

La ricombinazione omologa

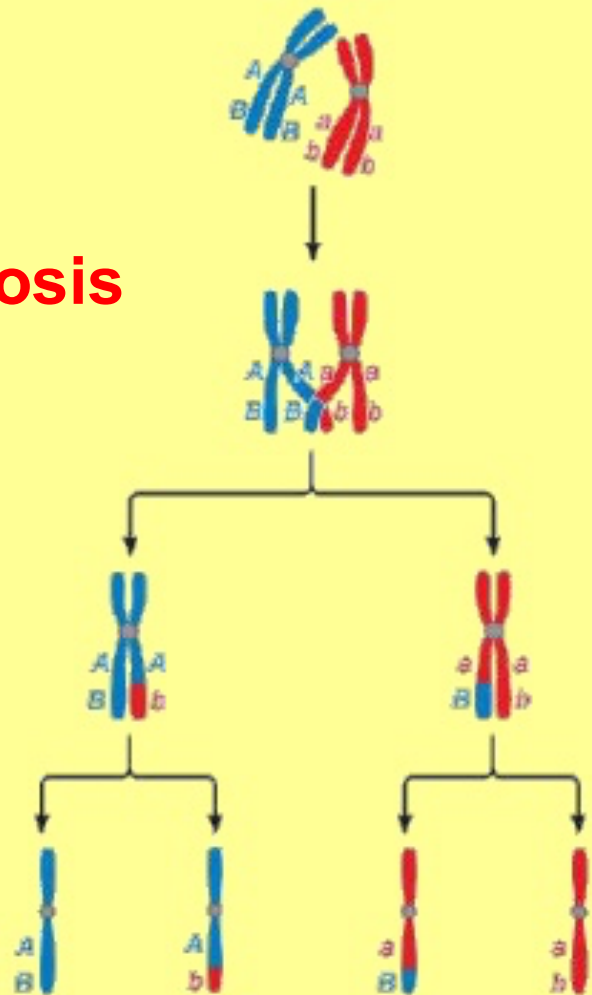
a livello molecolare

- ***Exchange of nucleotide sequences between two similar or identical DNA molecules***

When does homologous recombination occur??

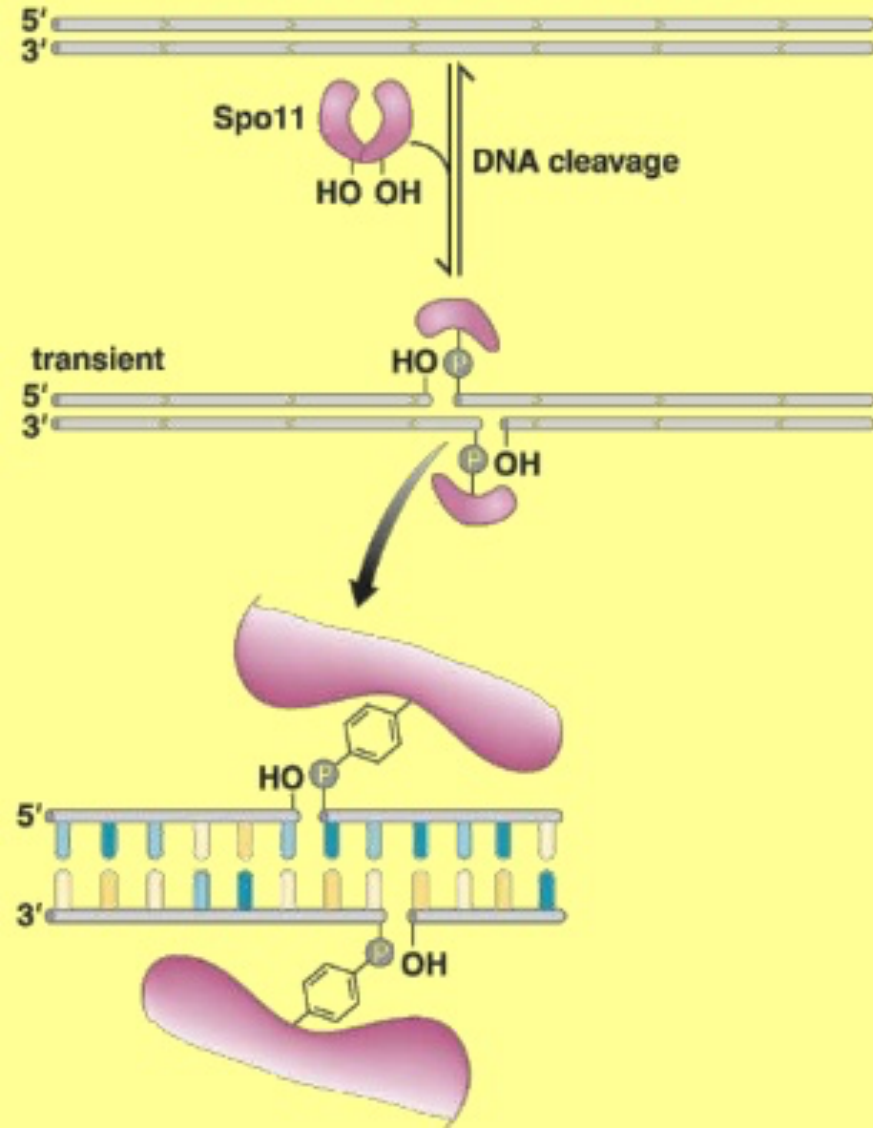
Homologous Recombination in Eukaryotes

Meiosis



DNA dynamics during meiosis

Programmed generation of double-stranded DNA breaks occurs during meiosis

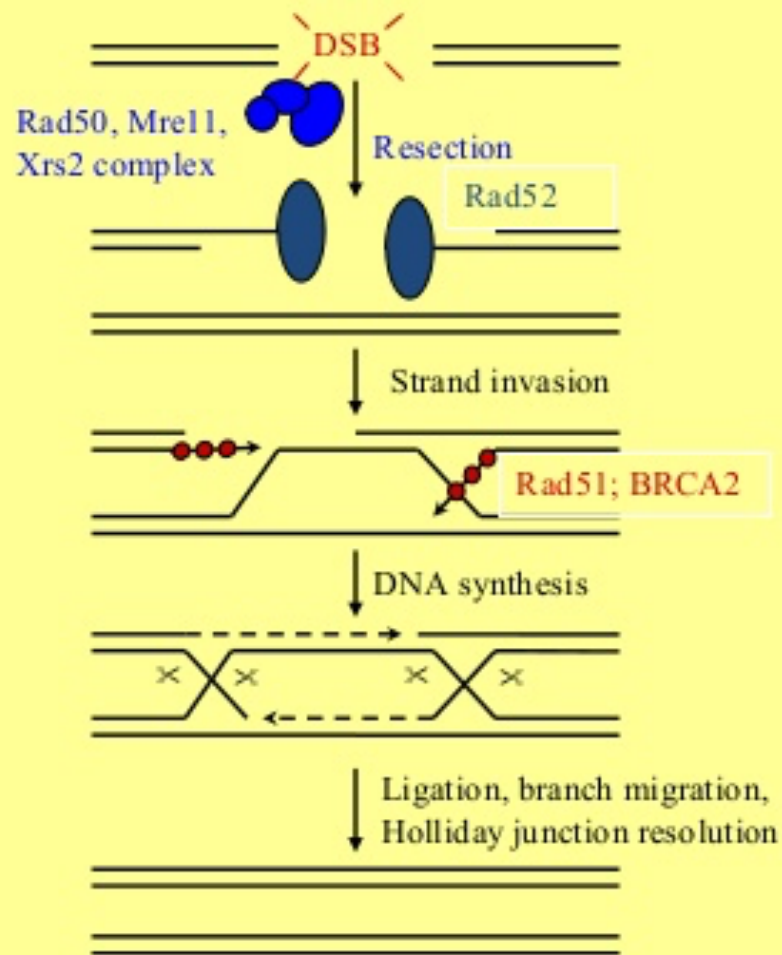


Mechanism of cleavage by Spo11

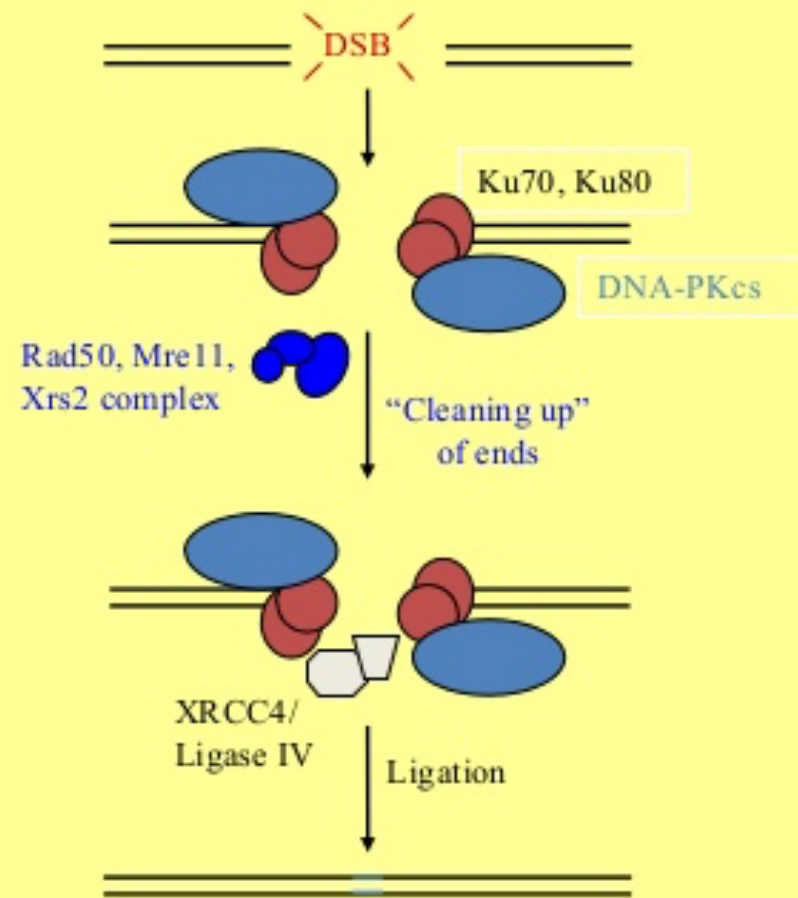
When does homologous recombination occur??

DNA DAMAGE REPAIR

Homologous recombination



Non-homologous end-joining



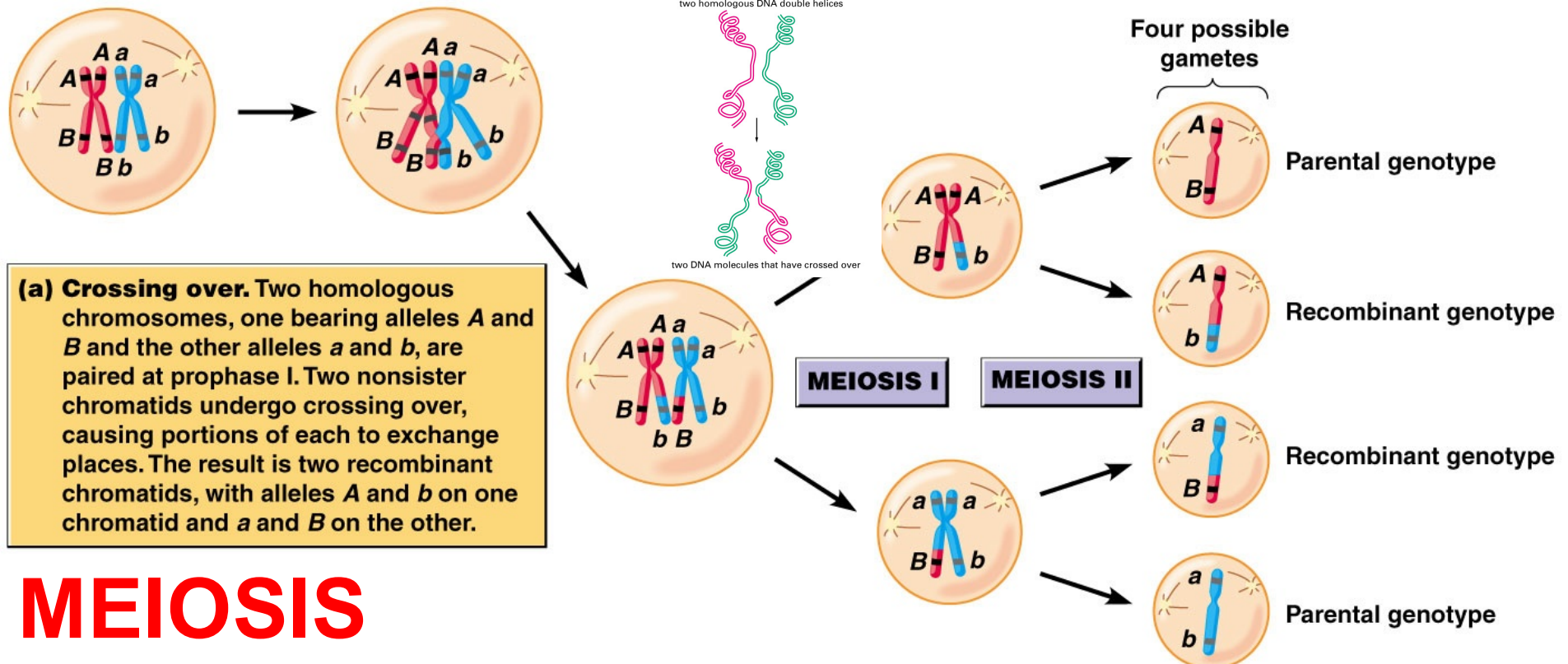
Recombination repair DNA breaks

Recombination - Ricombinazione

Tutto il DNA è ricombinante

Ricombinazione omologa (=sequenze (quasi) identiche):

