

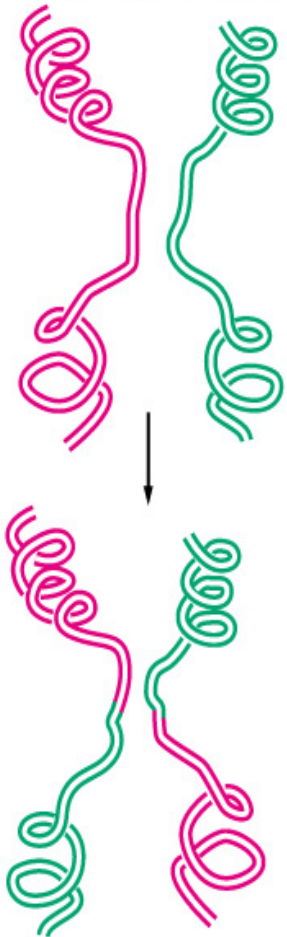
Ricombinazioni

- 1) Ricombinazioni omologhe**
- 2) Ricombinazioni sito-specifiche**
- 3) Trasposizioni**

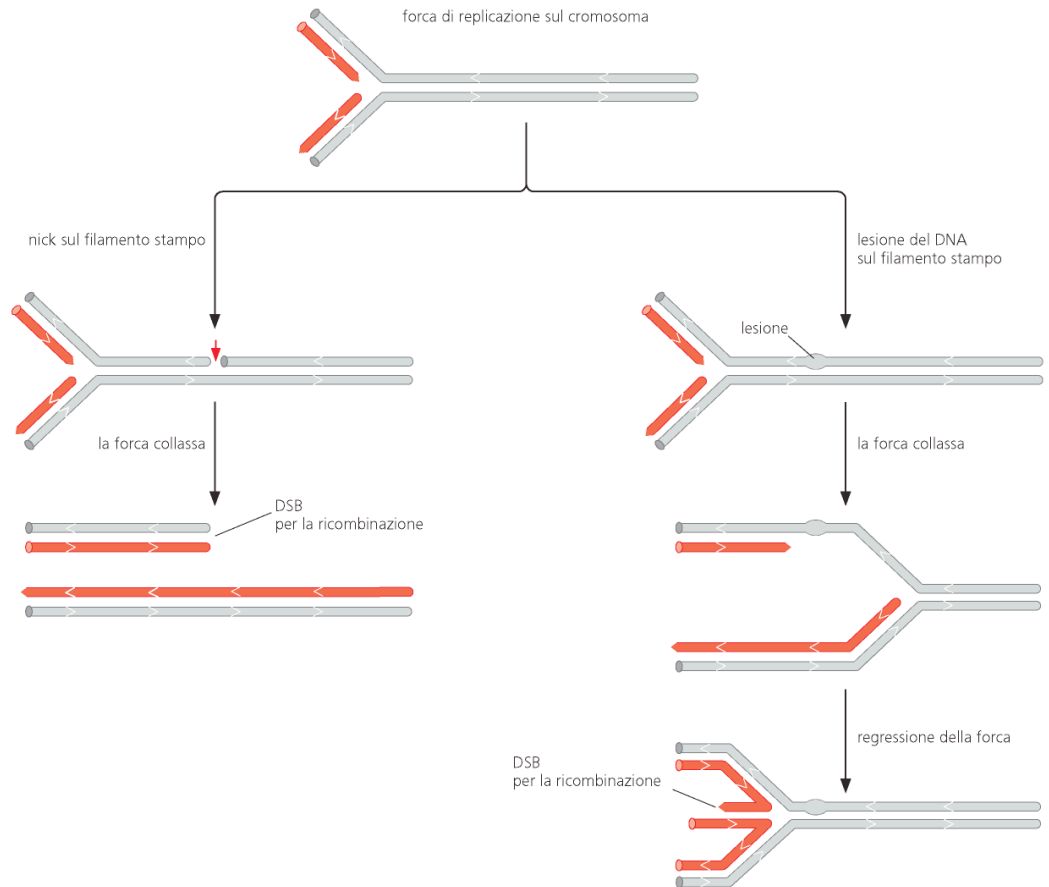
La ricombinazione omologa

La ricombinazione omologa è coinvolta: nel crossing over durante la meiosi, nel recuperare sequenze perse per danni al DNA, nel far ripartire forche replicative danneggiate, ...

two homologous DNA double helices



two DNA molecules that have crossed over



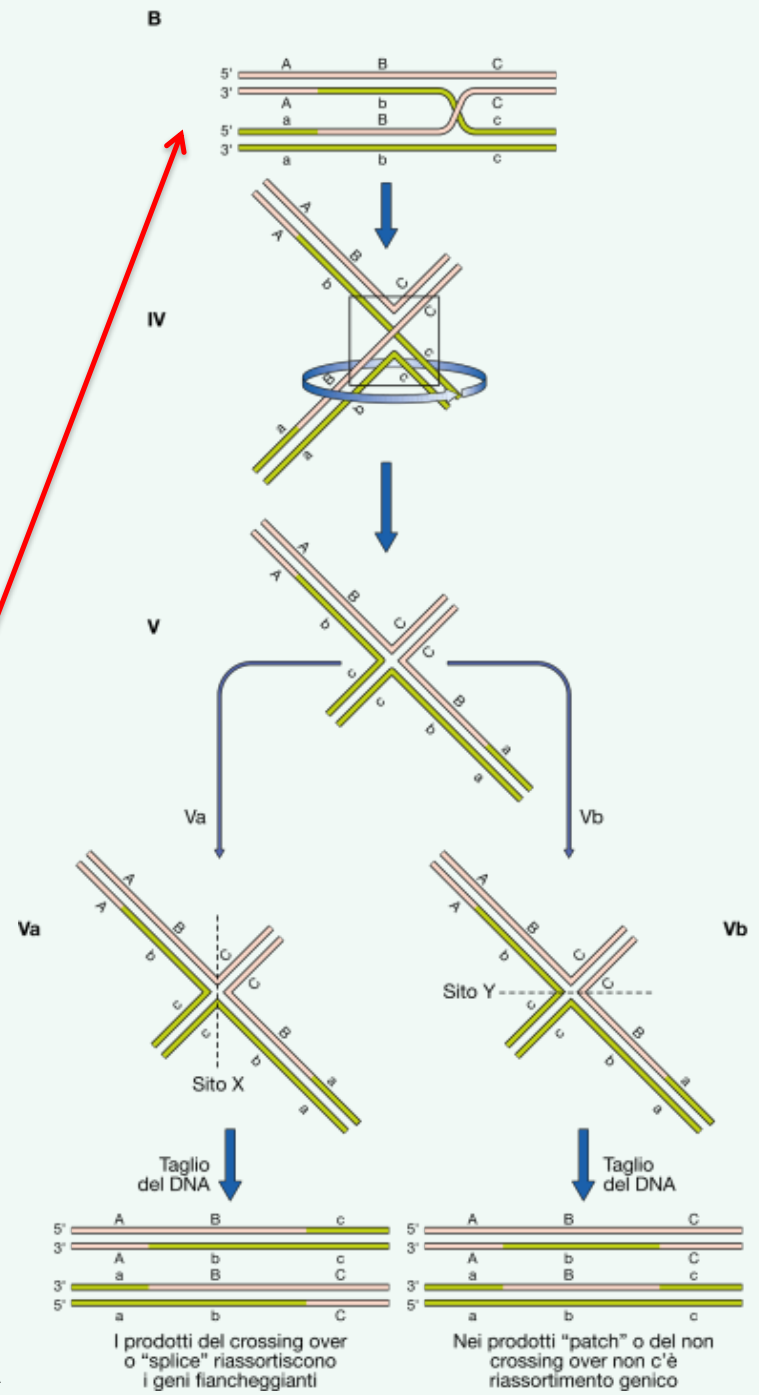
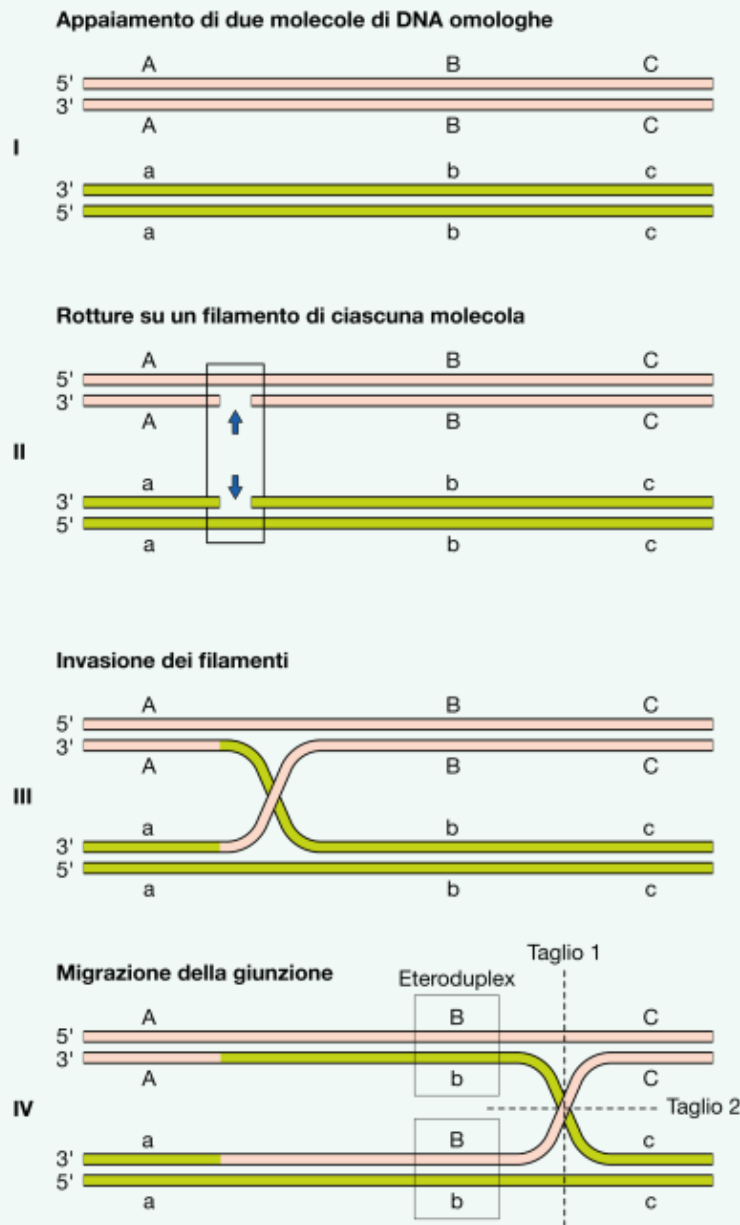
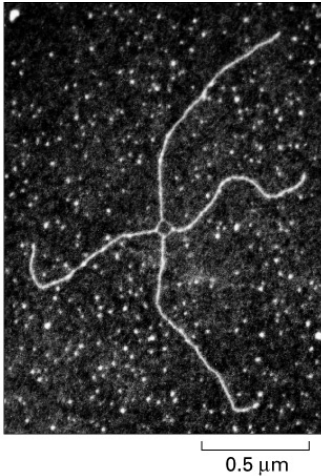
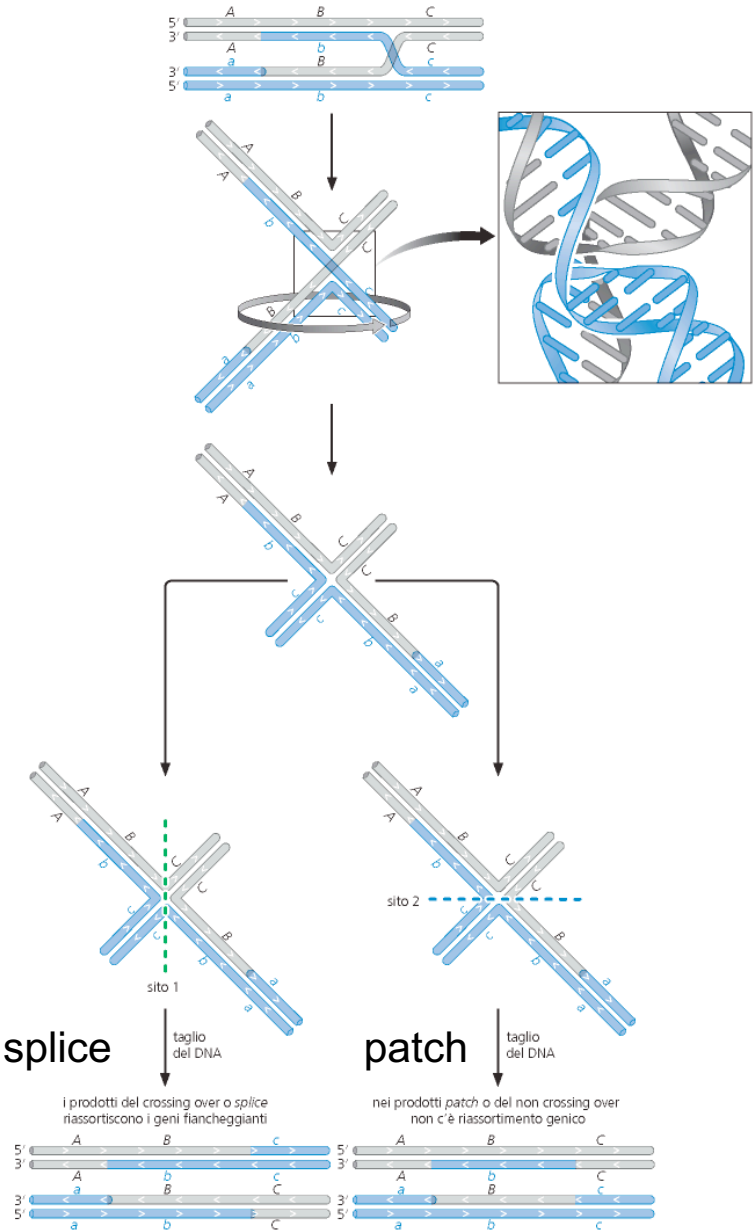


