

RICOMBINAZIONE

Per ricombinazione si intende qualunque processo che generi un prodotto diverso dai genotipi parentali.

1. **RICOMBINAZIONE GENERALE O OMOLOGA:** Avviene di solito fra estese regioni di sequenze nucleotidiche omologhe;
2. **RICOMBINAZIONE SITO SPECIFICA:** I siti di rottura e riunione tra due molecole di DNA (o tra due segmenti della stessa molecola) sono compresi all'interno di specifiche regioni molto brevi (< 25 nucleotidi);
3. **RICOMBINAZIONE NON OMOLOGA:** Evento piuttosto raro che coinvolge sequenze nucleotidiche non omologhe. Es. Traslocazione cromosomica; Trasposizione integrazione casuale di DNA del fago λ le plasmidi in cellule eucariotiche.

RICOMBINAZIONE GENERALE O OMOLOGA



Avviene di solito fra estese regioni di sequenze nucleotidiche omologhe:

















1. Assortimento indipendente (3a legge di Mendel)
2. Conversione genica (emicromatidica o cromatidica)
3. Crossing-over
4. Crossing-over ineguale





La terza legge di Mendel, ovvero quella dell'assortimento indipendente, afferma che durante la formazione dei gameti la segregazione di una coppia di geni è indipendente dalle altre coppie.

Quindi dati due caratteri Aa e Bb avremo 16 fenotipi.

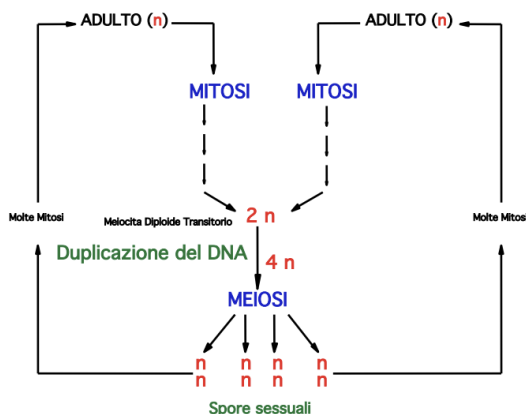
Un numero così limitato di cromosomi non giustifica la grande variabilità degli organismi. La grande variabilità degli organismi è data dal crossing-over che avviene durante la meiosi. Il meccanismo di ricombinazione del crossing-over è stato ipotizzato osservando la conversione genica degli aschi (che si osservano nei lieviti).

F₁  x 
AaBb AaBb

	AB	Ab	aB	ab
AB	 AABB	 AABb	 AaBB	 AaBb
Ab	 AABb	 AAbb	 AaBb	 Aabb
aB	 AaBB	 AaBb	 aaBB	 aaBb
ab	 AaBb	 Aabb	 aaBb	 aabb

F₂    
9/16 AB 3/16 Ab 3/16 aB 1/16 ab

CICLO VITALE DEI LIEVITI

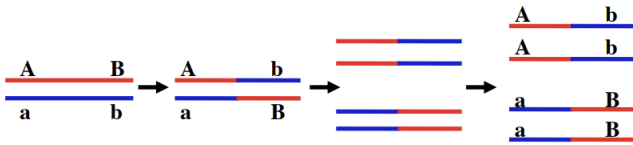


Gli aschi si osservano nel lievito. Il lievito che è un eucariote inferiore ha un ciclo vitale aploide, (quindi l'adulto del lievito è aploide) ma si distinguono nei lieviti due sessi α e α e quindi periodicamente due individui aploidi, appartenenti a due sessi differenti, si uniscono per dare quello che viene chiamato il diploide transitorio che di fatto va incontro alla meiosi. Quindi si ha una duplicazione e successivamente processo meiotico. L'unica differenza che c'è tra i lieviti e gli organismi superiori è che i quattro prodotti della meiosi si duplicano quindi avremo otto prodotti della meiosi a due a due uguali.