- **DNA DAMAGE (DNA break due to damage)**
- **Durante la MEIOSI nelle cellule germinale (Controlled DNA break)**



(a) Crossing over. Two homologous chromosomes, one bearing alleles *A* and *B* and the other alleles *a* and *b*, are paired at prophase I. Two nonsister chromatids undergo crossing over, causing portions of each to exchange places. The result is two recombinant chromatids, with alleles *A* and *b* on one chromatid and *a* and *B* on the other.

MEIOSIS

Allele *a* and *A* encode the same Gene/genetic element, but have slightly different sequence (=genetic variation; SNPs, microsatellites, transposable elements, etc...)

(b) Results of crossing over. Each chromatid ends up in a separate gamete, two of which have the parental genotypes (*AB* and *ab*) and two the recombinant genotypes (*Ab* and *aB*).

Recombination - Ricombinazione

Ricombinazione è un processo fondamentale e catalizzato da enzimi sintetizzati e regolati proprio per questo scopo.

**REQUIREMENT: min. 2 homologous gene copies
(human: paternal and maternal genome)**

-**Variabilità genetica** (Meiosi)

-Ricuperare sequenze perse in seguito a **danni al DNA** - Rimpiazzando la regione danneggiata con un filamento integro ottenuto dal cromosoma omologo

-Fa partire le forche replicative bloccate o danneggiate (reinizio della replicazione)

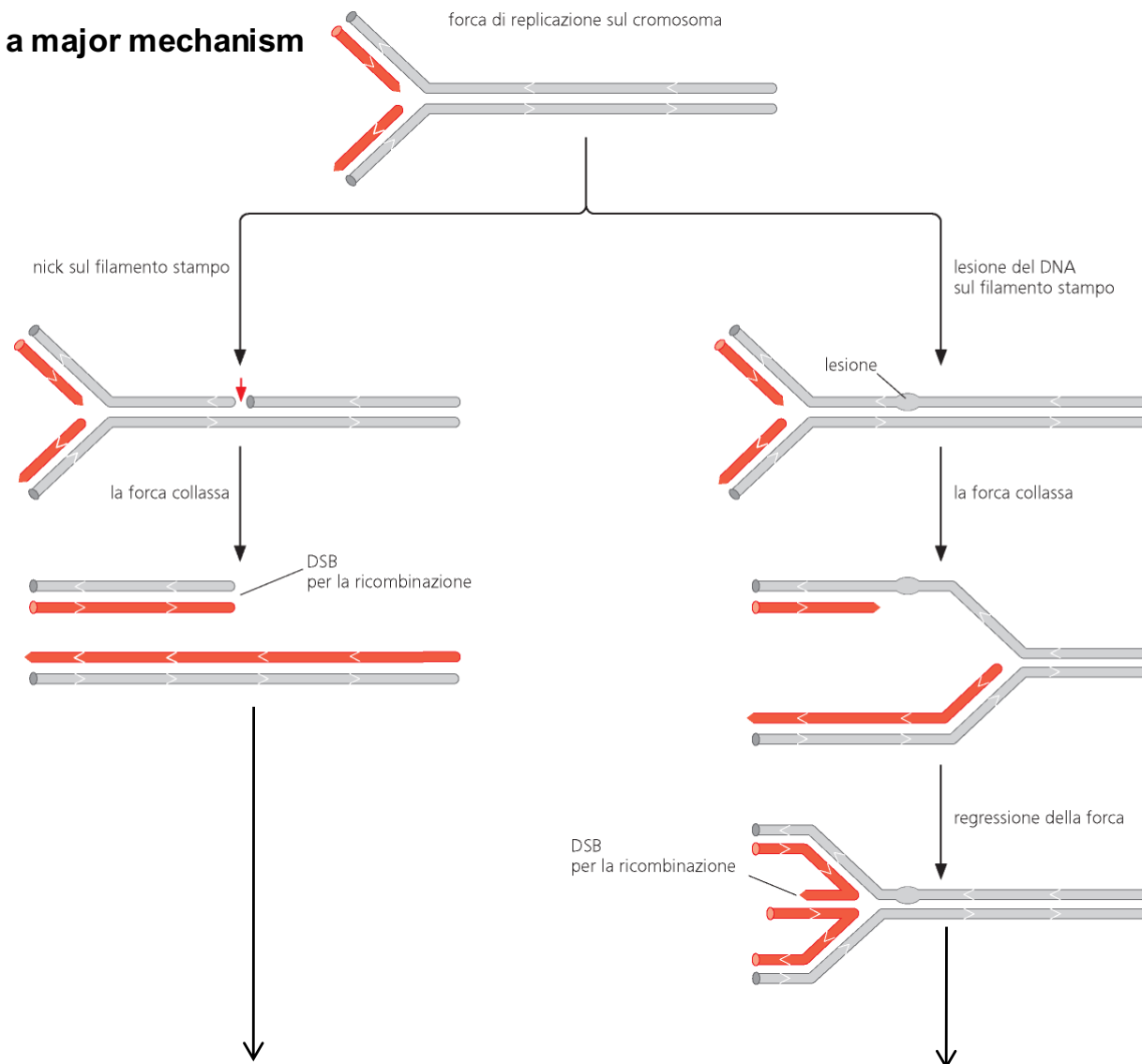
-Regolano espressione di alcuni geni

→ Utile per tecniche come GENE Knock-out

STEP 1: ROTTURE NEL DNA DANNO INIZIO ALLA RICOMBINAZIONE

DNA break → cell cycle arrest - - → cell death/sensecence

Homologous recombination is a major mechanism of DNA repair.



INITIATION OF DNA RECOMBINATION

STEP 2. RICOMBINAZIONE – PASSI CHIAVI

1. DNA Damage (break)
2. Allineamento di due molecole di DNA omologhe)

1. Meiosi: Allineamento di due molecole di DNA omologhe (alleli)
2. Meiosi: Introduzione di **rotture nel DNA**

3. Invasione del filamento (!!!3!!!)
(single stranded DNA invades in dsDNA of other DNA molecule; formation of heteroduplex/eteroduplex)

4. Formazione delle giunzioni Holliday
(Holliday junctions)

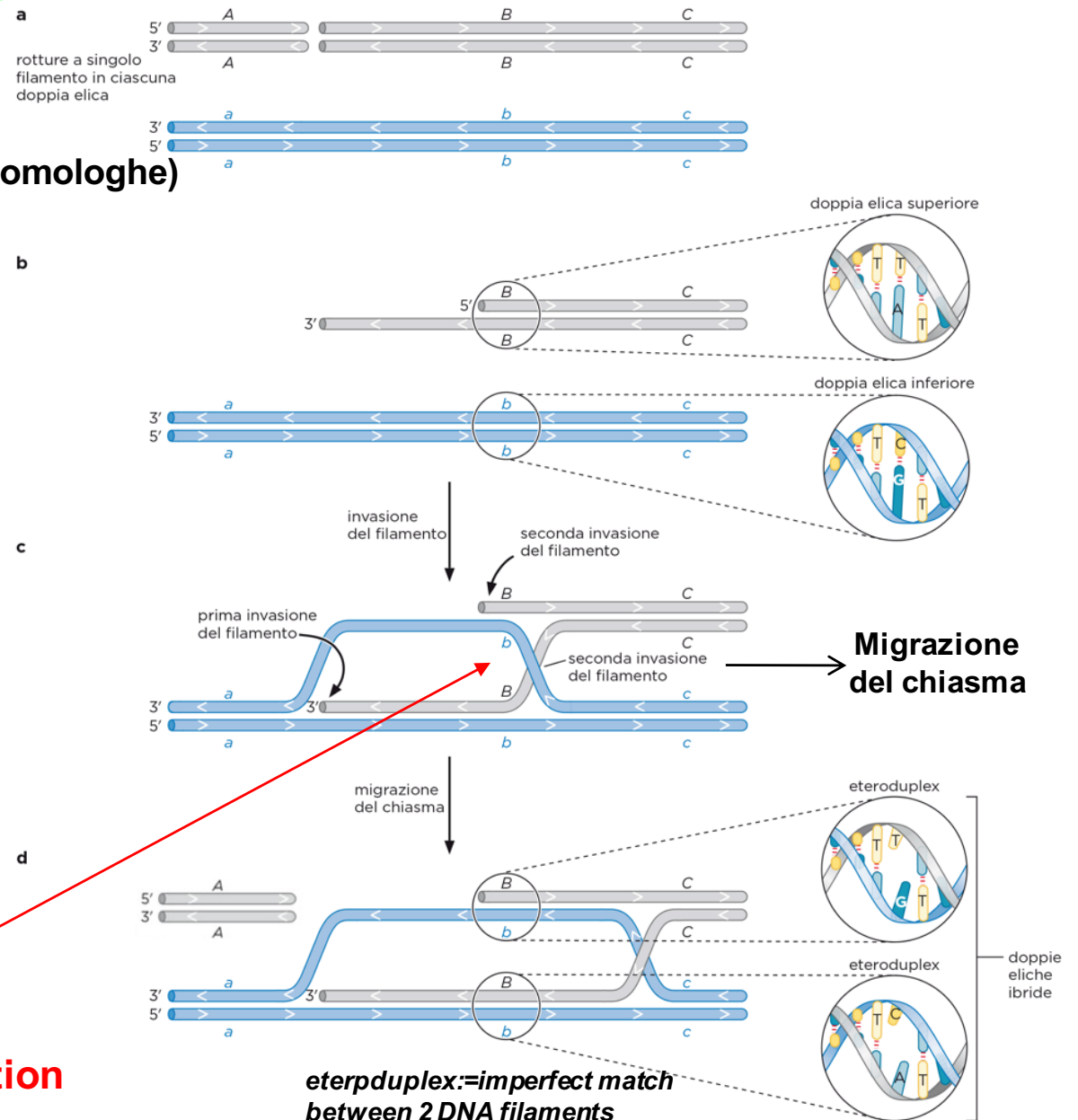
DNA strands cross over, cross over migrates and exchanges DNA of both filaments