Figura 8.2 Modello originario di ricombinazione di Holliday innescato da tagli su un singolo filamento di DNA.

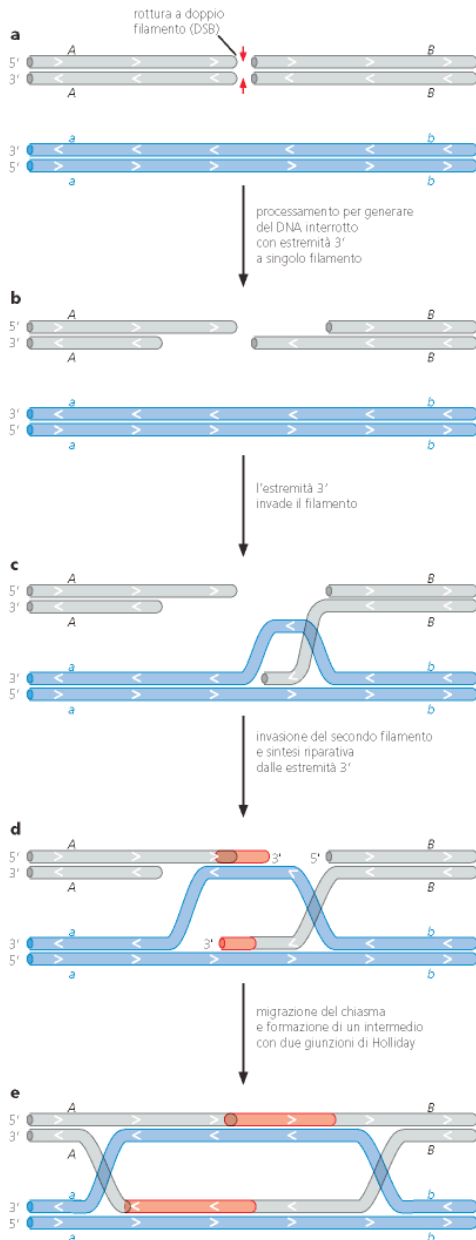
Taglio della giunzione di Holliday

Possono avvenire due tipi di tagli:

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



Modello di riparazione dei DSB attraverso ricombinazione omologa



Modello di Holliday applicato ad una doppia rottura su un filamento di DNA.

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

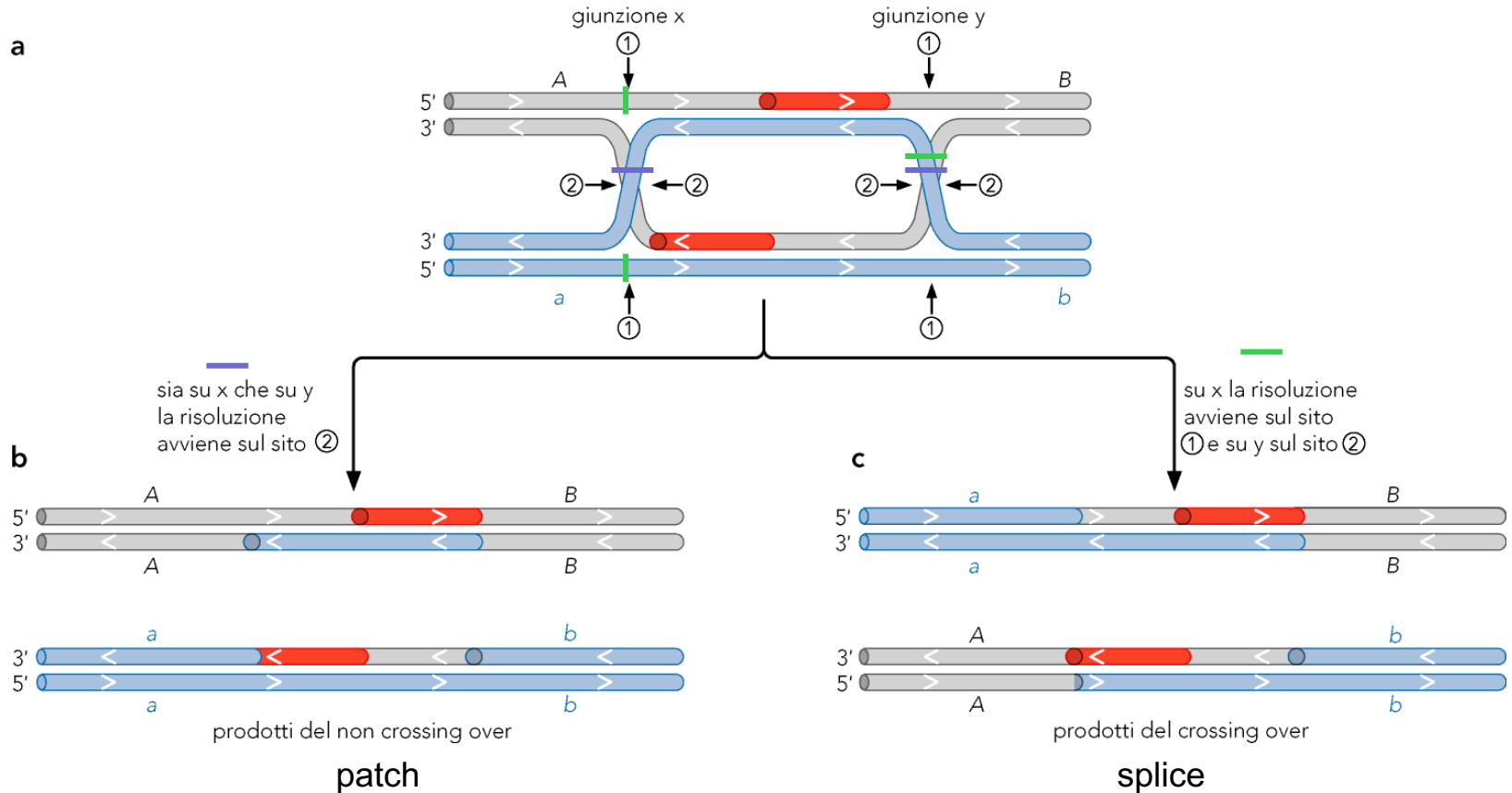
Il DNA ricevente si taglia. Esonucleasi agiscono e liberano un 3'. Questo invade il DNA omologo e si estende. Si forma un D-loop.