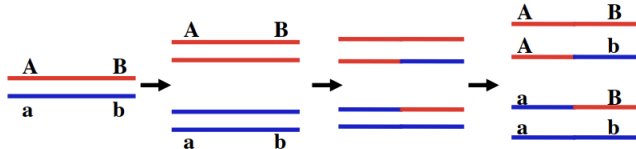
Il vantaggio di utilizzare gli aschi è che ci sono dei ceppi di lievito che organizzano la meiosi e i prodotti della meiosi proprio sotto forma di aschi. L'asco ha le cellule

disposte sequenzialmente all'interno della struttura e quindi è possibile definire il genotipo esatto di ciascun gamete che proviene da questo tipo di meiosi.

Stadio di due cromatidi

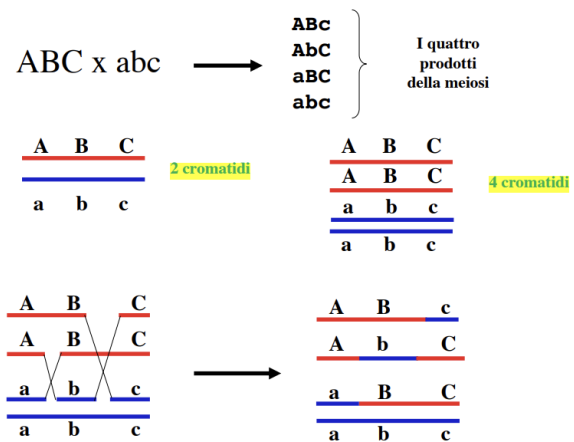


Stadio di quattro cromatidi



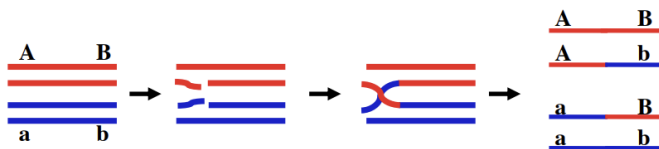
Quindi prendendo un individuo che sia ABC e incrociandolo con uno abc, riusciremo a individuare il genotipo degli aschi che, essendo aploide, pare uguale al fenotipo. Quindi se avremo due cromatidi i quattro prodotti della meiosi non sono possibili, sono invece possibili se abbiamo quattro cromatidi poiché, attraverso il crossing-over, è possibile spiegare questi prodotti della meiosi: Abc, AbC, aBC, abc.

Il crossing-over avviene durante la meiosi allo stadio di quattro cromatidi (non due). Se abbiamo due caratteri Aa e Bb e il crossing-over avvenisse allo stadio di due cromatidi i prodotti genici che incontreremo sarebbero comunque i prodotti della meiosi Ab e aB. Anche se consideriamo lo stadio di quattro cromatidi i prodotti di meiosi saranno gli stessi (Ab e aB). Quindi bisogna passare agli aschi e aumentare il numero di marcatori che andiamo ad osservare.

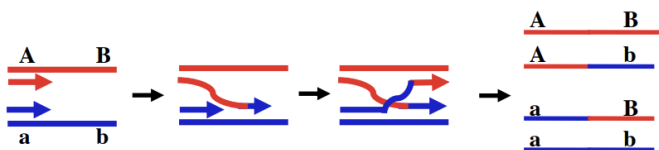


Una volta stabilito che il crossing-over avviene allo stadio di quattro cromatidi, bisogna stabilire se la ricombinazione avviene attraverso il meccanismo di "rottura e riunione" oppure di "scelta di copia". La ricombinazione avviene dopo la duplicazione del DNA e per stabilire se questa avviene mediante "rottura e riunione" o "scelta di copia" è stato fatto un esperimento simile a quello che fu utilizzato per dimostrare che la duplicazione del DNA era semiconservativa (ovvero il modello di Meselson e Stahl). Questo consisteva nell'avere fagi cresciuti in un terreno "pesante" (Azoto 15); successivamente questi, che avevano la doppia elica più pesante, infettavano una popolazione batterica che invece cresceva in un terreno leggero (Azoto 14). Quindi se la duplicazione del DNA avviene in maniera semiconservativa tutta la popolazione alla prima duplicazione deve avere una