= chiasma migration/migrazione del chiasma

5. Risoluzione della giunzione di Holliday

- Taglio dei due filamenti
- Convergenza/collasso

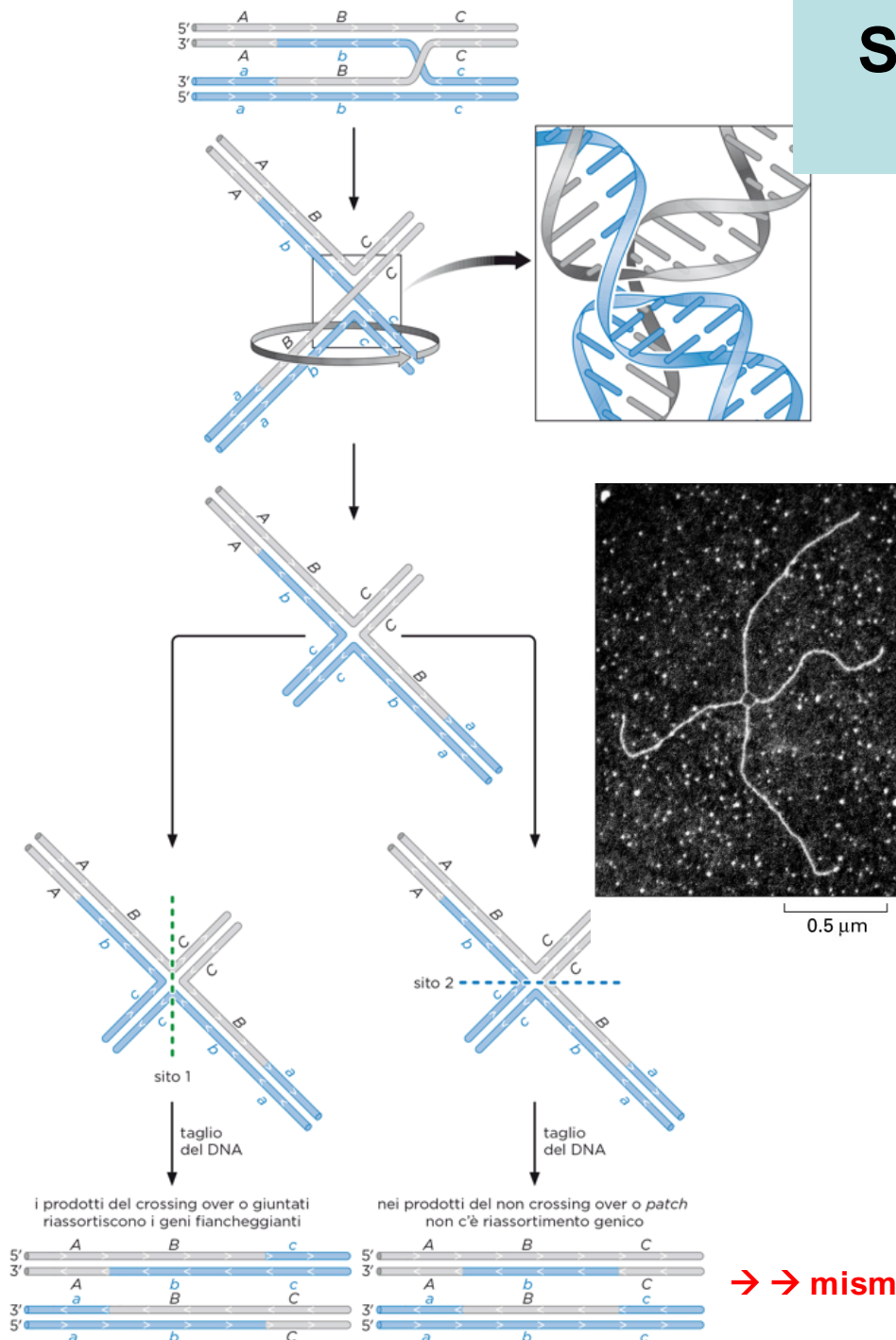
Holliday junction



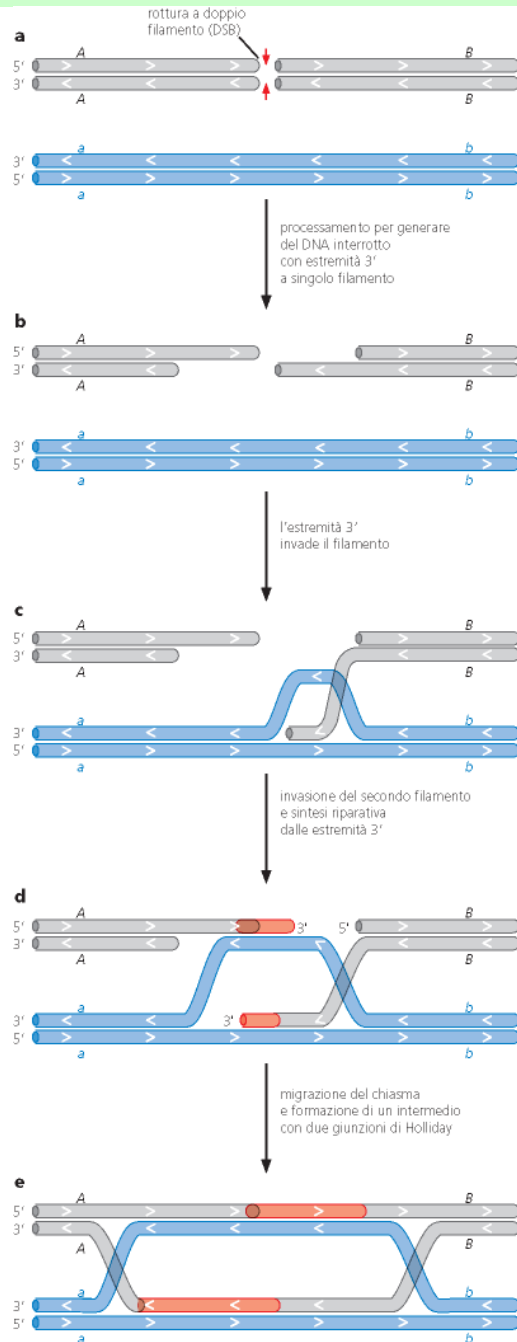
STEP 3. Taglio della giunzione di Holliday

Possono avvenire due tipi di tagli:

1. **Prodotto del crossing over.** Le due doppie eliche originali ora sono unite in modo che molecole di DNA parentale diverse sono ora riunite in una molecola ibrida
2. **Prodotti patch.** La ricombinazione non porta al riassortimento dei geni (**prodotti a toppa o prodotti del non incrocio**).



Modello Completo: ricombinazione omologa



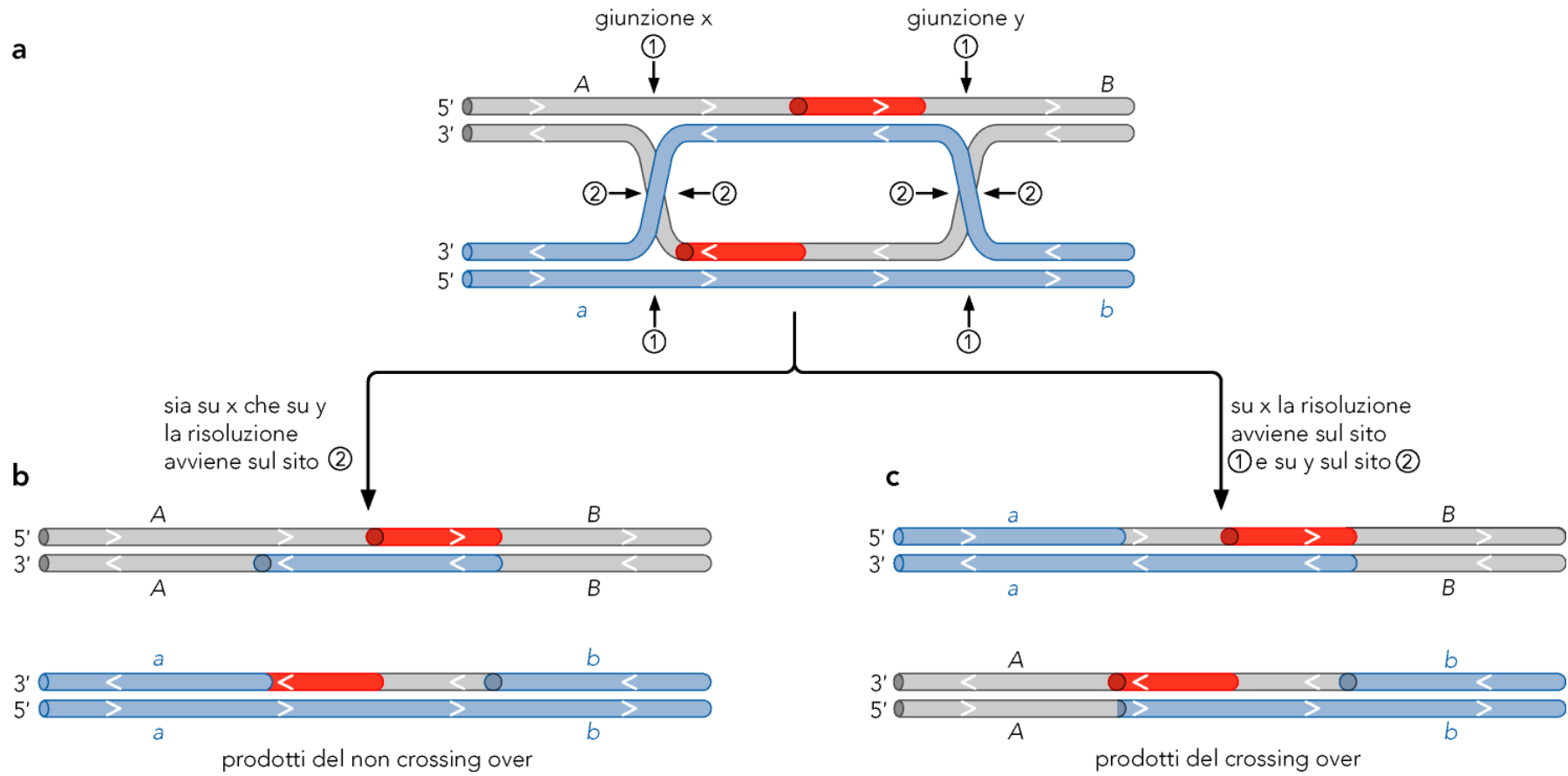
Lo scambio genetico solitamente inizia con un taglio del double strand (**double strand break**).

Il DNA ricevente si taglia. Esonucleasi agiscono e liberano un 3'. Questo invade il DNA omologo e si estende. Si forma un D-loop.

Il D loop si estende e si annila al DNA ricevente, e viene ricopiato.

Ci sono due regioni unite.

Il DNA del donatore ha sostituito quello dell' accettore.



Anche: patched

CONSEQUENCES OF HOMOLOGOUS RECOMBINATION !!! GENE CONVERSION !!!

Gene conversion:
Recombination converts one allelic version of a gene into the allelic version of the homologous sequence

IMPORTANTE PER DNA DAMAGE REPAIR:

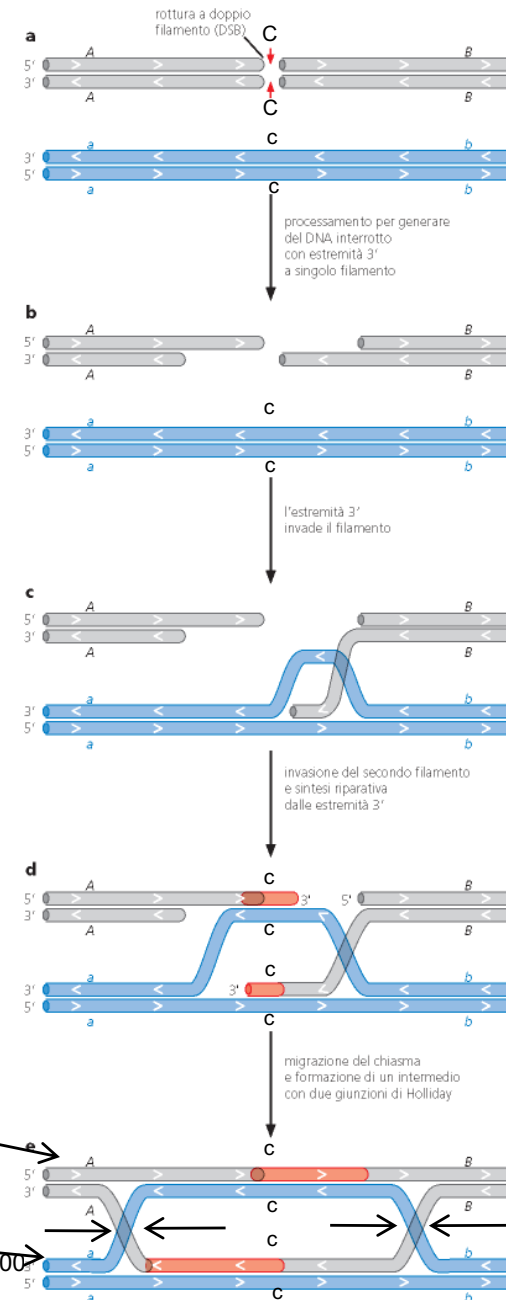
Gene conversion mediated by DNA synthesis:

- Damage produces gap
- Repair via homologous recombination
- formation of Holiday junction
- Strand without gap serves a template for the re-synthesis of the gap

NOTE: in case the blue strand contains a slightly different DNA sequence at the site that corresponds to the gap in the other dsDNA filament, the sequence (blue) will be copied into the gap of the damaged strand
→ Gene sequence of blue filament is changed = gene conversion

ACB →→ AcB

acb = acb



CONSEQUENCES OF HOMOLOGOUS RECOMBINATION !!! GENE CONVERSION !!!