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

Ci sono due regioni unite. Doppia giunzione di Holliday.

Il DNA del donatore ha sostituito quello dell' accettore.

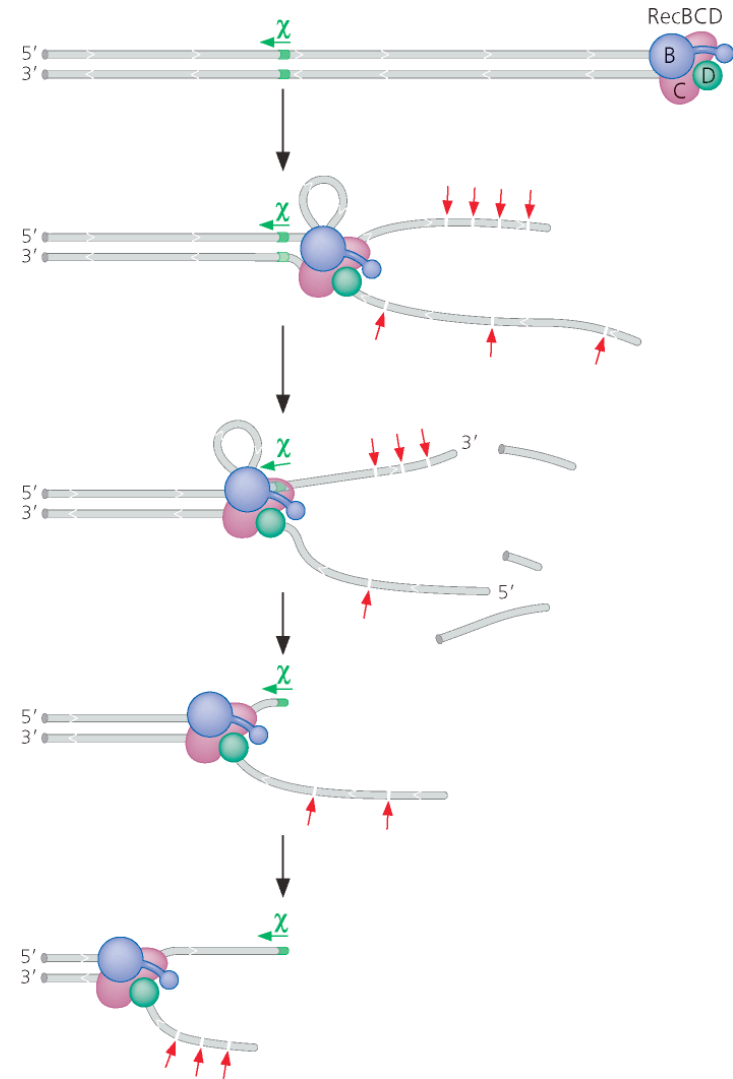
Risoluzione della riparazione del DSB



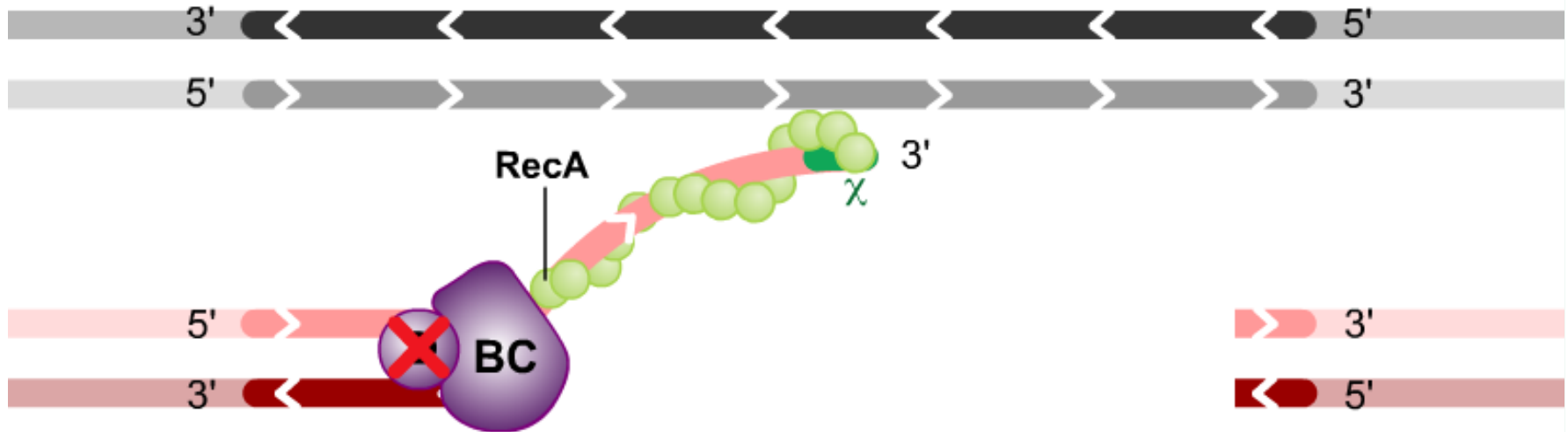
- Se i tagli avvengono simmetricamente (1:1 o 2:2) si risolve in un patch
- Se asimmetrici (1:2 o 2:1) nella ricombinazione (splice)

Meccanismi molecolari della RO

- 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



La forma attiva di RecA

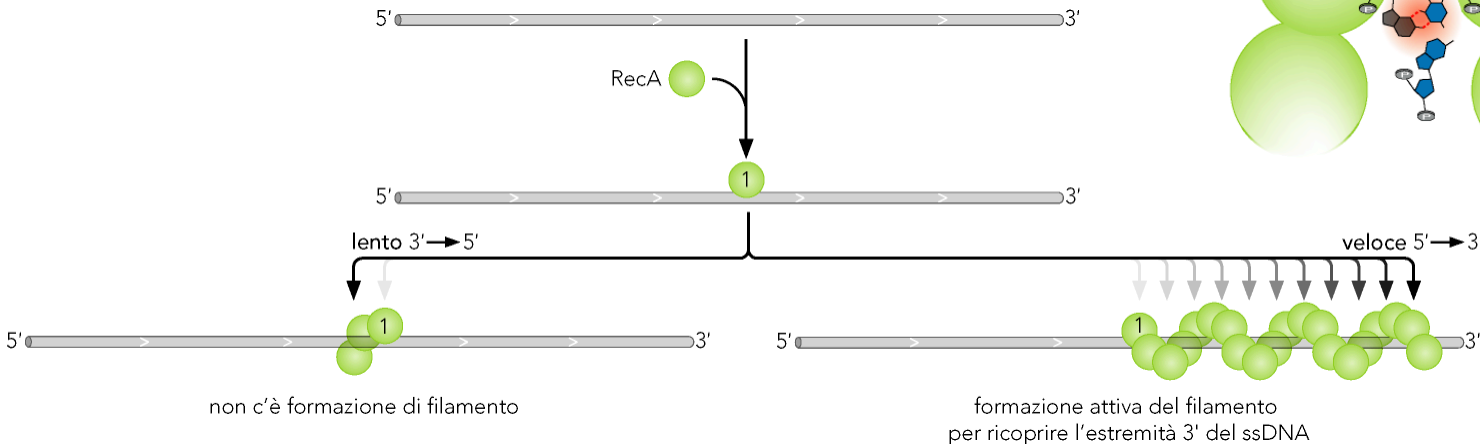
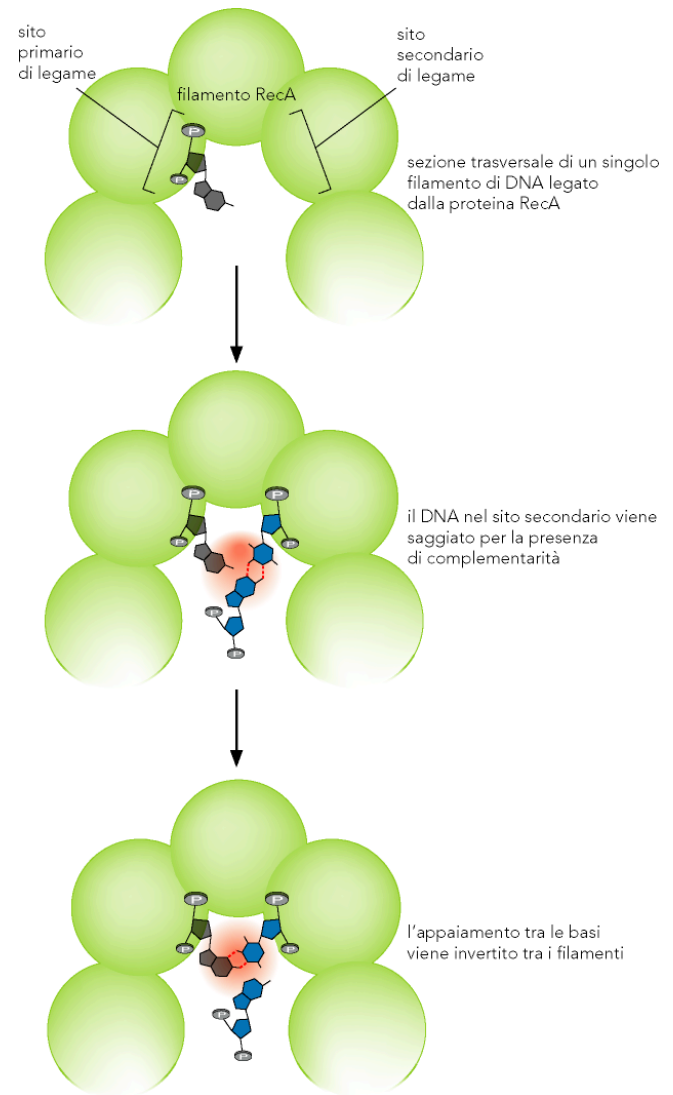


RecBCD helps to direct a protein called RecA to the single-stranded DNA tail. The active form of RecA is a protein-DNA filament consisting of hundreds of RecA subunits, with one RecA for every three nucleotides of DNA.