ROTTURA E RIUNIONE



SCELTA DI COPIA



densità intermedia. Lo stesso tipo di esperimento è stato allestito per scegliere tra le due ipotesi "rottura e riunione" oppure "scelta di copia" perché durante l'infezione fagica, le particelle fagiche possono andare incontro a fenomeni di ricombinazione, quindi è possibile separare le eliche di DNA in base alla loro densità. Quindi, passate un certo numero di generazioni avremo il DNA leggero, il DNA intermedio e sul fondo avremo delle rare particelle fagiche che non hanno subito il processo di duplicazione. Queste particelle fagiche non duplicate, con una certa frequenza,

mostravano ricombinazione (nelle particelle pesanti che non avevano subito il processo della duplicazione si osservava un fenomeno di ricombinazione).

L'ipotesi più accreditata delle due fu quella di "rottura e riunione".

Il meccanismo del crossing-over è stato largamente studiato ma non è ancora totalmente conosciuto ed è più facilmente spiegabile con il cosiddetto **modello di Holliday**.

Esistono due diversi modelli di Holliday che spiegano la ricombinazione del DNA ma questi hanno dei passaggi in comune:

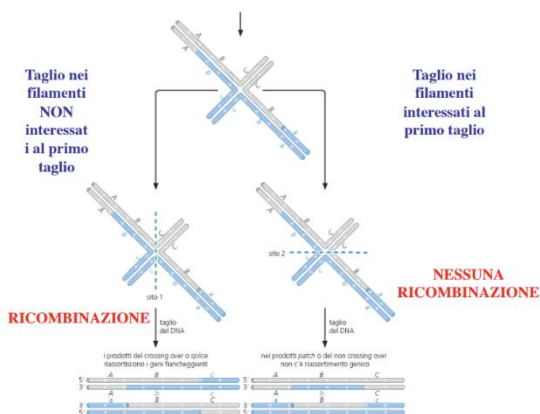
1. Allineamento di molecole di DNA omologhe;
2. Rotture del DNA e formazione di singolo filamento;
3. Invasione del filamento e formazione di DNA eteroduplex;
4. Formazione della giunzione di Holliday;
5. Migrazione del chiasma (branch migration);
6. Risoluzione della giunzione di Holliday.

I due meccanismi si differenziano perché alcuni ritengono che ci sia rottura in un solo filamento dei cromatidi interessati alla duplicazione, altri ritengono che la rottura sia su tutte e due le eliche del cromatide interessato alla ricombinazione.

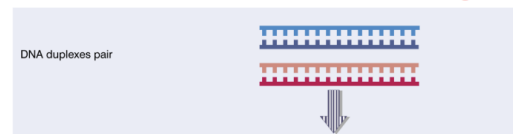
Nell'immagine vengono mostrati due cromatidi e le due eliche, queste ultime sono mostrate con due colori diversi (il primo azzurro/azzurrino e il secondo rosso/rosa per indicare i cromatidi).

Nel primo meccanismo dobbiamo avere quindi la rottura del DNA e formazione del singolo filamento; questo va a invadere il cromatide opposto (si scambia con l'altro cromatide) e si lega all'altro formando quella che è la giunzione di Holliday. Una volta formata la giunzione si ha la cosiddetta migrazione del chiasma che comporta lo scorrimento delle due eliche di DNA; poi abbiamo la saldatura di questo "buco" e a questo punto si forma la struttura di Holliday che però ha due cromatidi legati covalentemente tra di loro che bisogna separare. Per separare questi due cromatidi (avendo fatto ruotare la struttura) abbiamo due tipi di taglio: uno che riguarda i filamenti non interessati al taglio (il taglio viene fatto perpendicolarmente e si ha ricombinazione) e uno che riguarda i filamenti interessati al primo taglio (il taglio viene fatto parallelamente e non si ha ricombinazione pur avendo regioni ibride).