IMPORTANTE PER MEIOSI:



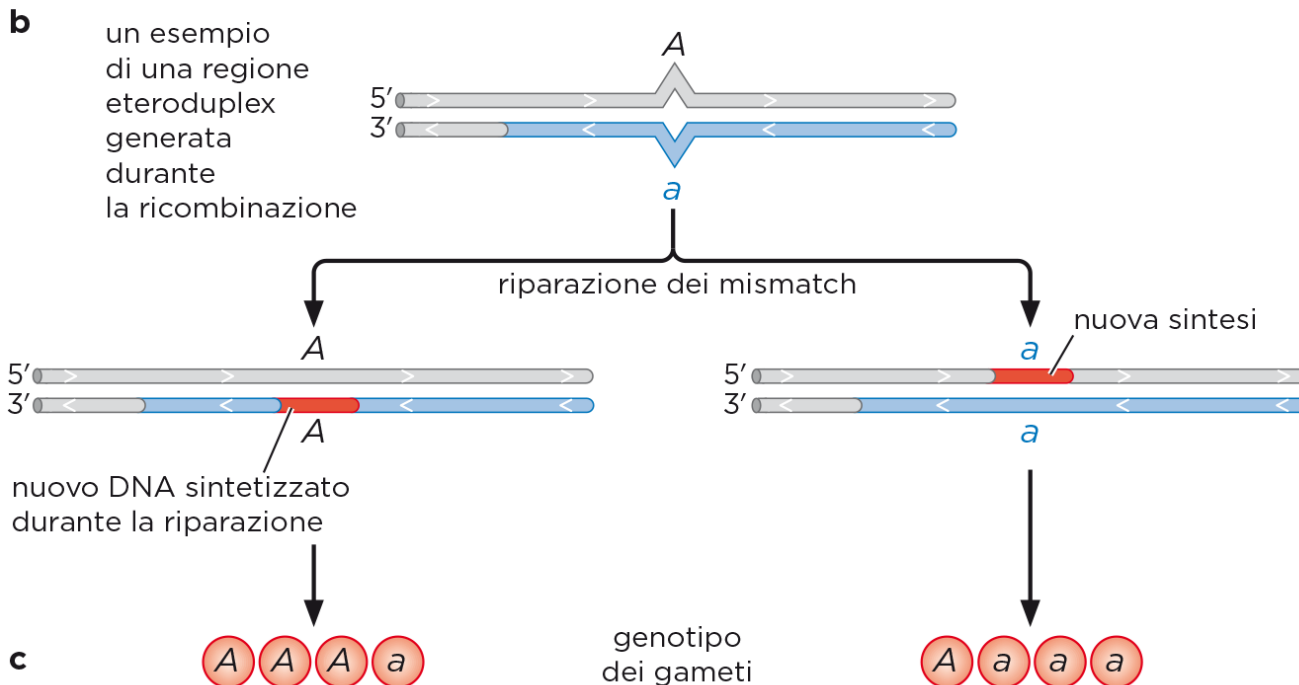
- Damage produces 3' overhang
- Start of homologous recombination
- formation of Holiday junction
- strand exchange during recombination
- Between 2 homolog sequences

-NOTE: sequences are not 100% identical

→ HETERODUPLEX FORMS DURING RECOMBINATION = MISMATCHES!!!

SOLUTION:

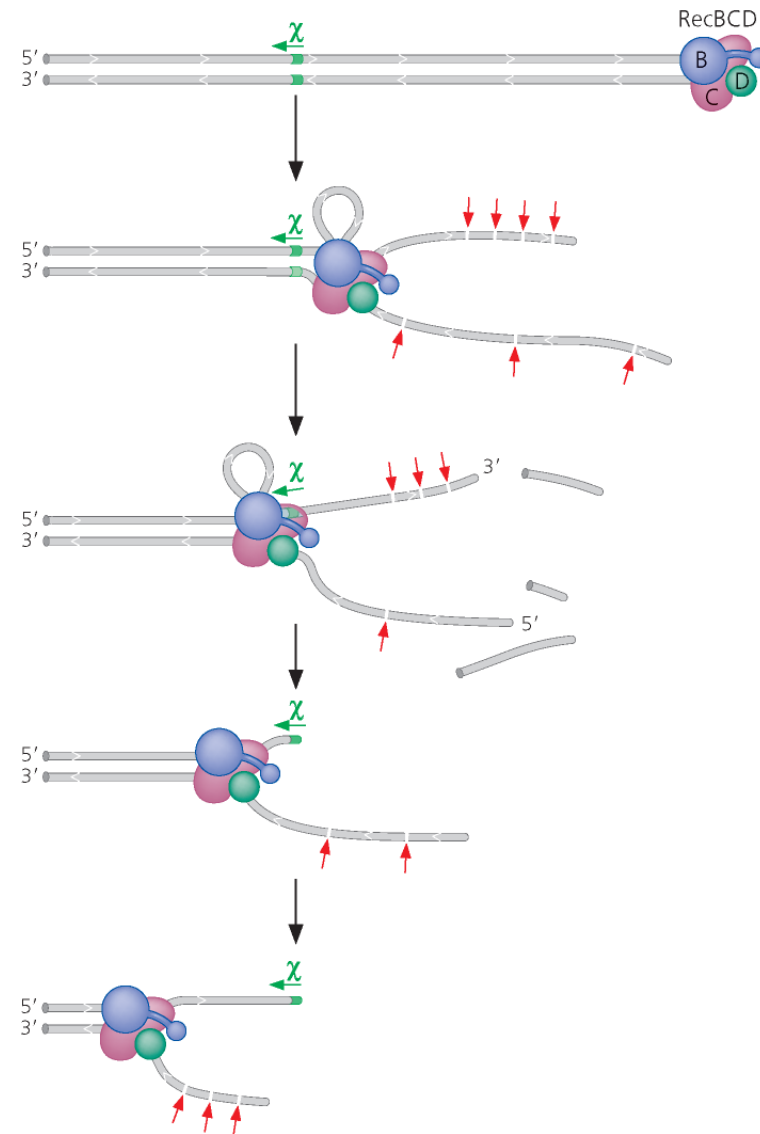
DNA MISMATCH REPAIR



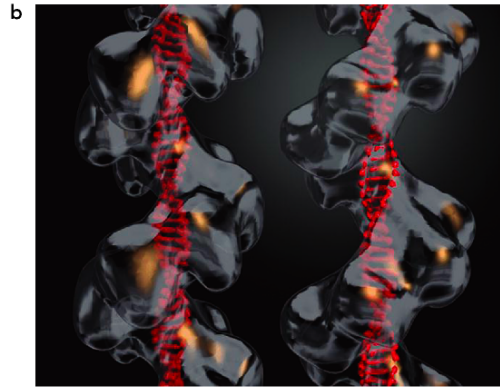
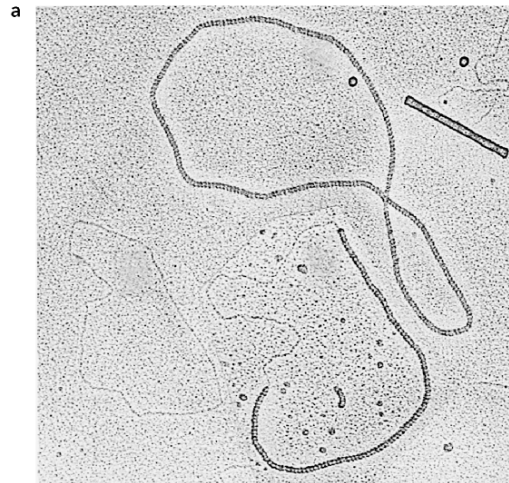
Classic problem in meiosis

Meccanismi molecolari della RO – E.coli

- In *E. coli* il sistema di riparazione dei double stand breaks (DSB) è il sistema **RecBCD**
- Il complesso si lega a DSB, ha attività elicastica e nucleasica e taglia entrambi i filamenti. Quando raggiunge un sito chi (**Cross-over Hotspot Instigator, CHI**) digerisce solo con polarità 5' -3' producendo una coda 3'
- Il DNA senza siti viene digerito completamente
- **RecA** si lega al 3' - la proteina che scambia filamento
- RecA copre il 3' in maniera cooperativa e catalizza l'appaiamento con il DNA omologo



RecA



Recombination is Started by RecA and ssDNA

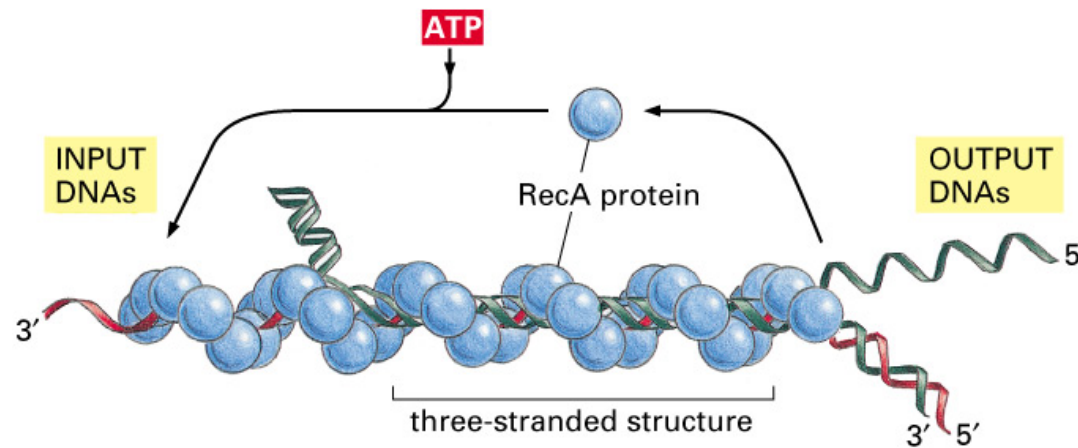
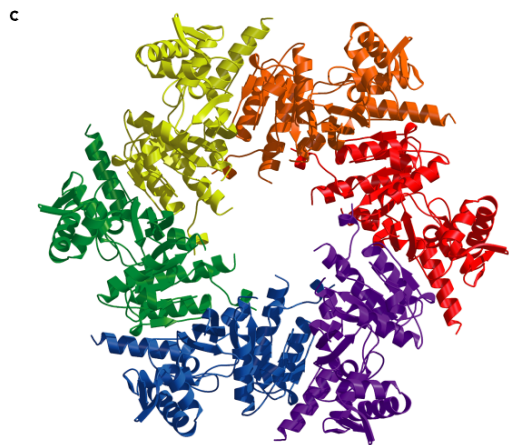