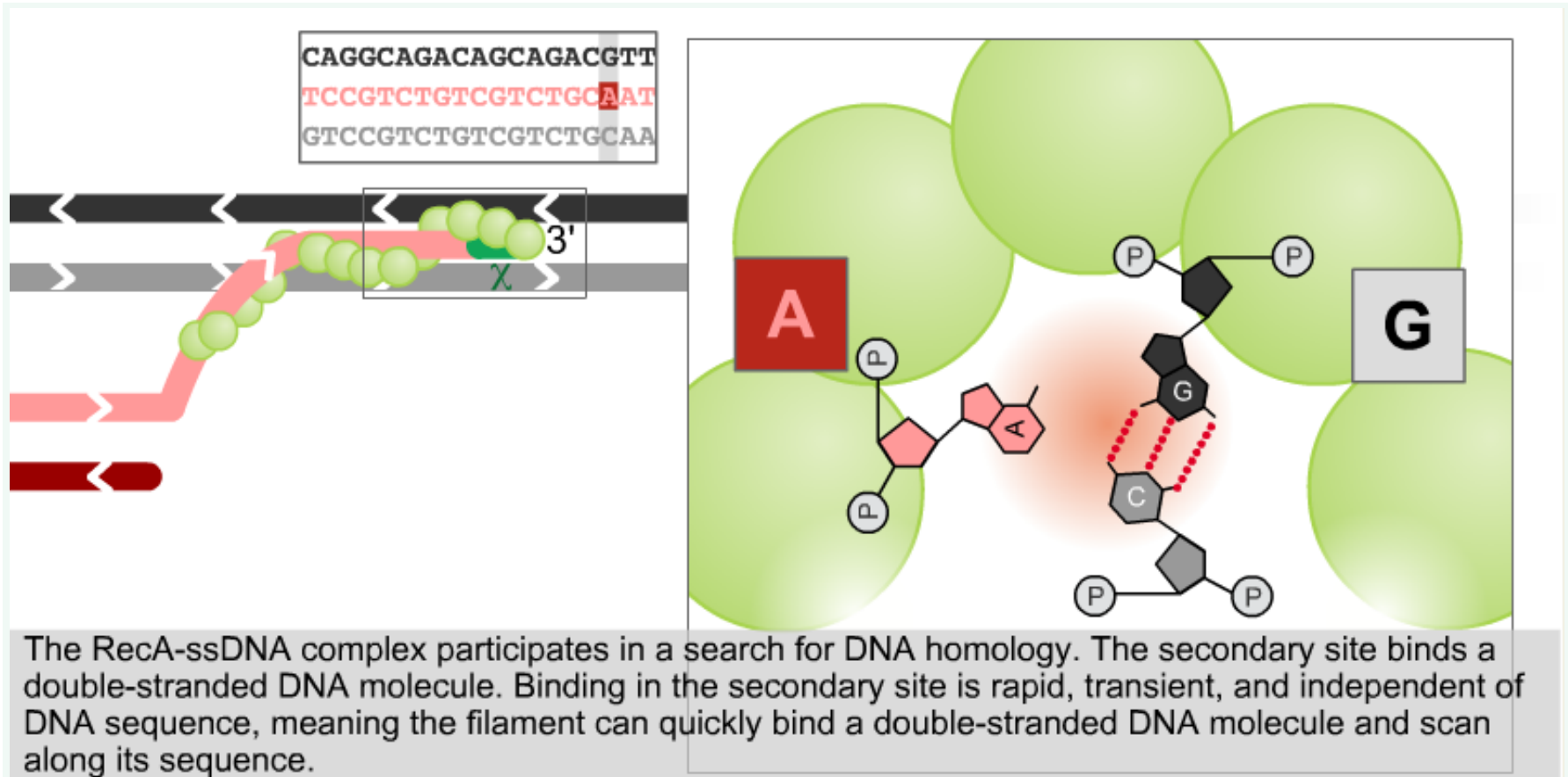
- **RecA** si lega al 3' - la proteina che scambia filamento
- RecA copre il 3' in maniera cooperativa e catalizza l'appaiamento con il DNA omologo

RecA

- Modello per la ricerca del filamento omologo. Formazione della **molecola giuntata**.
- **RecA** è molto conservata. Negli eucarioti **Rad51** e **Dmc1**.
- Polarità dell'assemblaggio di RecA.

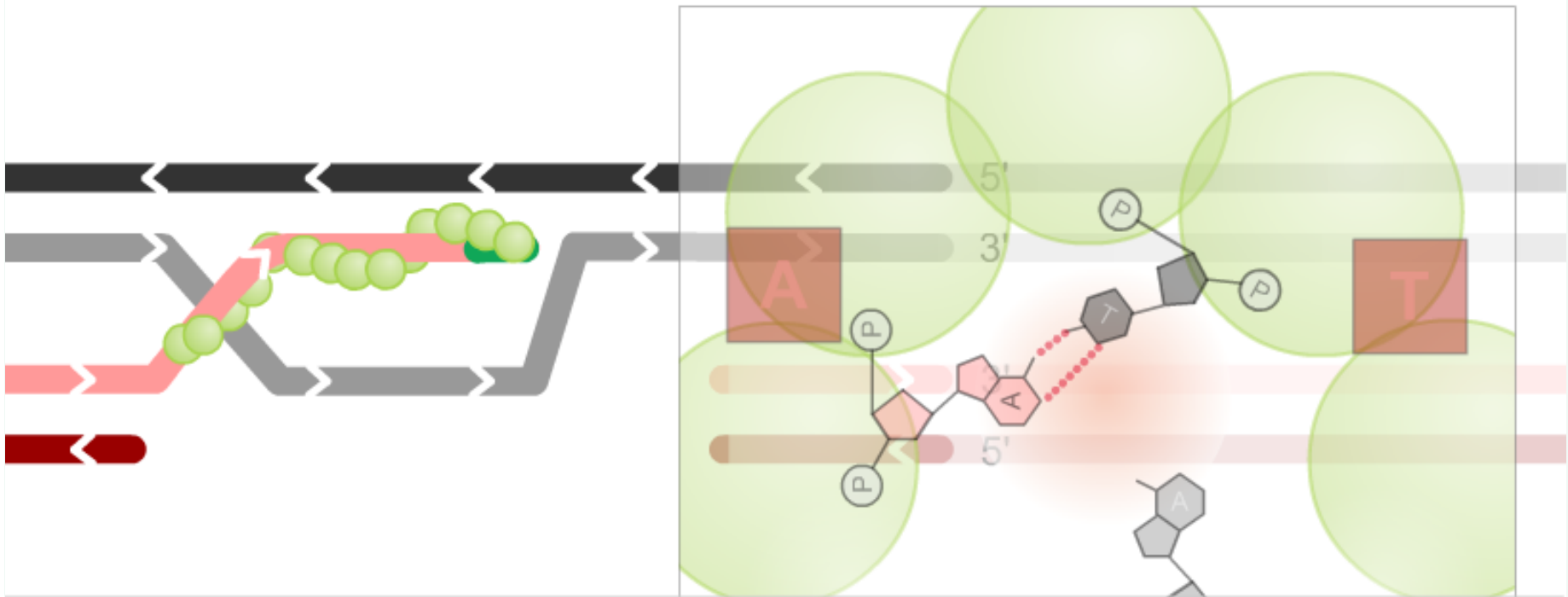


Ricerca della complementarità



Appaiamento delle basi complementari (+/- 15 paia di basi)