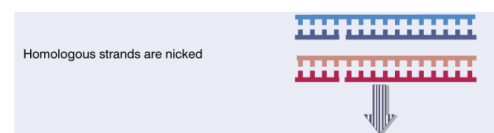
Un altro possibile meccanismo è quello che il taglio avvenga su entrambi i filamenti dei DNA. A questo punto bisogna creare il singolo filamento,



Allineamento di molecole di DNA omologhe



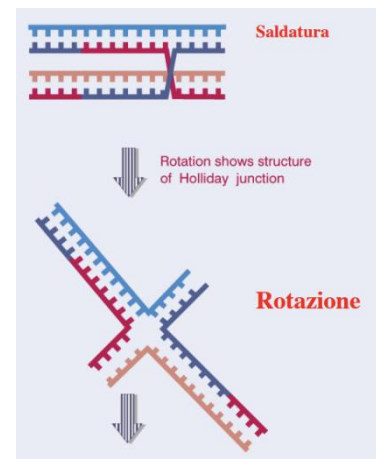
Rotture del DNA e formazione di singolo filamento



Invasione del filamento e formazione di DNA eteroduplex



Migrazione del chiasma (branch migration)



una volta prodotto questo singolo filamento, questo è in grado di invadere il cromatide opposto. Quindi avremo la formazione del chiasma o della struttura di Holliday, lo scorrimento di branca (branch migration) e ancora una volta, per risolvere il chiasma, si ha la possibilità di due tagli.

In questa immagine nella parte in rosso abbiamo la Guanina (G) che normalmente si dovrebbe appaiare con la Citosina (C) ma questo scorrimento di branca ha portato l'altro allele ad appaiarsi e quindi avremo un errore (una differenza fra GT-CA). Tutte queste differenze di accoppiamento la cellula le riconosce e le ripara, quindi questi appaiamenti errati vengono sottoposti ai meccanismi di riparazione del DNA e avremo quella che viene chiamata **CONVERSIONE CROMATIDICA** o **CONVERSIONE**

EMICROMATIDICA. Quindi possiamo avere che la G la correggiamo in C (e questo era l'originale), nell'altro l'originale che era la A avremmo dovuto

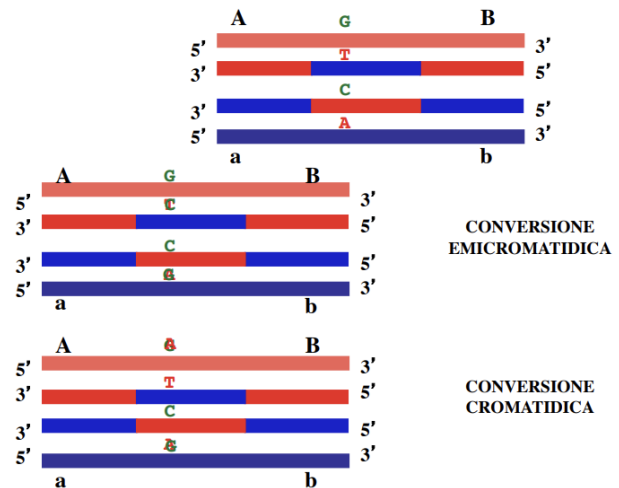
convertirla in T, invece in questo caso la C è stata convertita in G (uno solo dei cromatidi viene convertito e si parla di conversione emicromatidica). Nel caso in cui entrambi i cromatidi cambiano i nucleotidi di partenza, quindi quella che era un G rimane T e quindi avremo la A, e quella che era una A prende per buona una C e avremo la G (questo è il caso della conversione cromatidica).

Riassumendo quindi: quando vengono riparate le due eliche se una ritorna come era originariamente e l'altra no avremo la conversione emicromatidica, se invece entrambi subiscono un processo di riparazione che di fatto li porta sull'altro gene avremo la conversione cromatidica.

Questi processi di crossing-over sono processi piuttosto complicati nella cellula e hanno bisogno di proteine, enzimi e siti di riconoscimento che possano effettuare questi meccanismi di ricombinazione.