Figure 5-59. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

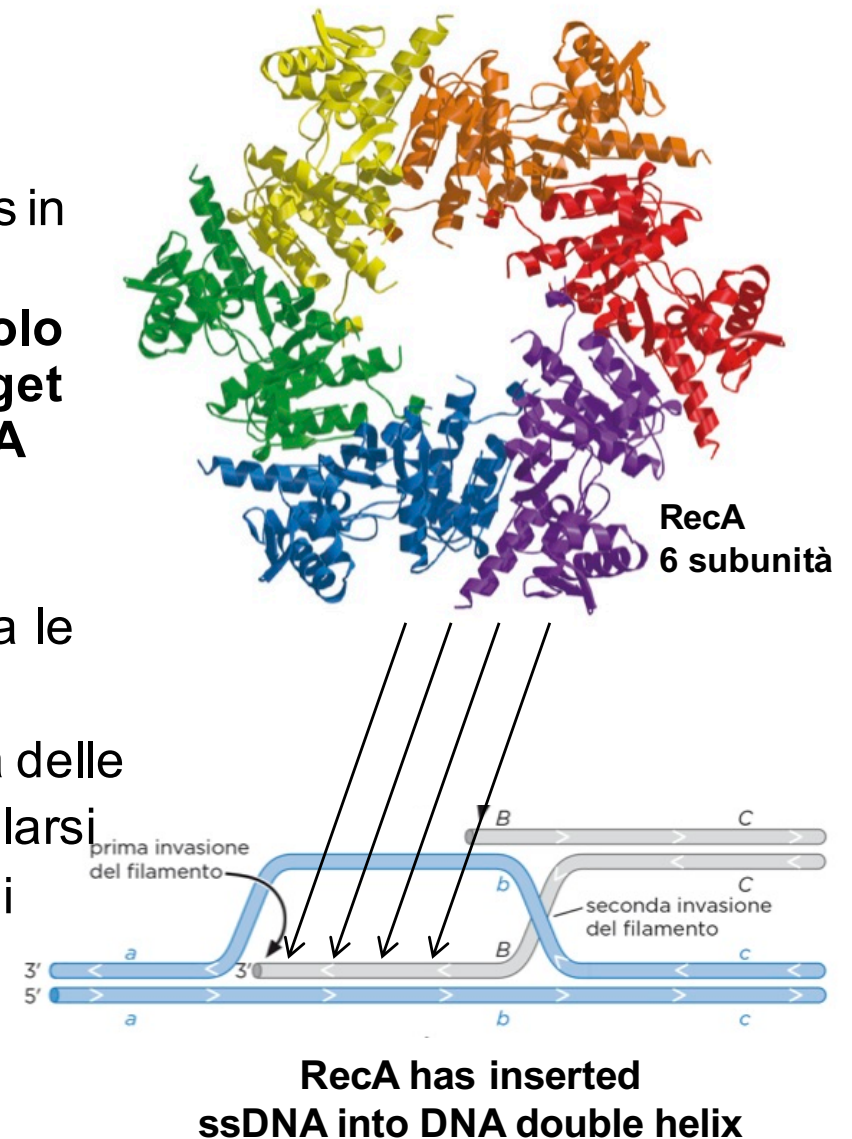
Filamenti RecA/RAD51: complessi di ca 100 subunita (ca 300 nucleotidi)

Filamenti RecA/RAD51 puo contenere uno, due, tre o quatro filementi di DNA (intermedi piu frequenti uno o tre filementi di DNA)

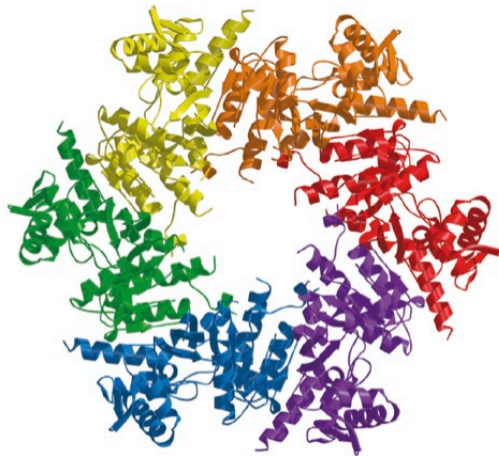
Al interno del filemento: scambio dei filementi di DNA omologi

RecA si assembla sul DNA a singolo filamento e promuove l'invasione del filamento

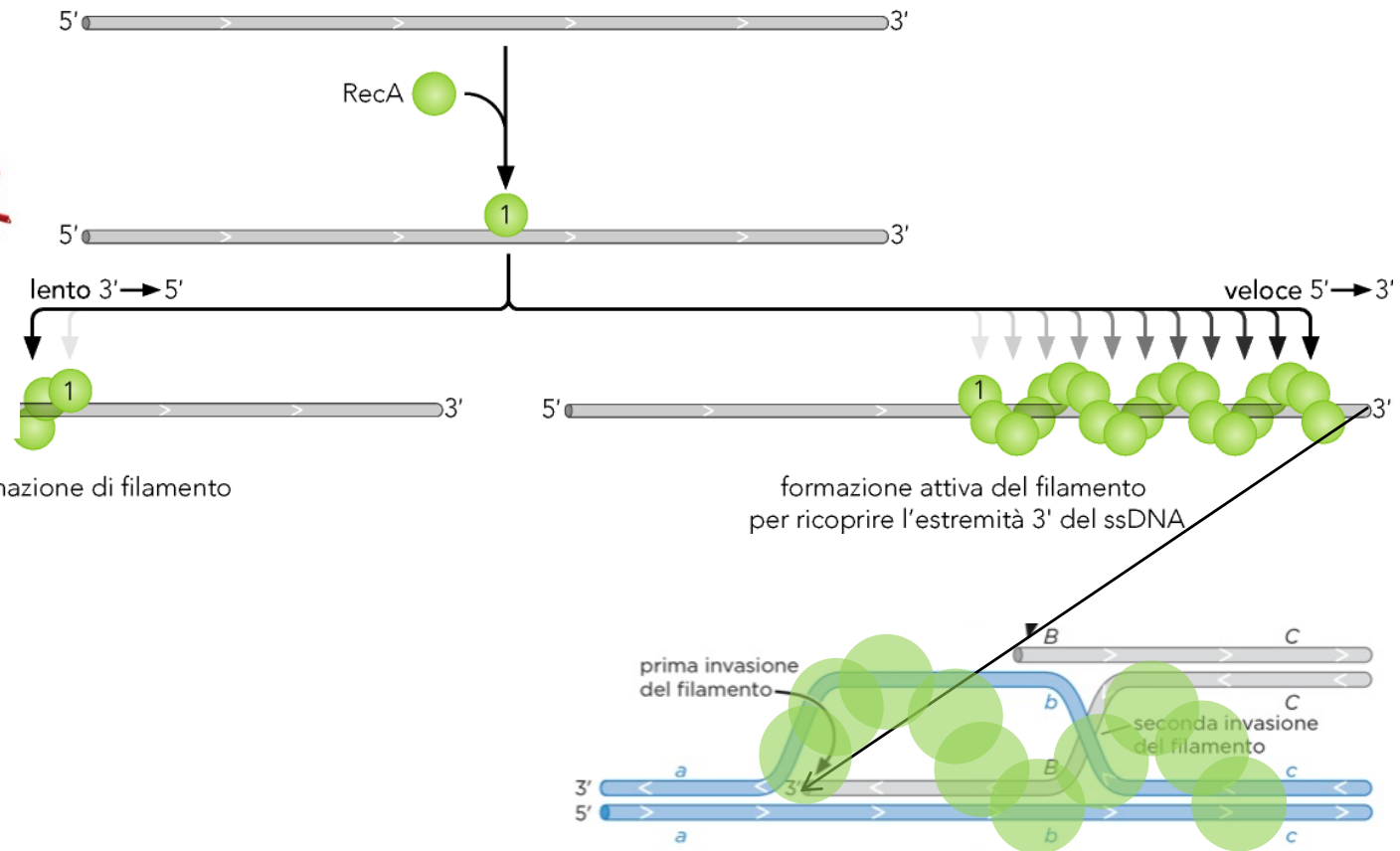
- Modello per la ricerca del filamento omologo.
Formazione della **molecola giuntata**.
- **RecA** (batterie) è molto conservata: 2 homologs in eukaryotes: **Rad51** e **Dmc1**.
- **Funzione: RecA si assembla sul DNA a singolo filamento – cerca sequenze omologhe in target DNA – invasione del filamento nel target DNA (doppia elica)**
- **3 CARATTERISTICHE:**
 - presenza di sequenze di DNA complementari tra le 2 partner
 - Una regione a singolo filamento su al meno una delle due molecole per permettere a RecA di assemblarsi
 - La presenza nelle regione di complementarità di un'estremità che permetta ai filamenti di DNA appartenenti alla doppia elica neoformata di avvolgersi uno sull'altro



RecA si assembla sul DNA a singolo filamento e promuove l'invasione del filamento



RecA
6 subunità

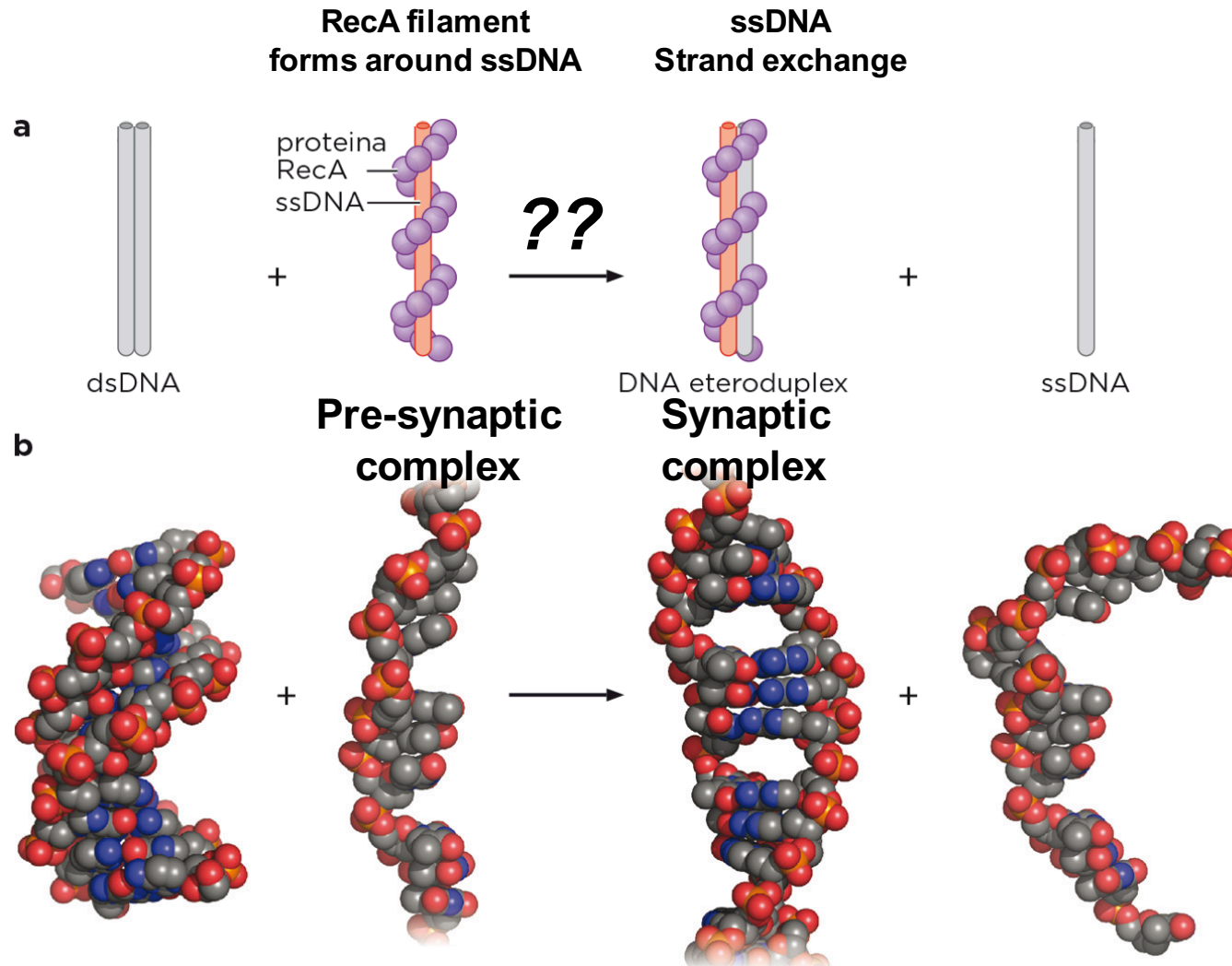


-RecA binds efficiently ssDNA; less efficiently to dsDNA

-RecA forms helical filaments efficiently in 5' → 3' orientation on ssDNA → filament runs versus the end of the ssDNA that inserts into target DNA

-RecA can bind ssDNA and dsDNA at the same time → allows insertion into homologous target dsDNA

RecA si assembla sul DNA a singolo filamento e promuove l'invasione del filamento



RecA si assembla sul DNA a singolo filamento e promuove l'invasione del filamento

Sito primario: ssDNA

Sito secondario: dsDNA

Legame veloce – transitorio – debole – indipendente della sequenza

→ **Scanning finche trova sequenze omologhe (trial and error)**

Mechanism:

Not clear!