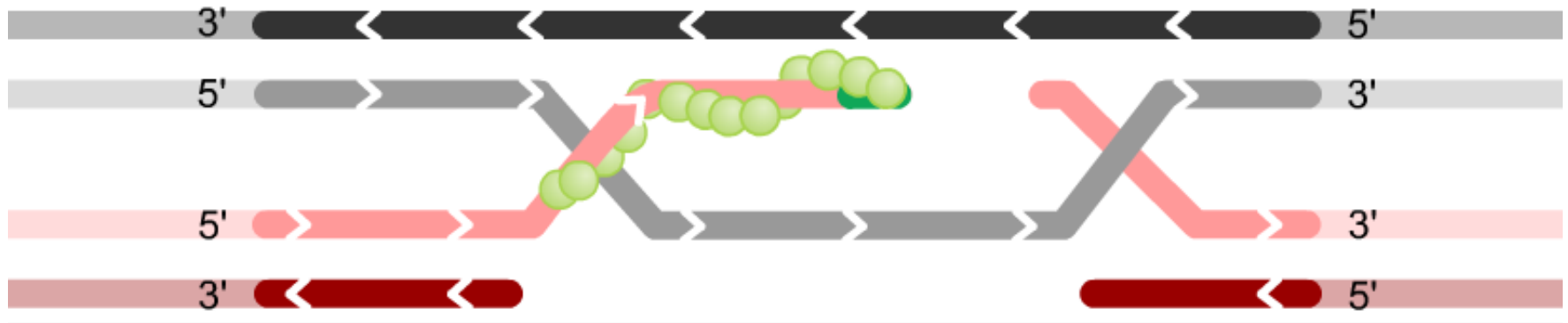
► RecA promotes strand invasion



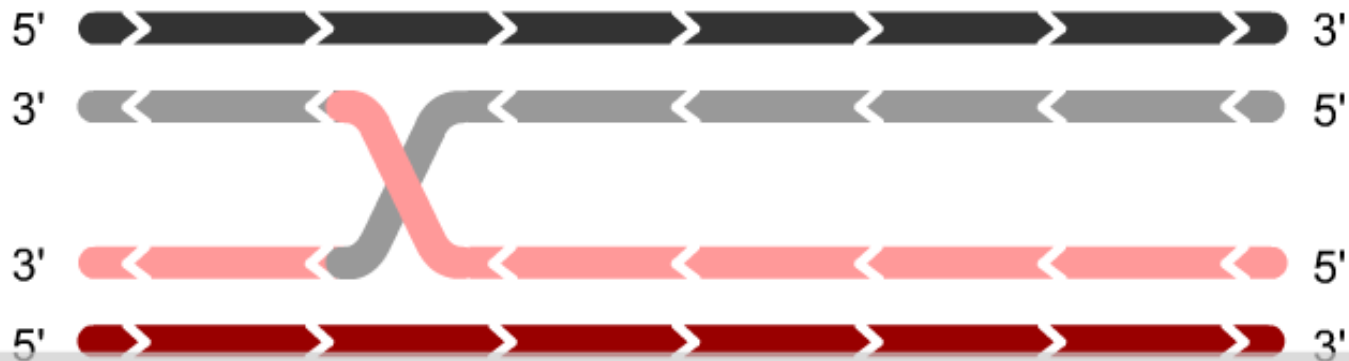
Once a region of base-pair complementarity is located, RecA promotes the formation of a stable complex between the single-stranded DNA tail in the primary site and the complementary strand of the double-stranded DNA molecule in the secondary site. As in the Holliday model, this step is called strand invasion.

Passaggi della pathway di RecBCD

► RecA promotes strand invasion



Holliday model

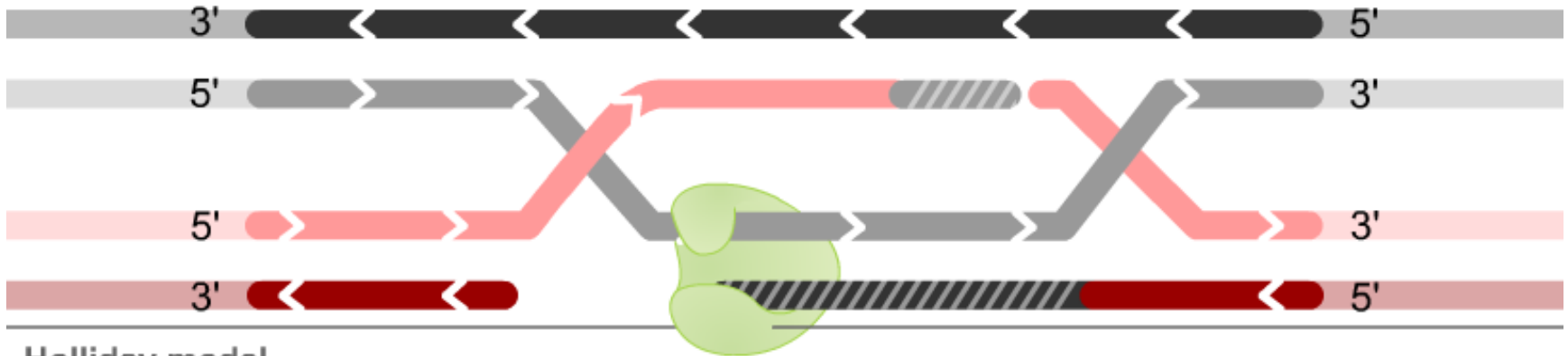


However, unlike the Holliday model, the RecBCD pathway can involve two Holliday junctions.

Passaggi della pathway di RecBCD

► RecA promotes strand invasion

DNA polymerase

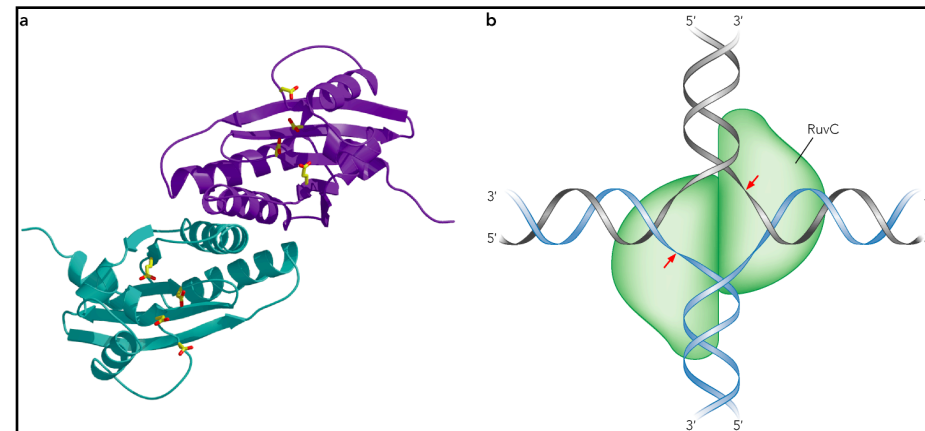
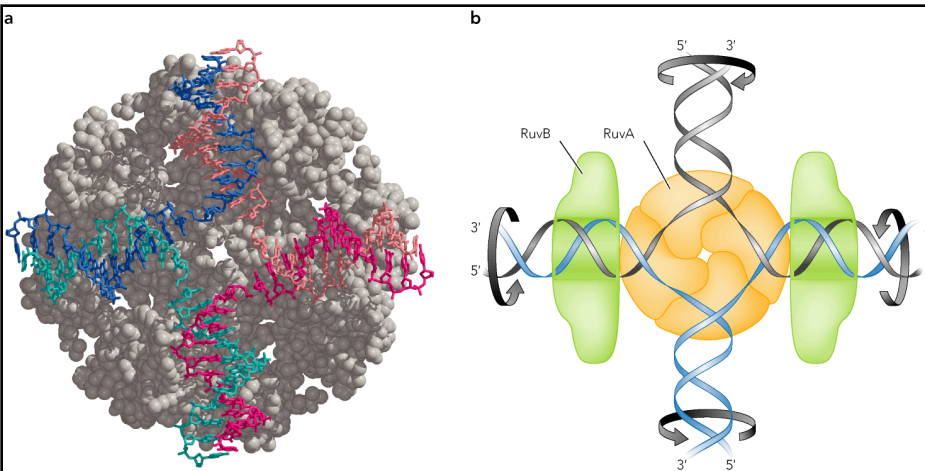


Holliday model

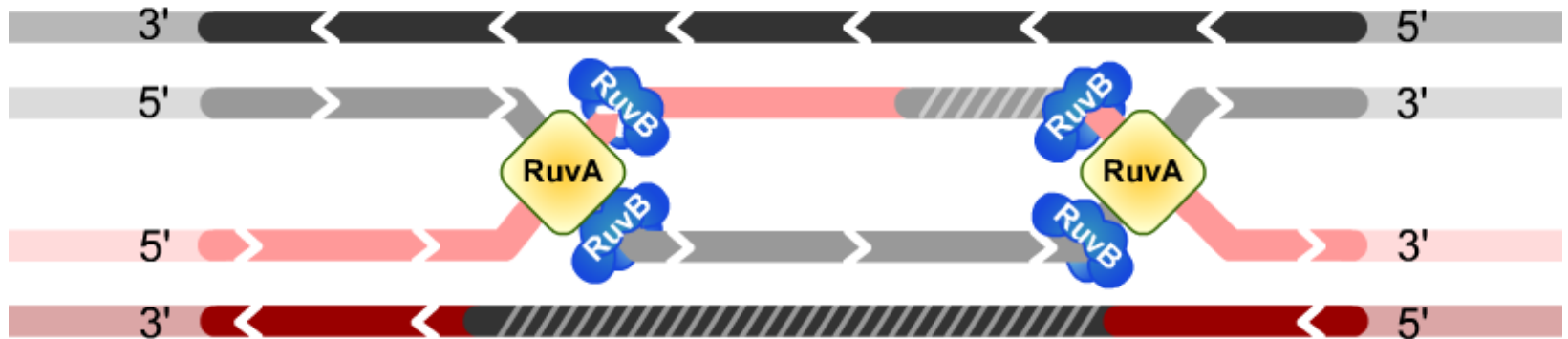


Risoluzione delle giunzioni di Holliday RuvABC

- **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 J.
- Recluta **RuvB** che è un' ATPasi simile a elicasi, che muove la Holliday J.
- **RuvC** risolve le Holliday J.