Negli eucarioti inferiori sono note tre proteine appartenenti al sistema delle Rec (B,C,D) che intervengono in tutti quei sistemi che servono in qualche modo a tagliare il DNA. Ciascuna di queste Rec ha un'attività enzimatica diversa: la Rec B è un'elicasi poiché bisogna far scorrere e aprire la doppia elica, la Rec D ha funzione sia di elicasi che di nucleasi.

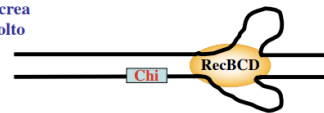
RecBCD si legano all'estremità del DNA e mentre si muove RecBCD crea due anse di DNA non avvolto. Arrivato nella regione *Chi* Rec C riconosce il sito (*Chi*), un filamento viene tagliato nelle vicinanze di *Chi* e avviene la formazione del singolo filamento. A questo punto la proteina Rec A si lega insieme alle ss DNA binding protein per iniziare lo scambio del filamento del DNA con un altro DNA. Questo è il meccanismo con cui avviene lo scambio ma c'è anche un meccanismo che deve risolvere le giunzioni di Holliday. In questo caso intervengono delle proteine, un complesso proteico che è dato da RuvA e RuvB dove: RuvA riconosce e lega le giunzioni di Holliday, invece RuvB ha funzione ATPasica e promuove la migrazione di branca. Dopodiché interviene RuvC che taglia specifici filamenti di DNA a livello delle giunzioni di Holliday.



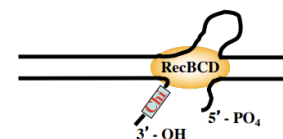
RecBCD si legano all'estremità del DNA (B elicasi D elicasi e nucleasi)



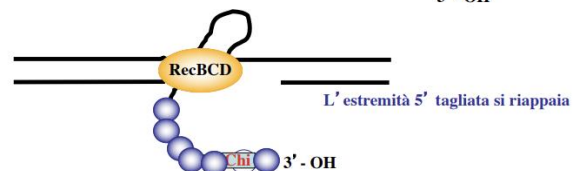
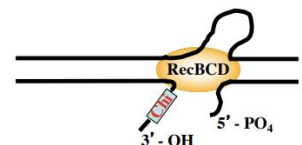
Mentre si muove RecBCD crea due anse di DNA non avvolto



Rec C riconosce il sito Chi. Un filamento viene tagliato nelle vicinanze di Chi



Rec C riconosce il sito Chi. Un filamento viene tagliato nelle vicinanze di Chi



La proteina RecA si lega insieme alle ssDNA binding protein per iniziare lo scambio del filamento del DNA con un altro DNA

Questo meccanismo è anche studiato negli eucarioti superiori ma tutti i passaggi sono solo parzialmente noti.

In questa immagine sono evidenziate le differenze tra gli enzimi in E.Coli e negli eucarioti.

Passaggio ricombinativo	Enzimi E. coli	Enzimi eucarioti
Introduzione di un DSB	nessun fattore	Spo11 (in meiosi)
Processamento delle rotture del DNA per produrre estremità a singolo filamento per l'invasione	Elicasi/nucleasi RecBCD	Proteina MRX (chiamata anche Rad50/58/60)
Assemblaggio delle proteine per lo scambio di filamenti	Elicasi/nucleasi RecBCD	Rad52 e Rad59
Appaiamento delle molecole omologhe ed invasione del filamento	RecA	Rad51 Dcm1 (in meiosi)
Riconoscimento della giunzione di Holliday e migrazione di chiasma	RuvAB	Ignoti
Risoluzione della giunzione di Holliday	RuvC	Forse il complesso Rad51c-XRCC3 e altri

RICOMBINAZIONE SITO SPECIFICA

La ricombinazione sito specifica avviene quando i siti di rottura e riunione tra due molecole di DNA (o tra due segmenti della stessa molecola) sono compresi all'interno di specifiche regioni molto brevi (< 25 nucleotidi):