1. Pre-synaptic complex:

ssDNA+RecA+ATP:

ssDNA is stretched (1.5x longer)

2. Synaptic complex:

dsDNA binds secondary site

dsDNA is opened transiently

And ssDNA checks presence of sequence homology

→ **15nt homology is sufficient to initiate strand exchange**

and the formation of a holiday junction/chiasma

= MOLECOLA GIUNTA (ssDNA+dsDNA over a distance of >hundreds of nt)

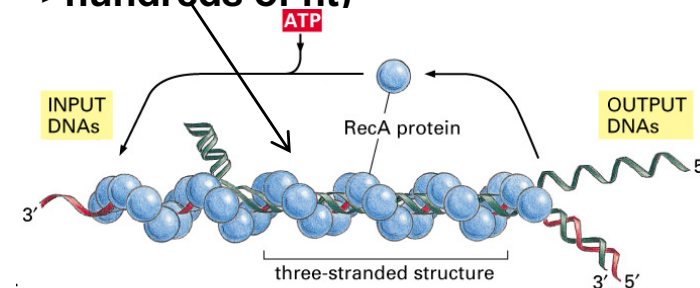
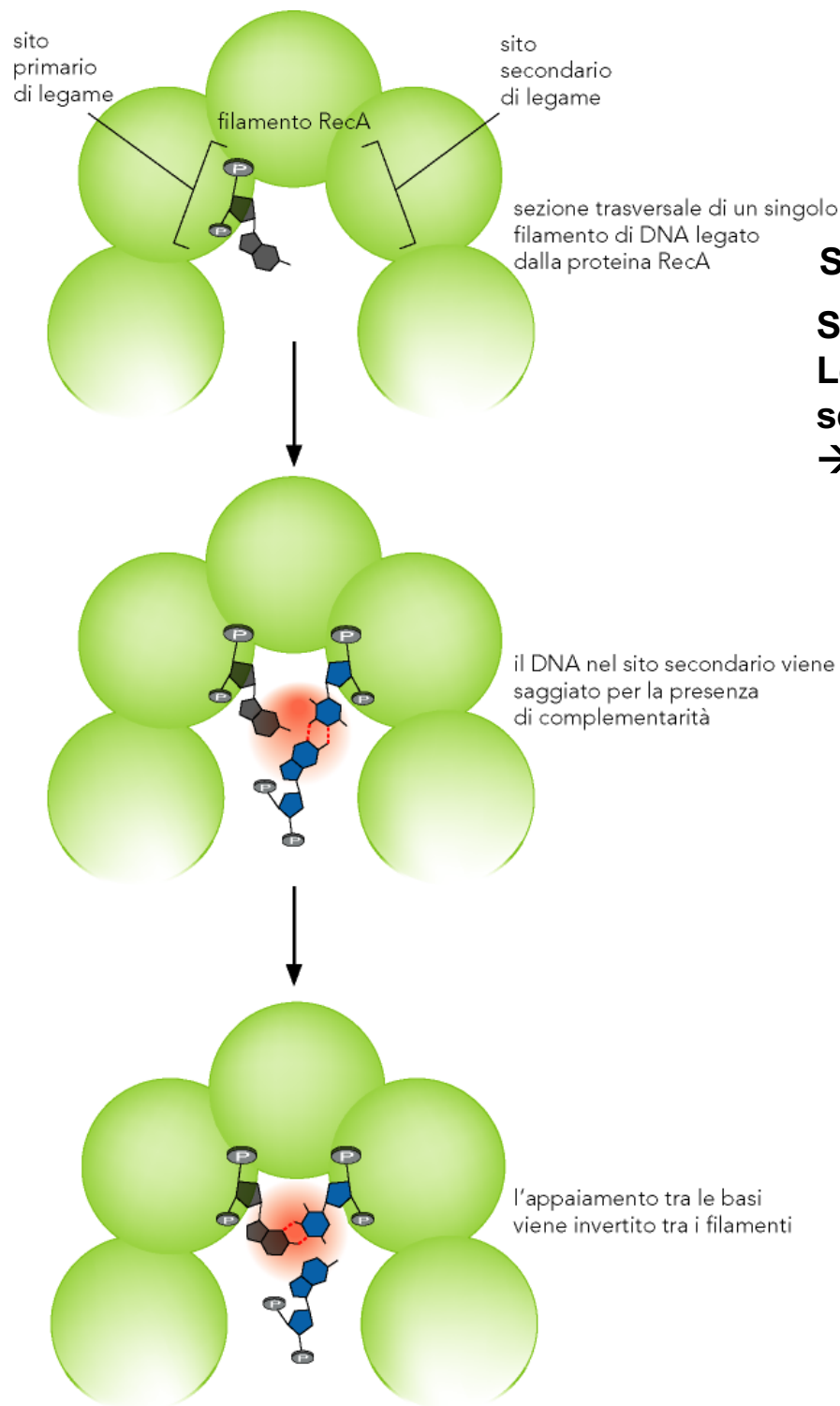
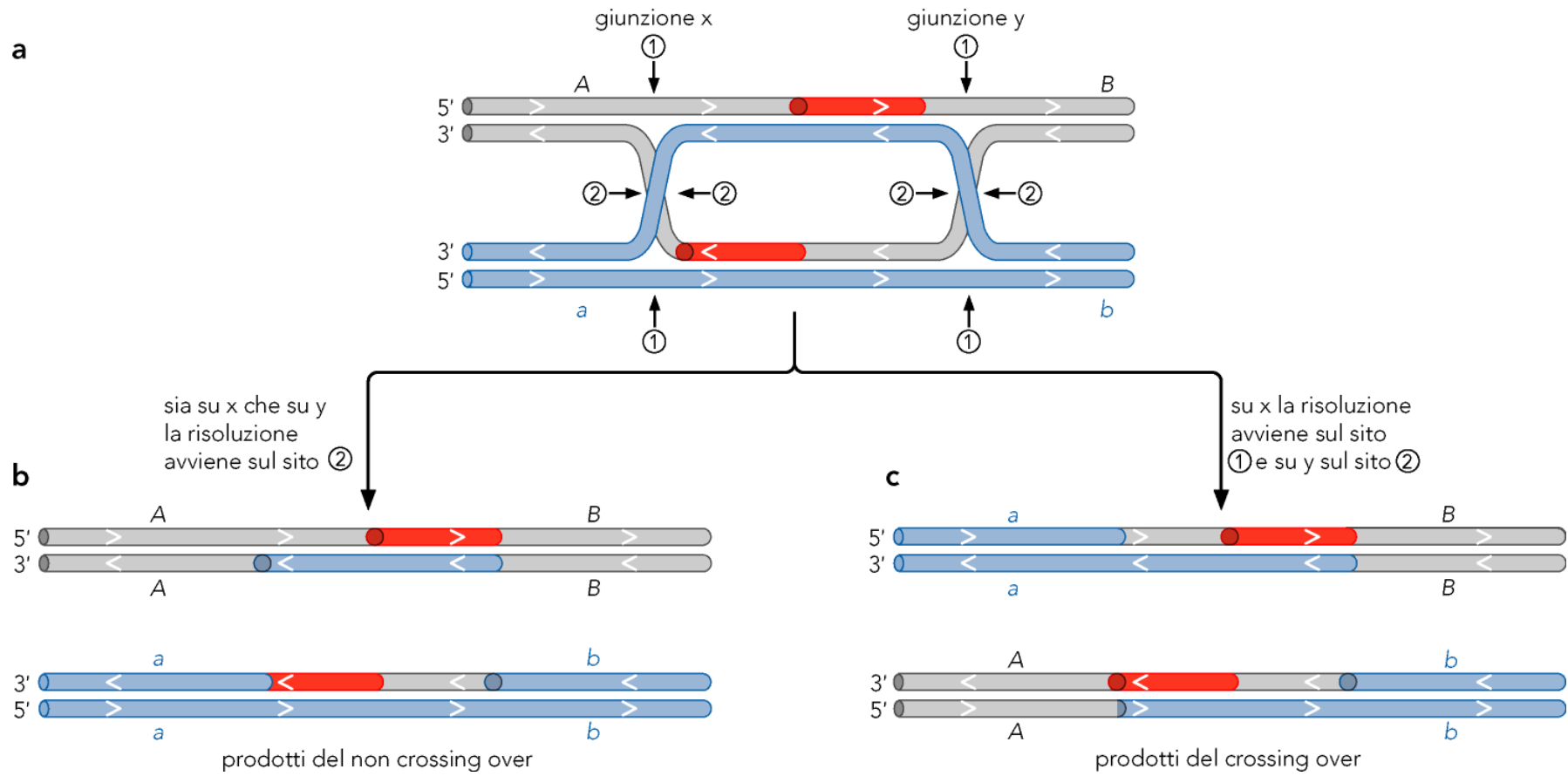