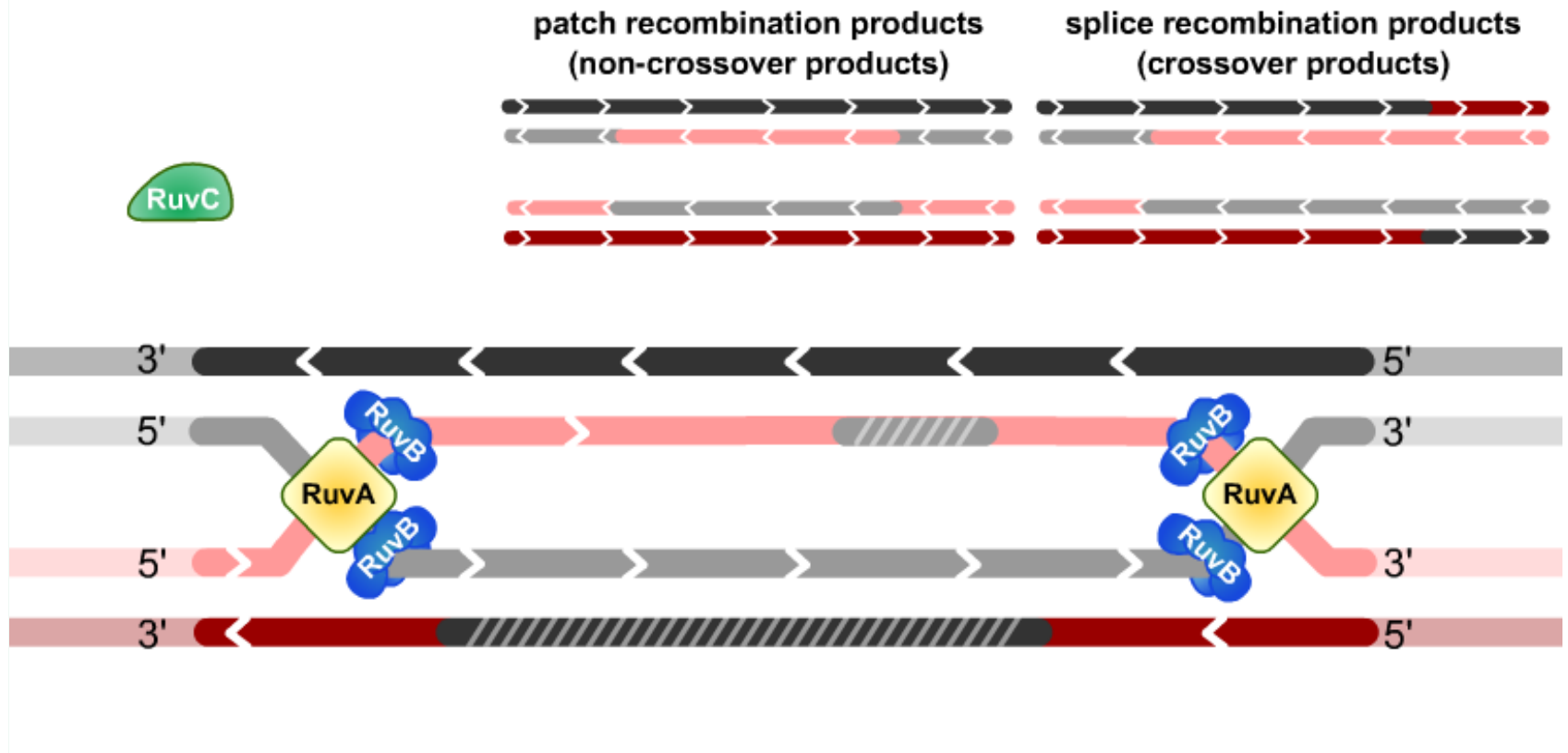
Risoluzione delle giunzioni di Holliday RuvABC



Homologous recombination is the exchange of similar DNA sequences between different DNA molecules. Cells use homologous recombination to introduce genetic variation, as well as to repair damaged DNA.

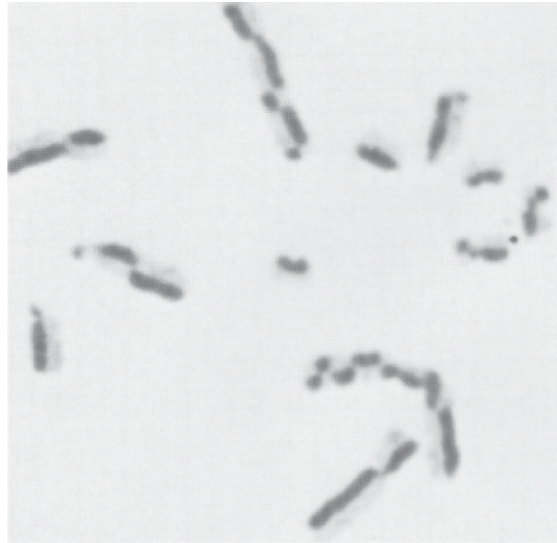
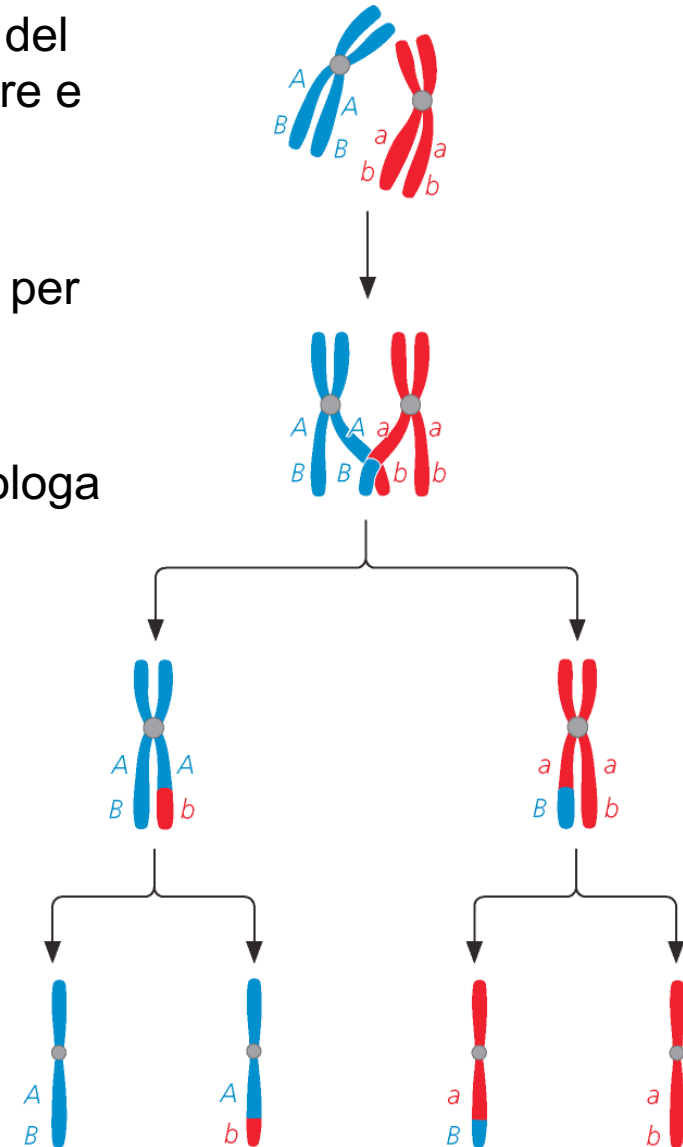
Risoluzione delle giunzioni di Holliday RuvABC

- ▶ RuvAB complex catalyzes branch migration
- ▶ RuvC catalyzes Holliday junction resolution



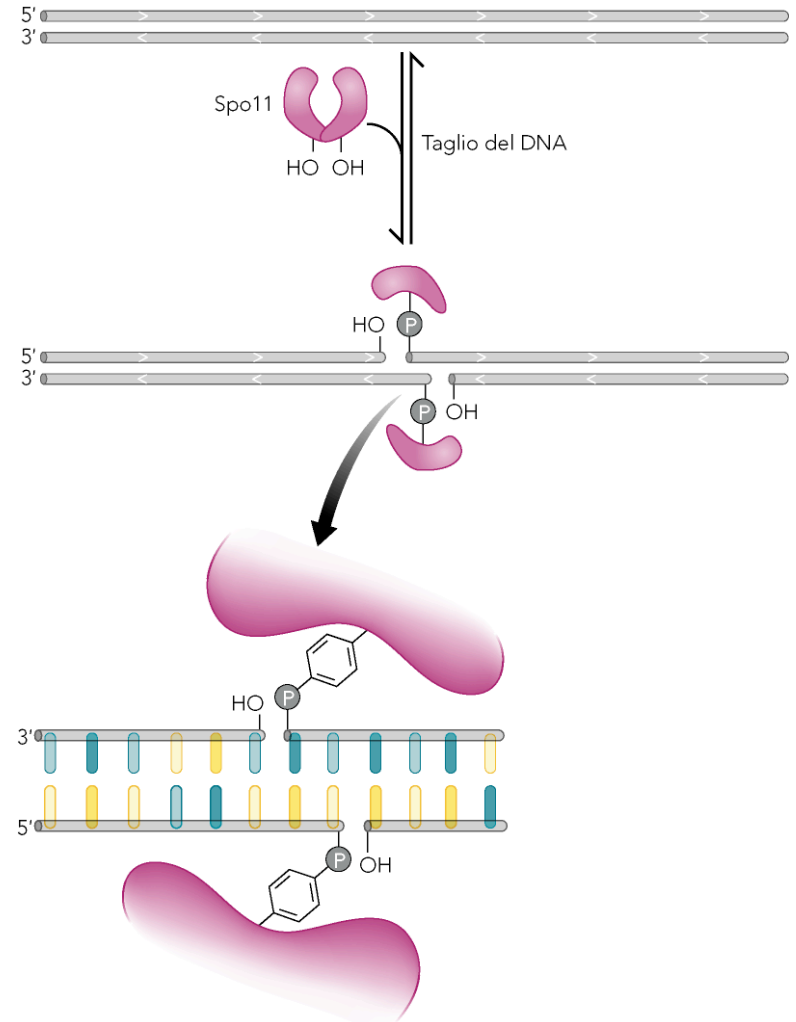
Negli eucarioti

- 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.

