

Genetica Molecolare

Anno accademico 2019/2020

Lezione 10

Ricombinazione omologa

Il primo evento che si verifica alla rottura della doppia elica di DNA è il reclutamento di proteine all'estremità della rottura, tra cui delle nucleasi che effettuano una degradazione nucleolitica, o resection, del filamento in direzione 5'3'.

La ricombinazione omologa necessita del processo di resection per ottenere ssDNA 3' protruding, che serve per innescare il processo di ricombinazione omologa. Questa prima fase distingue HR da NHEJ.

Il processo di ricombinazione omologa presenta due meccanismi fondamentali:

- Il processo di ricombinazione omologa classico
- Il processo SDSA, synthesis dependent strand annealing

Ricombinazione omologa

Il ssDNA 3' protruding che si è generato ad una estremità in seguito alla resection, invade la doppia elica omologa, che è intatta. La doppia elica omologa può essere un cromosoma omologo o un cromatide fratello.

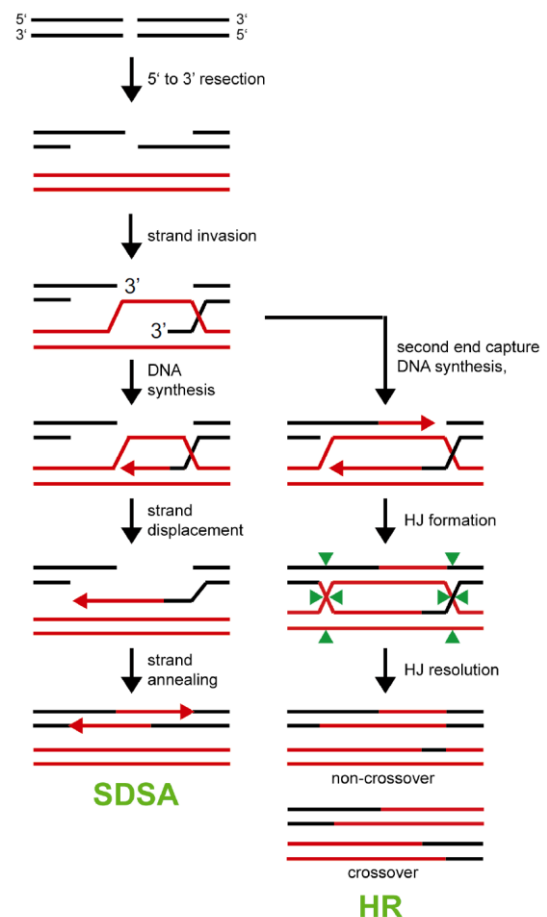
L'invasione dell'estremità 3' protruding sull'elica omologa dà luogo ad una bolla nella doppia elica invasa, e si ha l'appaiamento tra la regione protruding e la sequenza complementare nella doppia elica omologa, in un processo che si chiama **strand invasion**, o invasione dell'elica.

Si innesca quindi un secondo evento, che prende il nome di **second end capture**, dove anche la seconda estremità 3' protruding dall'altra parte del sito di rottura si appaia al filamento complementare scalzato durante la strand invasion.

A questo punto, con entrambe le estremità appaiate alle sequenze complementari sul cromosoma omologo, si ha la sintesi del DNA a partire dall'estremità 3' libera, dove la DNA polimerasi usa il filamento omologo come stampo per allungare l'estremità 3' protruding.

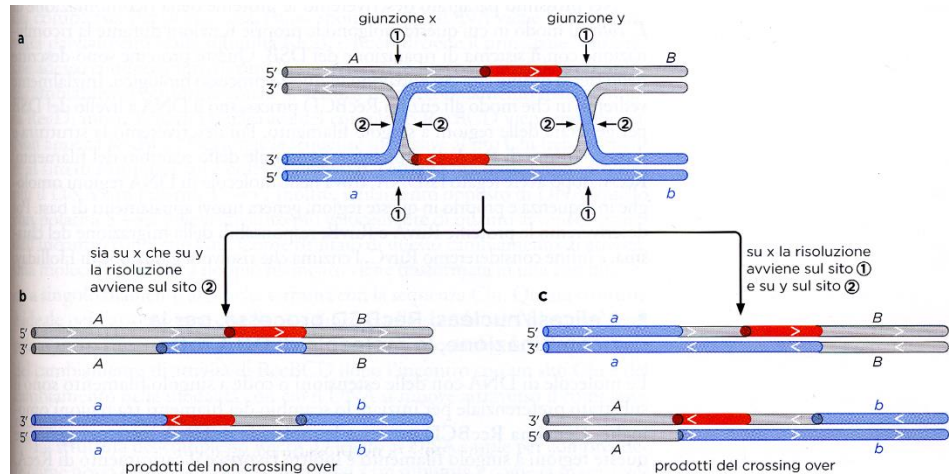
L'allungamento prosegue fino a che non si ha la ricongiunzione di ogni segmento neosintetizzato con l'estremità opposta del sito di rottura della doppia elica.

Si formano qui le due giunzioni di Holliday, che devono essere tagliate. Il taglio è effettuato da enzimi



specifici, le **resolvasi**, che tagliano la giunzione di Holliday in due modi, a dare prodotti di crossover o di non-crossover.

Le resolvasi possono tagliare le giunzioni di Holliday in più punti, e dai siti di taglio dipende il prodotto che si ottiene. Se i tagli sono entrambi verticali (punti 1) o entrambi orizzontali (punti 2), si avranno prodotti di non-crossingover. Se i tagli sono invece uno in orizzontale ed uno verticale (punti 2 da un lato e punti 1 dall'altro lato) si generano i prodotti di crossover.



Nei prodotti di non-crossover non si ha scambio di materiale genetico tra i due cromosomi omologhi, tranne nella regione della rottura.

Nei prodotti di crossover invece si ha scambio di materiale genetico tra i due cromosomi omologhi.

Synthesis Dependent Strand Annealing

Nella Synthesis Dependent Strand Annealing, o SDSA, in seguito alla rottura della doppia elica si ha sempre la resection in direzione 5'3', con generazione di estremità 3' protruding. Anche qui una delle estremità 3' protruding invade la doppia elica del cromosoma omologo, e funge da primer per la polimerasi, che allunga l'estremità 3' libera. Nella SDSA non c'è la second end capture della HR classica.

L'estremità di DNA neosintetizzata dalla polimerasi si separa dallo stampo e si appaia alla estremità 3' protruding del lato opposto al sito del DSBs. Si ha quindi sintesi del DNA che inizia dalla estremità 3' protruding opposto, che ha come stampo il segmento neosintetizzato sul cromosoma omologo. Infine si ha ligazione da parte della ligasi. Questo meccanismo ripara la rottura della doppia elica senza scambio di DNA.

Ciò che detta la scelta tra i meccanismi di HR classica e di SDSA è la stabilità della struttura che si genera dopo lo strand invasion. Se la struttura è stabile viene catturata anche la second end e si ha HR classica, altrimenti si ha SDSA.

Il processo di HR classica vede la presenza di giunzioni di Holliday e l'intervento di resolvasi, mentre la SDSA non le prevede.

Le cellule in mitosi che subiscono una rottura della doppia elica usano preferenzialmente il meccanismo SDSA.