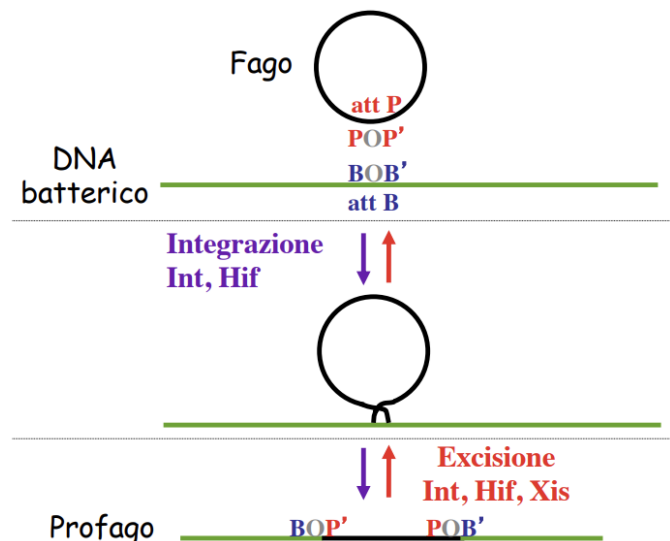
1. Entrambi i partner presentano le brevi sequenze specifiche: es. Processi di excisione e integrazione tra il fago λ e E. coli
2. Solo un partner presenta le brevi sequenze specifiche: es. Trasposizione

Nel primo caso entrambi i partner devono avere specifiche sequenze che devono essere uguali fra di loro. Avendo il DNA del fago e il DNA batterico, la regione centrale (segnata con O) deve essere uguale. Possiamo avere quindi un processo di integrazione con l'utilizzo di proteine Int e Hif e avere l'integrazione del virus all'interno del genoma del batterio ottenendo quello che viene chiamato il Profago. Questo può essere anche allontanato (exciso) attraverso un processo di Excisione con l'utilizzo delle proteine Int, Hif e Xis.

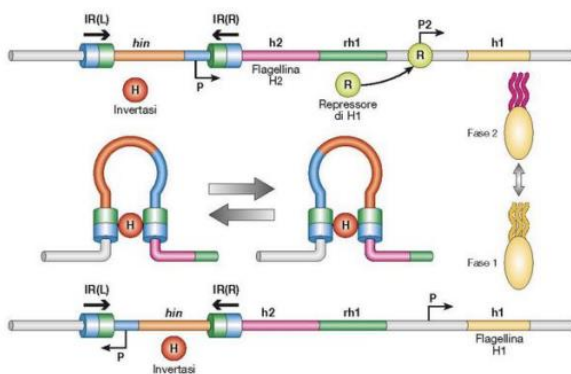
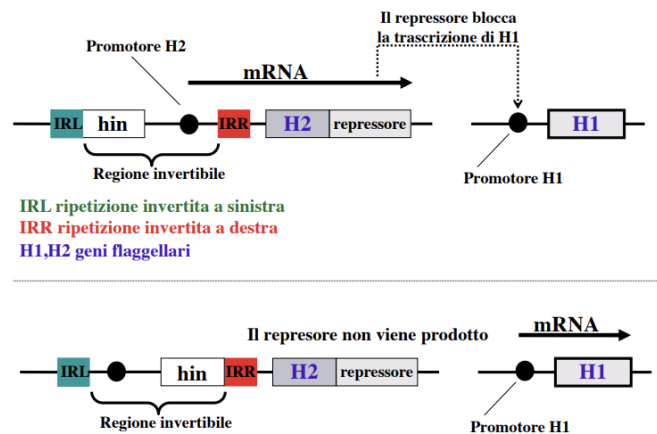
Quindi quando le sequenze sono, rispetto al frammento che stiamo considerando, invertite abbiamo il capovolgimento del frammento ma non la sua rimozione; quando le sequenze sono dirette abbiamo l'Excisione.

Questo fenomeno avviene in alcuni organismi inferiori per controllare l'espressione di alcuni geni. Per esempio questo fenomeno di inversione dei frammenti è noto nella Salmonella.

Nella Salmonella abbiamo un'organizzazione genica di questo tipo: una regione del DNA che è compresa fra due sequenze ripetute e invertite (quindi posizionate in maniera opposta) e all'interno di questa regione il promotore di uno dei geni flagellari H2.