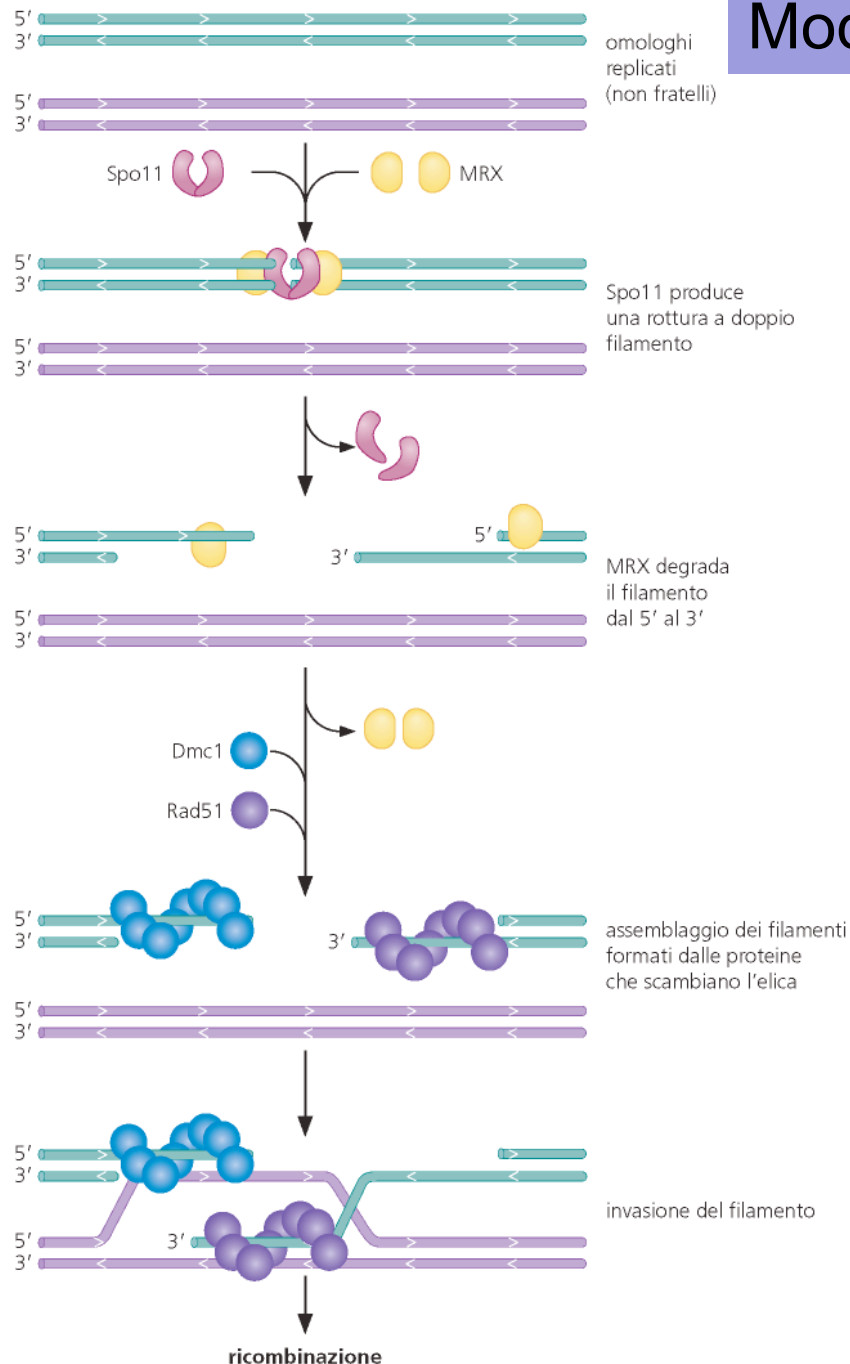


Ricombinazione meiotica: Spo11

- Spo11 inizia la ricombinazione meiotica producendo dei tagli del dsDNA quando i cromosomi si appaiano.
- Taglia in zone non associate a nucleosomi ed attive.



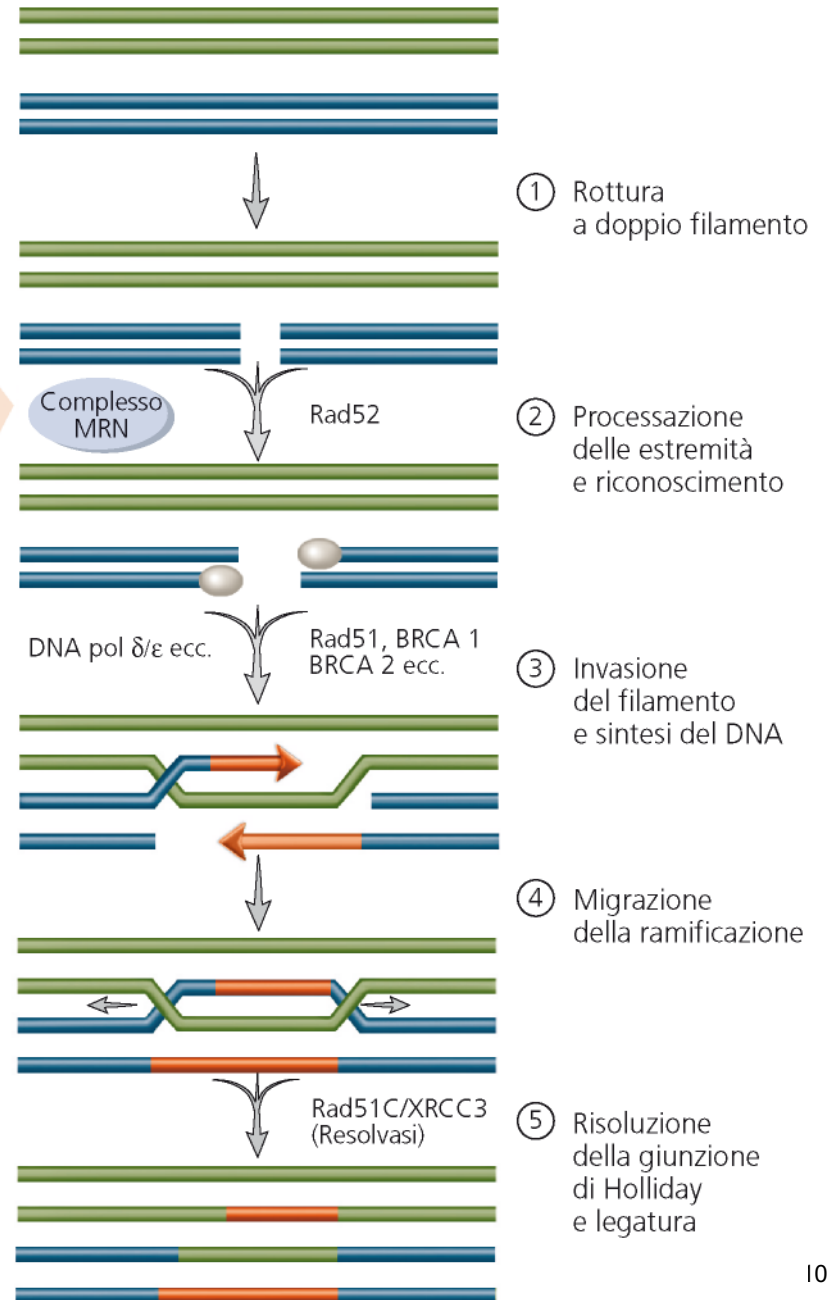
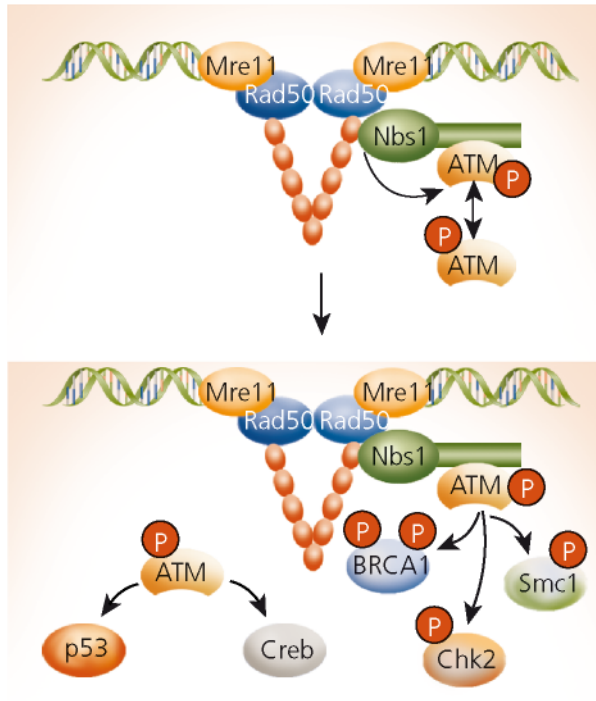
Modello per la ricombinazione meiotica



- **MRX (Mre11, Rad50 e Xrs2)** è un complesso con **attività esonucleasica**. Degrada i filamenti con estremità 5', attaccati da Spo11. Produce filamenti con estremità 3'.
- **Dmc1** e **Rad51** sono gli omologhi di **RecA**.
- **Dmc1** è espresso solo in cellule che vanno in **meiosi**, **Rad51** in **tutte**. La ricombinazione avviene tra cromatidi omologhi non-fratelli.
- Favorisce l'allineamento dei cromosomi per la divisione.