Figure 5-59. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

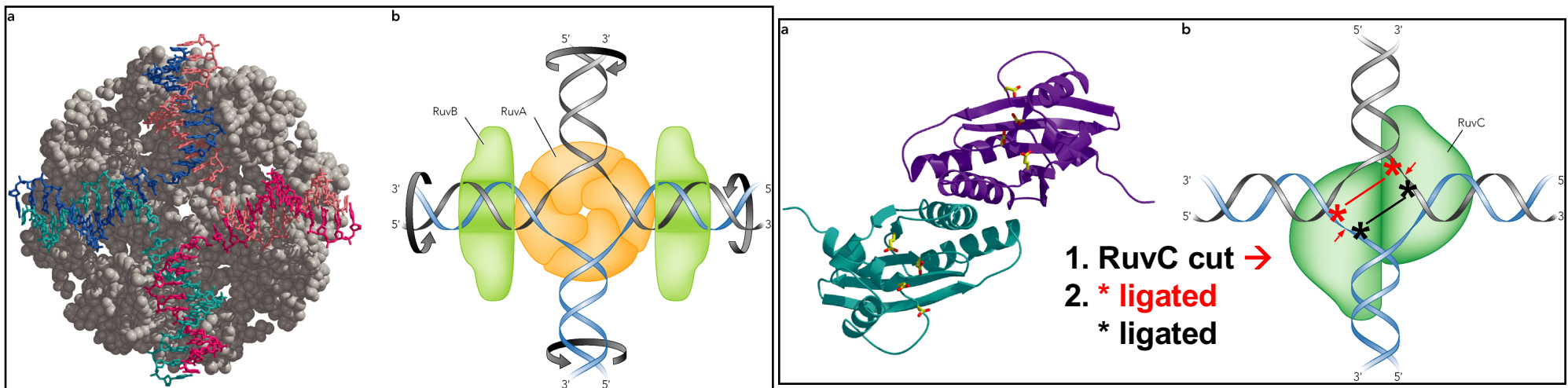


Anche: patched

Risoluzione delle giunzioni di Holliday

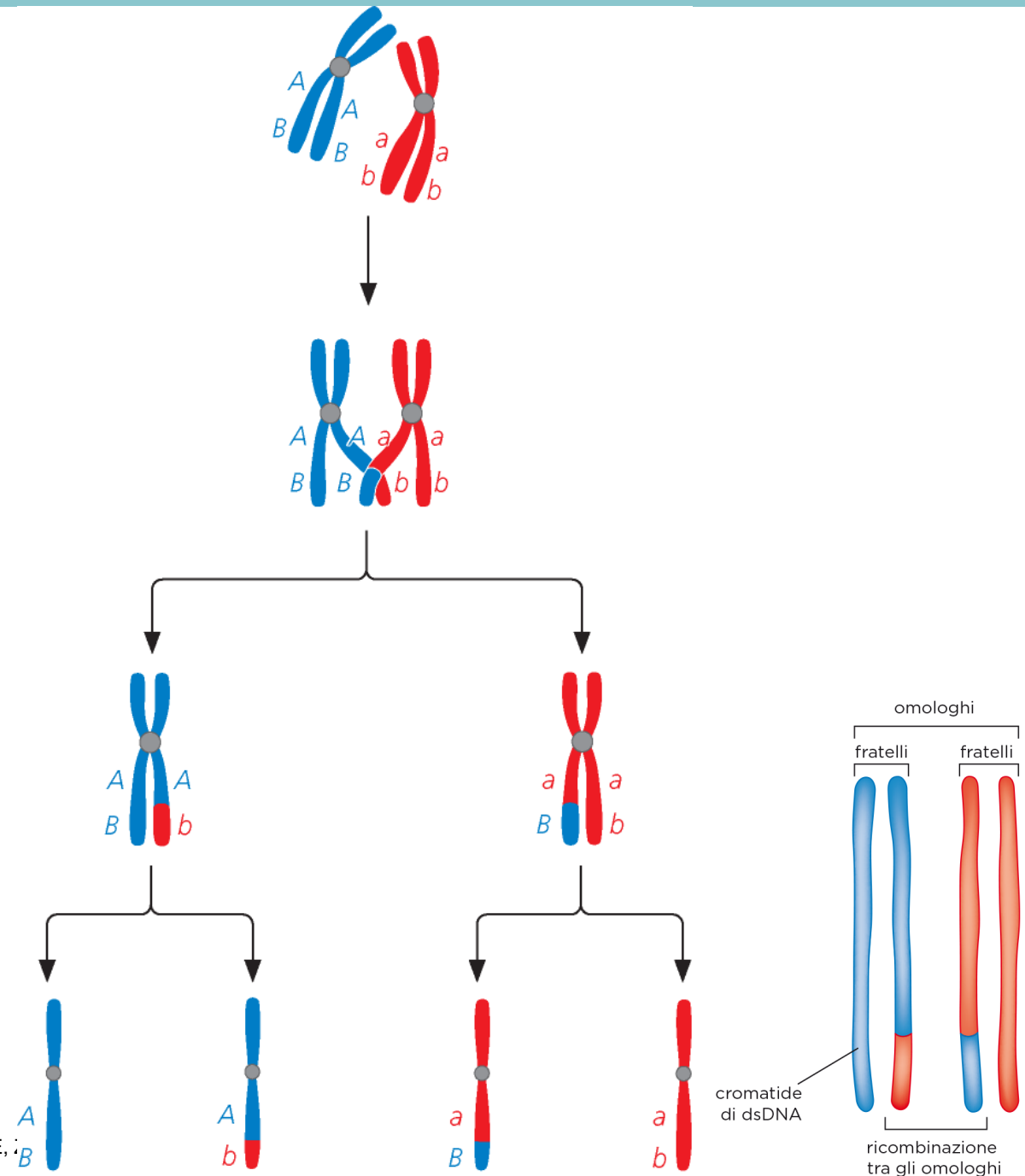
RuvABC – E.coli

- **RuvAB** riconosce la giunzione di Holliday e ne promuove la migrazione
- **RuvA** è un tetramero, **RuvB** un esamero con attività ATPasica.
- **RuvC** è una resolvasi che risolve il complesso tagliando in una delle due direzioni
- **RuvA** si lega specificamente alla Holliday Junction.
- Recluta **RuvB** che è un' ATPasi simile a elicasi, che muove la Holliday J.
- **RuvC** dimer risolve le Holliday Junctions: makes cuts and open ends will be joint by a DNA ligase



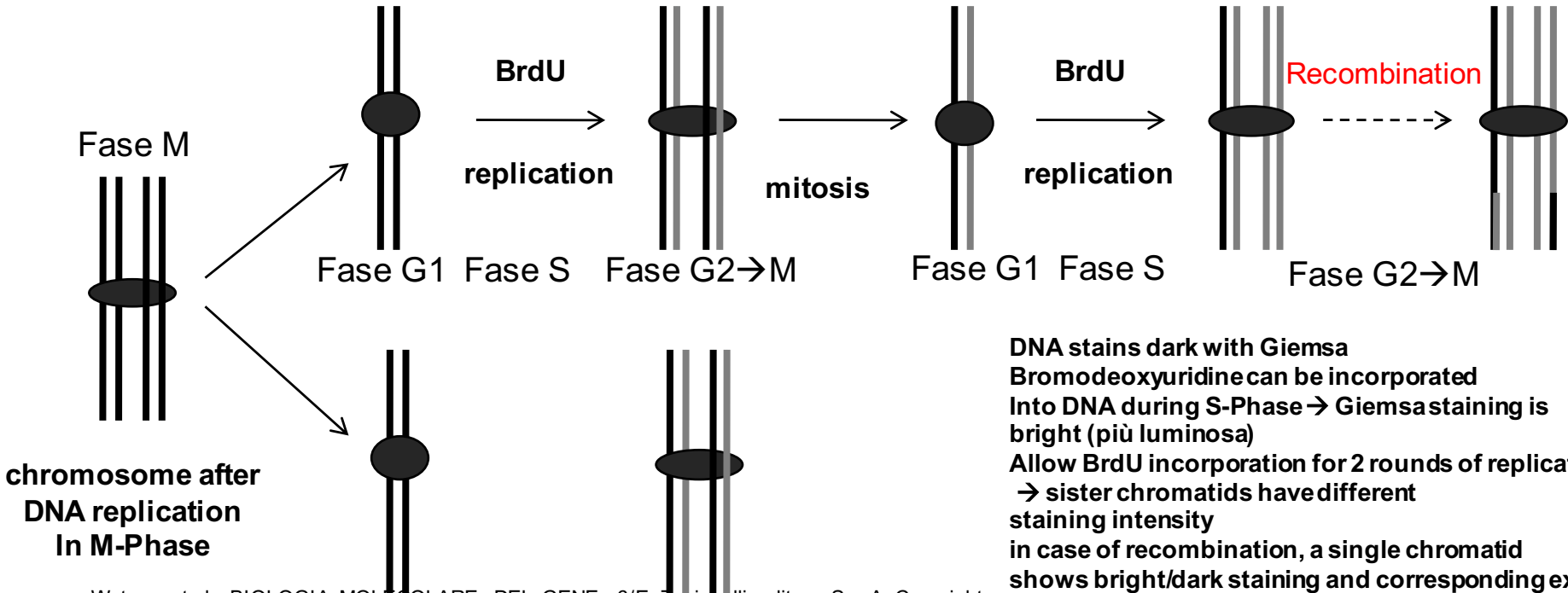
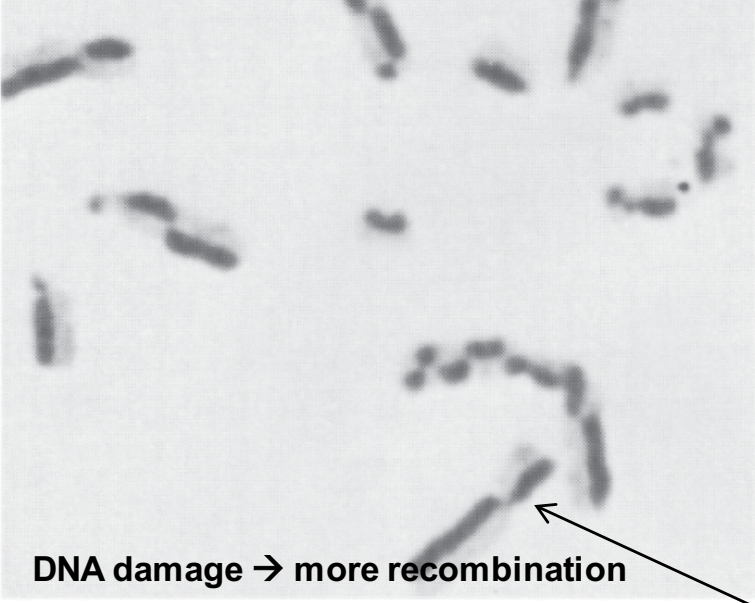
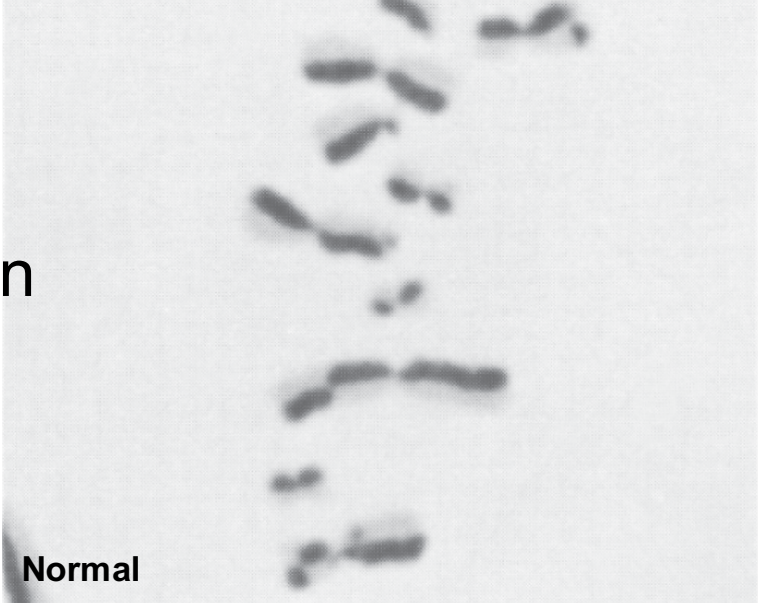
La ricombinazione omologa negli eucarioti

- Nei procarioti la RO serve per riparare le rotture del dsDNA, permettere alle forche bloccate di ripartire e ricombinare con DNA fagico o di coniugazione.
- Negli eucarioti è anche necessaria per la meiosi per l'appaiamento dei cromosomi omologhi.
- **Ricombinazione meiotica:** ricombinazione omologa che avviene durante la meiosi.



La ricombinazione omologa negli eucarioti

Human cells



DNA stains dark with Giemsa
 Bromodeoxyuridine can be incorporated
 Into DNA during S-Phase → Giemsa staining is
 bright (più luminosa)
 Allow BrdU incorporation for 2 rounds of replication
 → sister chromatids have different
 staining intensity
 in case of recombination, a single chromatid
 shows bright/dark staining and corresponding exchange
 of staining intensity

La ricombinazione omologa negli eucarioti

Homologous recombination in meiosis

Endonuclease Spo11 (yeast) cuts many times in a non-specific manner when homologous chromosomes pair with each other

Double stranded breaks get processed

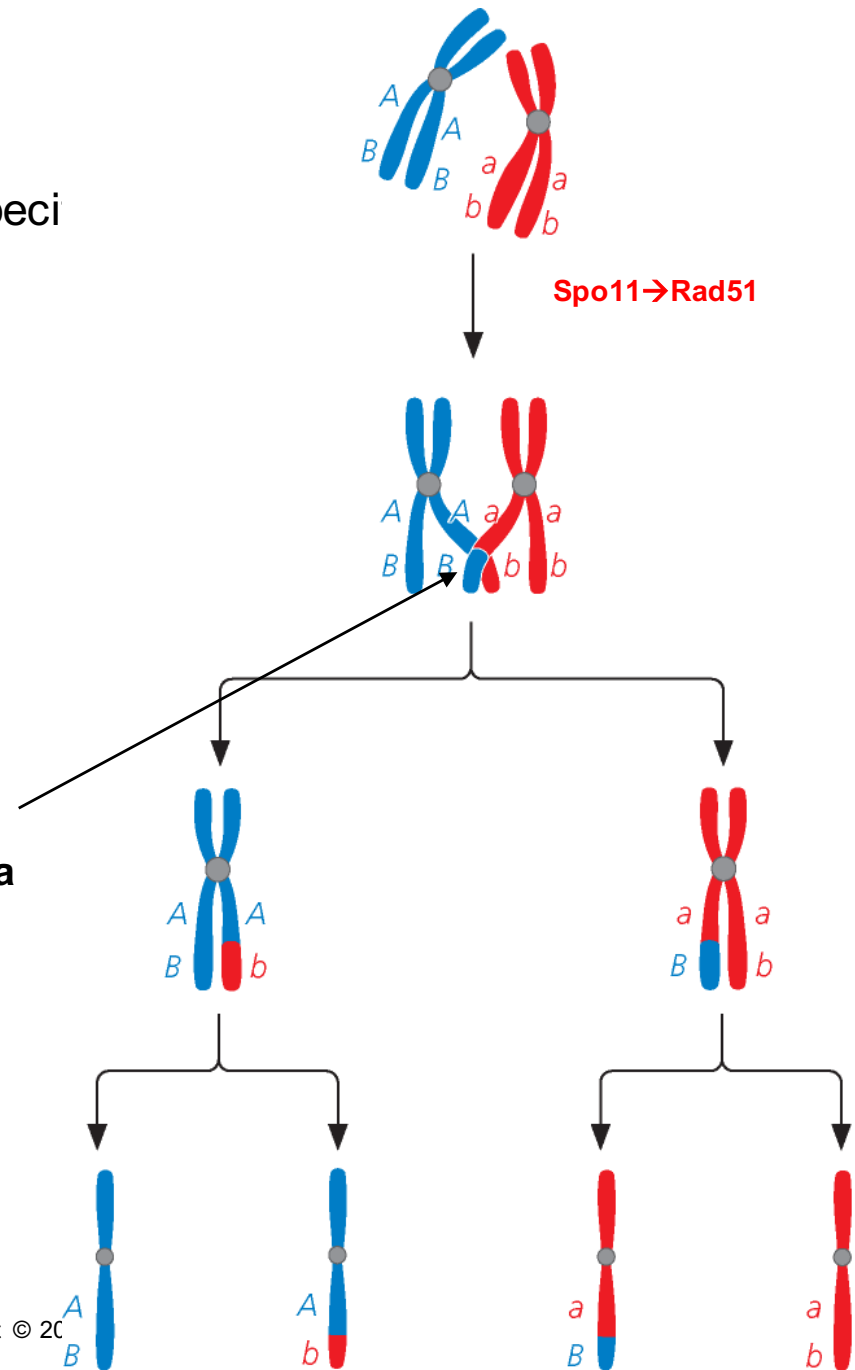
RAD51 comes in → recombination

Spo11 preferentially cuts at sites that are not strictly covered by nucleosomes → hot spots of recombination (similar to chi sites in bacteria)



