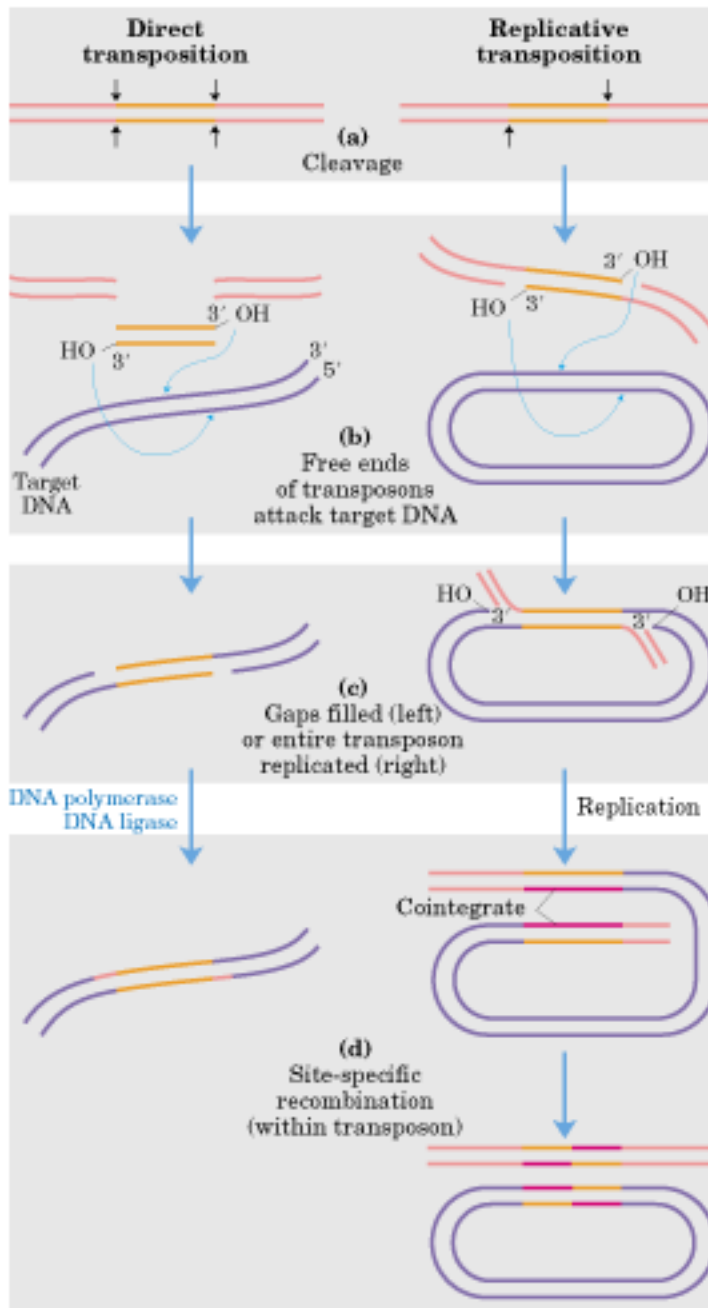
Trasposizione del DNA



I **trasposoni** (elementi trasponibili) sono segmenti di DNA che si spostano, o “saltano” da un punto di un cromosoma (*sito donatore*) ad un altro dello stesso o di un altro cromosoma (*sito bersaglio*). La nuova posizione viene scelta in maniera casuale.

Nei batteri esistono due classi di trasposoni. Le sequenze di inserzione (**trasposoni semplici**) contengono solo sequenze necessarie alla loro trasposizione e geni codificanti per le proteine che dirigono il processo (**trasposasi**).

I **trasposoni complessi** contengono uno o più geni sovrannumerari, alcuni dei quali possono conferire resistenza agli antibiotici, aumentando le possibilità di sopravvivenza nella cellula ospite.



***Vie di trasposizione nei batteri:
trasposizione diretta (semplice) e
trasposizione replicativa***

- a) Il DNA viene tagliato ai due lati del trasposone
- b) I gruppi 3'-OH liberati all'estremità del trasposone agiscono con un attacco diretto sui legami fosfodiesterici nel DNA bersaglio
- c) Il trasposone è ora legato al DNA bersaglio. Nella trasposizione diretta durante la replicazione vengono riempite le interruzioni a ciascuna estremità. Nella trasposizione replicativa viene replicato l'intero trasposone, creando un intermedio cointegrato.
- d) In seguito, il cointegrato viene spesso tagliato con l'aiuto di un sistema separato di ricombinazione sito-specifica. Il DNA ospite tagliato viene alternativamente riparato o degradato.

Ricombinazione dei segmenti genici V e J della catena κ della IgG umana

V(D)J Joining