Geni RAD-> la loro attività è sensibile alle RADiazioni

Unione omologa – ricombinazione omologa



(Eucarioti)

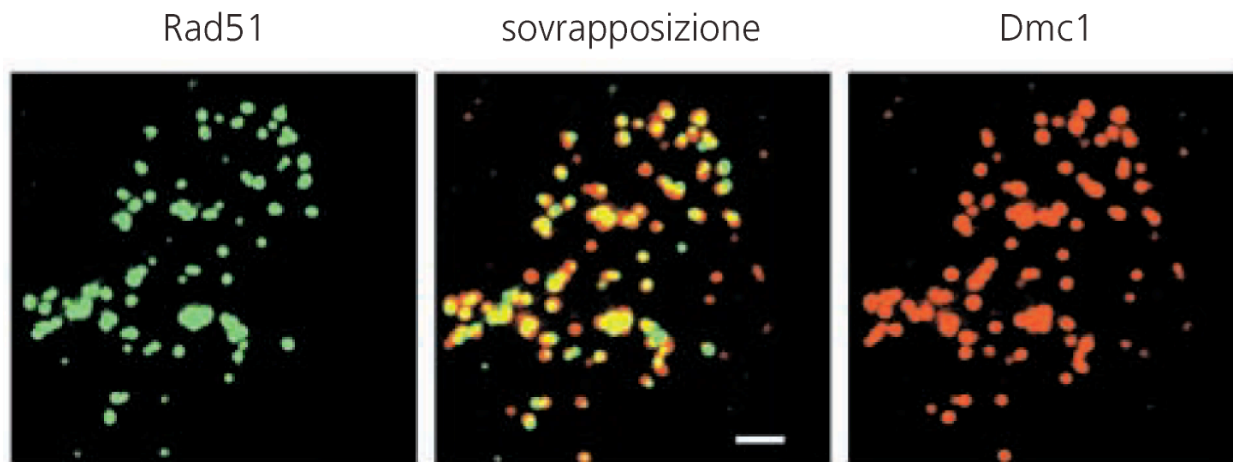
Il prodotto dell'oncosoppressore *BRCA2* interagisce con Rad51

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 alla mammella.

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



Video sulla ricombinazione omologa:

<https://www.youtube.com/watch?v=mCaFgwWH61o>

<https://www.youtube.com/watch?v=MvnWxN81Qps>

<https://www.youtube.com/watch?v=yhZIfTr-ZEs>

Ricombinazione omologa - DSB

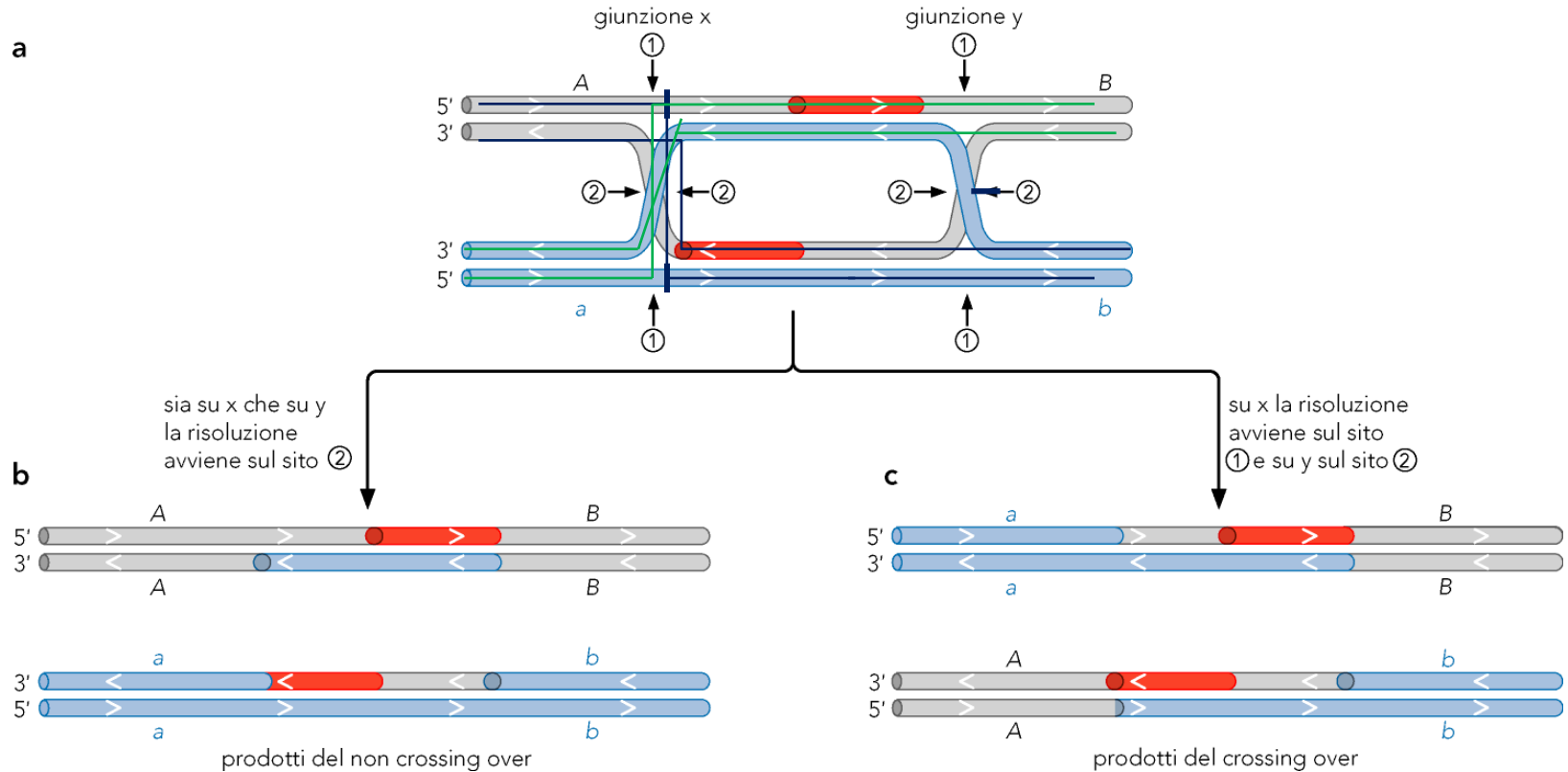
<https://www.youtube.com/watch?v=XRbqWcmgE8w>

My Zanichelli

Il modello di Holliday

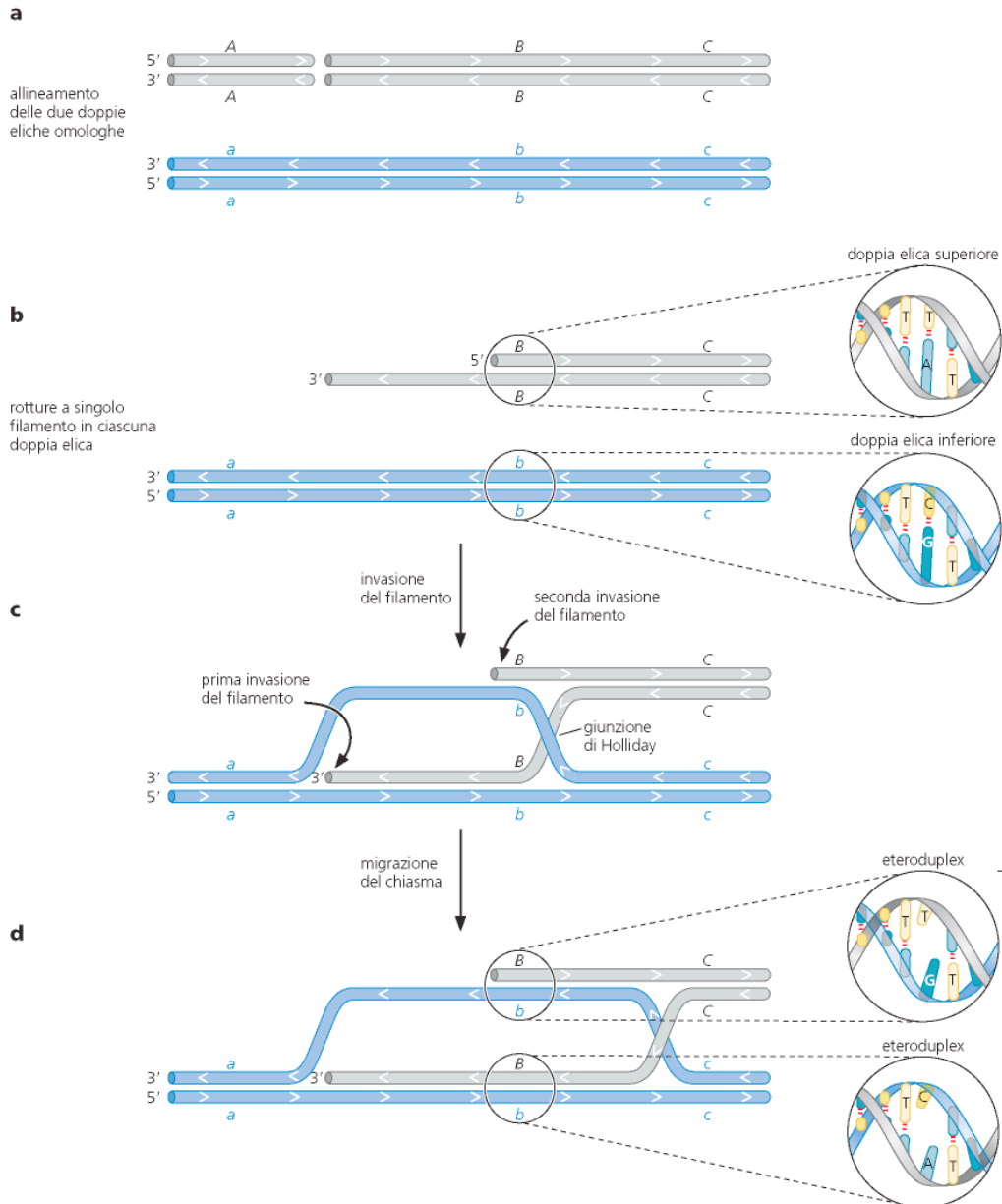
La ricombinazione omologa

Risoluzione della riparazione del DSB



- Se i tagli avvengono simmetricamente si risolve in un patch
- Se asimmetrici nella ricombinazione

Il modello di Holliday per la ricombinazione omologa



1. Allineamento di due molecole di DNA omologhe - uguali o quasi (alleli) - per almeno un centinaio di pb;
2. Introduzioni di rotture nel DNA;
3. Formazione di una corta regione di appaiamento tra le basi (**invasione del filamento**) -> DNA eteroduplex;
4. Formazione della giunzione di Holliday -> migrazione del chiasma
5. Taglio della giunzione -> risoluzione del chiasma