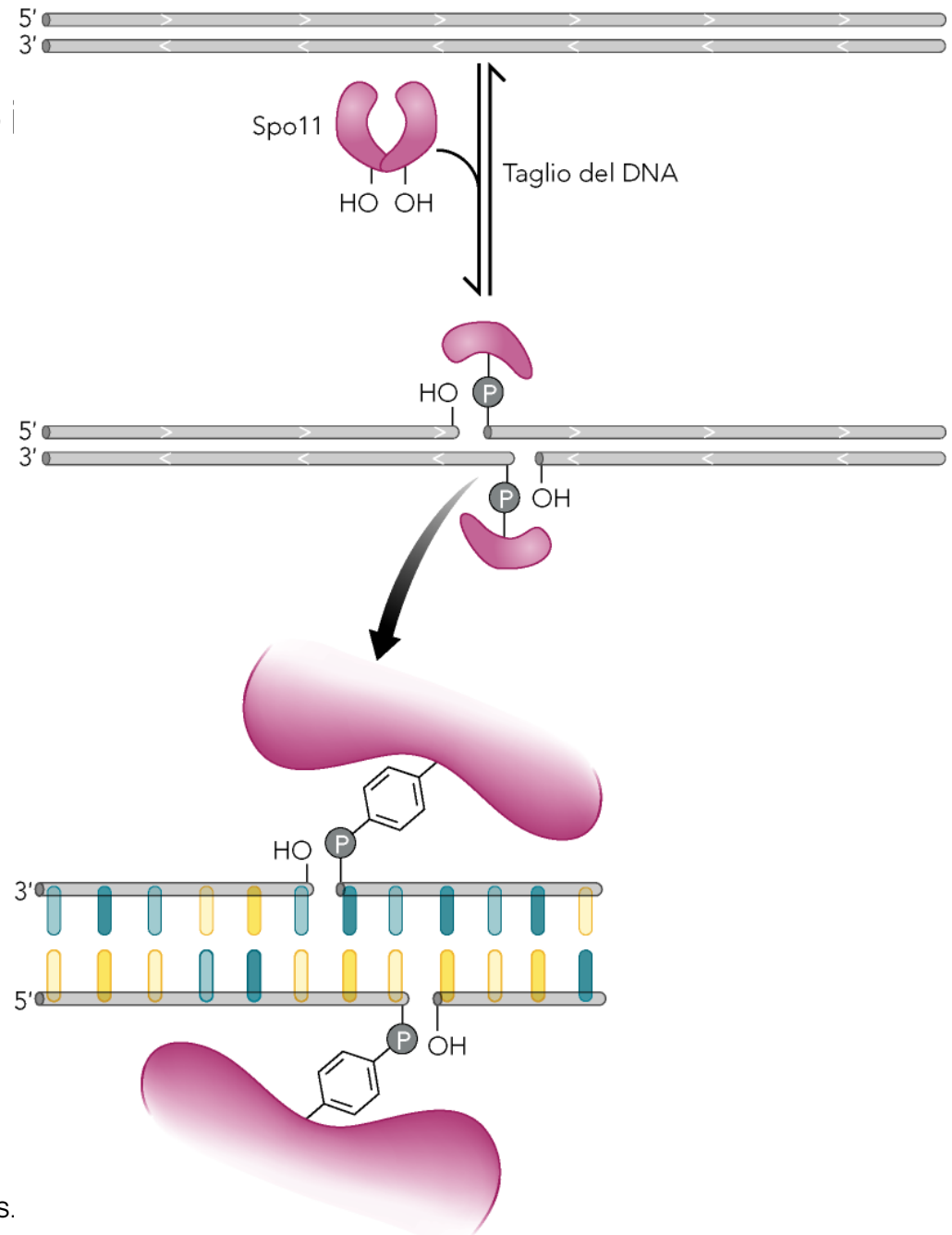
In this photomicrograph, a tetrad of the grasshopper *Chorthippus parallelus* shows 5 chiasmata

chiasma



Ricombinazione meiotica: Spo11

- Spo11 inizia la ricombinazione meiotica producendo dei tagli del dsDNA quando i cromosomi si appaiano.
- Taglia in zone non associate a nucleosomi ed attive.
- Taglia 2 filamenti e rimane associato tramite legame covalente
- Taglio e sfalsato
- Spo11 marks the strand that will be subjected to processing to form 3'overhangs by the MRX complex
- (Mre11, Rd50, Xrs2)



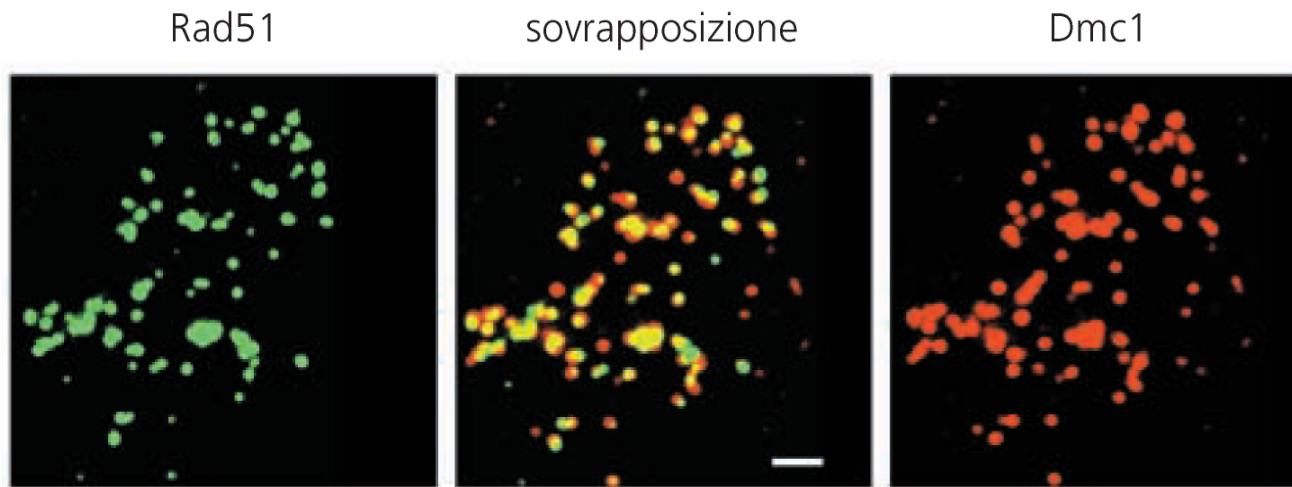
Recombination requires protein factories

Altri fattori come BRCA2 partecipano al processo formando dei complessi.

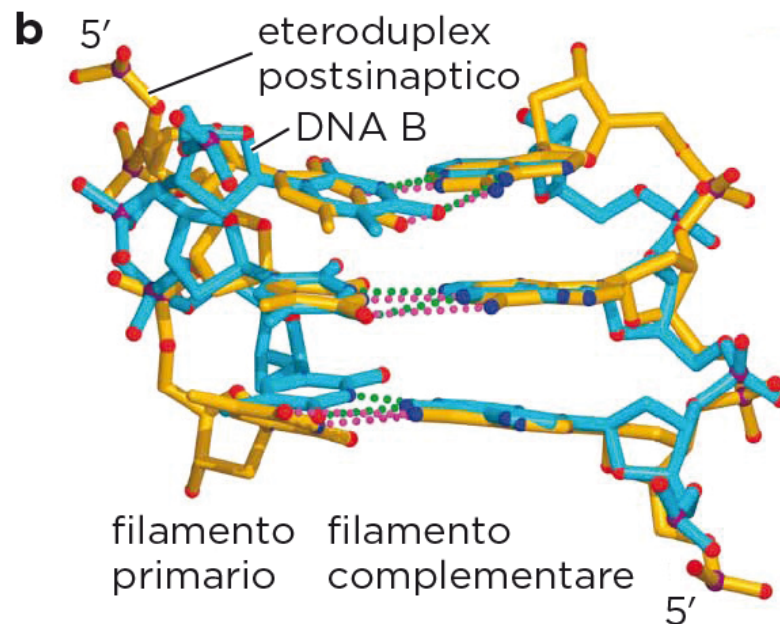
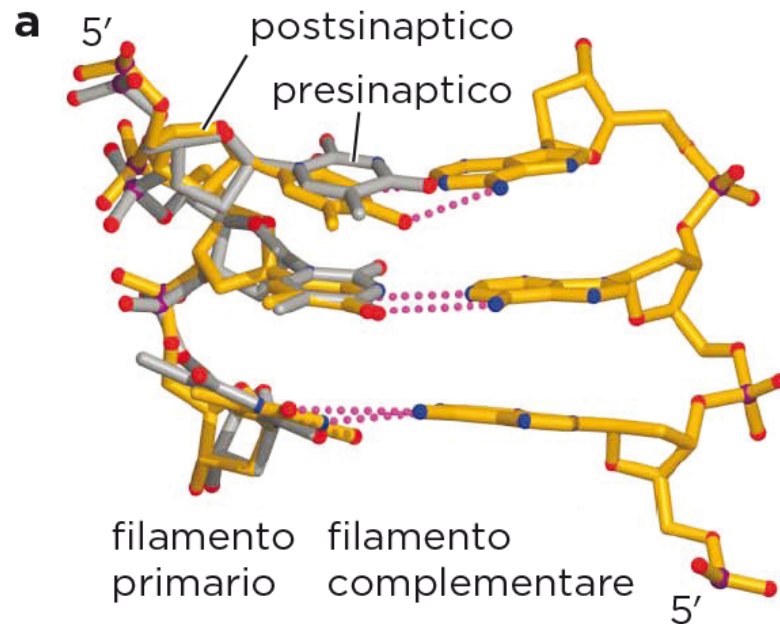
BRCA2 interagisce con Rad51.

Le mutazioni su BRCA2 sono responsabili della metà dei tumori familiari al seno

E' possibile visualizzare questi complessi: "fabbriche" della ricombinazione



RecA si assembla sul DNA a singolo filamento e promuove l'invasione del filamento



Sito primario: ssDNA

Sito secondario: dsDNA

Legame veloce – transitorio – debole

→ Scanning finche trova sequenze omologhe

Mechanism:

Not clear!

1. Pre-synaptic complex:

ssDNA+RecA+ATP:

ssDNA is stretched (1.5x longer)

2. Synaptic complex:

dsDNA binds secondary site

dsDNA is opened transiently

And ssDNA checks presence of sequence homology

→ 15nt homology is sufficient to initiate strand exchange

and the formation of a holiday junction/chiasma

= MOLECOLA GIUNTA (ssDNA+dsDNA over a distance of

>hundreds of nt)