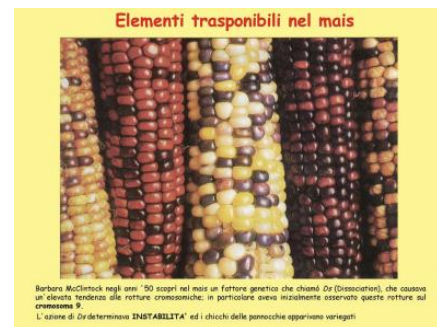
In questi organismi inferiori si può avere la trascrizione e traduzione di più geni contemporaneamente controllati dallo stesso promotore. In questo caso abbiamo la trascrizione del gene flagellare H2 e di un repressore che è il repressore di un altro gene flagellare H1, quindi quando il promotore è in questa posizione abbiamo l'espressione H2 ma la repressione del gene flagellare H1. Durante il ciclo di infezione questa regione subisce il processo dell'inversione e quindi il promotore che prima trascriveva per H2, si trova troppo lontano (perché i promotori devono avere delle regioni vicine rispetto al gene che trascrivono) e quindi non viene più trascritto H2, viene rimossa la repressione su H1 e si ha l'espressione del gene flagellare H1. Questo è il meccanismo con cui la Salmonella riesce poi a sopravvivere negli organismi, perché cambia il suo gene flagellare.



Riepilogando: nella prima fase del ciclo abbiamo l'espressione dei geni flagellari H2, quando si ha l'inversione del promotore abbiamo l'espressione dei geni flagellari H1 e quindi in questo modo si sottrae la risposta immunitaria dell'organismo perché cambiano i geni che vengono riconosciuti.

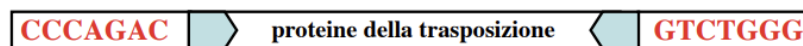
TRASPOSIZIONE

Un altro fenomeno che avviene anche negli organismi superiori è la cosiddetta **Trasposizione**. I Trasposoni sono elementi mobili del genoma degli eucarioti scoperti per la prima volta nel mais (la trasposizione determina i chicchi di diverso colore).

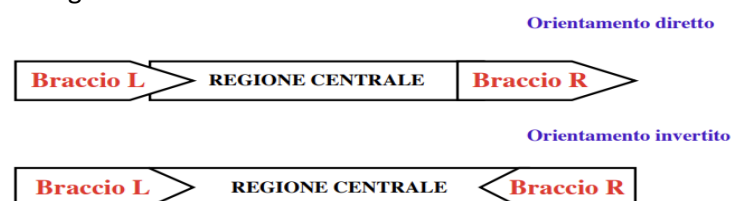


I trasposoni hanno delle regioni particolari e li distinguiamo in:

- **TRASPOSONI SEMPLICI:** che hanno delle sequenze di inserimento IS. Essi inattivano i geni in cui si inseriscono e attivano geni adiacenti ai loro promotori terminali.



- **TRASPOSONI COMPLESSI:** che portano altri marcatori oltre a quelli necessari alla trasposizione, ad esempio: Resistenza agli antibiotici.



I bracci L ed R sono sequenze di tipo IS che possono essere uguali o correlate fra loro

Nel caso dei trasposoni complessi abbiamo due regioni (rispetto alla regione centrale), ovvero i bracci sinistro e destro che possono essere diretti e quindi avere la stessa sequenza oppure invertiti. In ogni caso questi bracci costituiscono degli elementi di trasposizione semplice.

Quindi i bracci di destra e sinistra hanno il modulo di inserzione che è uguale a quello del trasposoma semplice, le due sequenze ripetute e invertite e dentro le proteine della trasposizione (pur avendo i due bracci di diverso orientamento o diretto o invertito).

CARATTERISTICHE COMUNI AI TRASPOSONI:

- Presentano sequenze ripetute e invertite all'estremità;
- Generano duplicazione del sito bersaglio.

ALTRE CARATTERISTICHE DEI TRASPOSONI:

- Tutti codificano per la trasposasi: la frequenza di trasposizione è bassa perché la trasposasi è codificata in ragione di 1 proteina ogni 107 generazioni;
- Alcuni codificano per la resolvasi: i trasposoni non si spostano completamente a caso ma preferiscono l'invasione di alcune sequenze di DNA;
- Il meccanismo di trasposizione può essere di tipo semplice o complesso.

-Trasposizione non replicativa: al termine della quale il donatore perde il trasposone

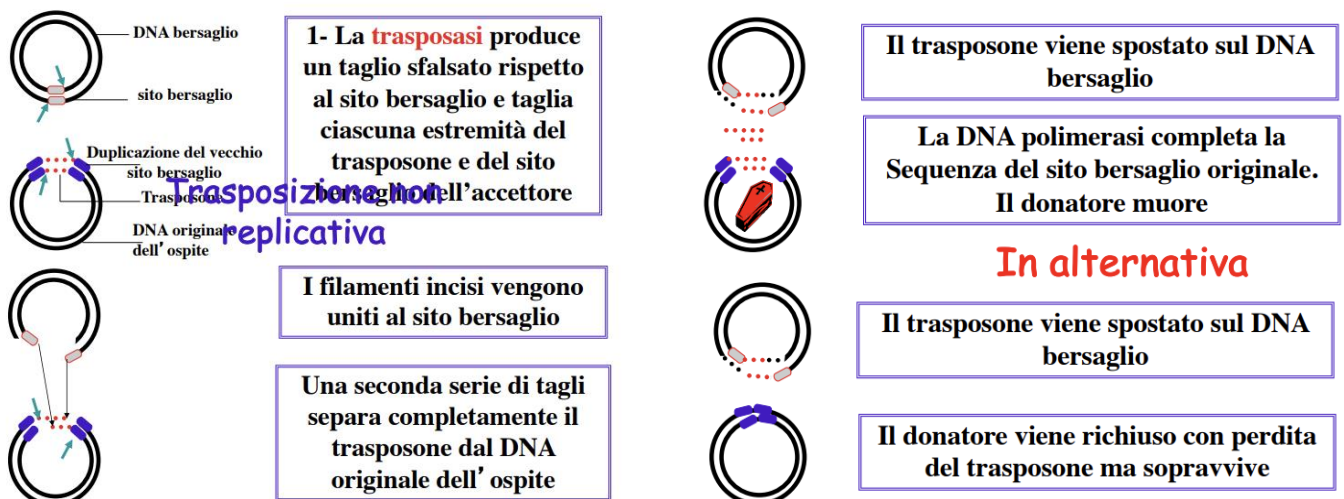
-Trasposizione replicativa: al termine della quale il trasposone viene duplicato

Nella TRASPOSIZIONE NON REPLICATIVA:

1. La trasposasi produce un taglio sfalsato rispetto al sito bersaglio e taglia ciascuna estremità del trasposone e del sito bersaglio dell'accettore;
2. I filamenti incisi vengono uniti al sito bersaglio;
3. Una seconda serie di tagli separa completamente il trasposone dal DNA originale dell'ospite;
4. Il trasposone viene spostato sul DNA bersaglio;
5. La DNA polimerasi completa la Sequenza del sito bersaglio originale. Il donatore muore.

In alternativa:

- Il trasposone viene spostato sul DNA bersaglio.
- Il donatore viene richiuso con perdita del trasposone ma sopravvive



Nella **TRASPOSIZIONE REPLICATIVA**:

1. La trasposasi produce un taglio sfalsato rispetto al sito bersaglio e taglia ciascuna estremità del trasposone e del sito bersaglio dell'accettore;
2. I filamenti incisi vengono uniti al sito bersaglio;
3. La DNA polimerasi inizia a copiare ciascun filamento del trasposone iniziando dalle estremità tagliate del DNA bersaglio;
4. La DNA polimerasi copia anche il trasposone determinando la formazione di un COINTEGRATO;
5. La Resolvasi divide il cointegrato per ricombinazione tra i siti posti sulle due copie del trasposone.

