

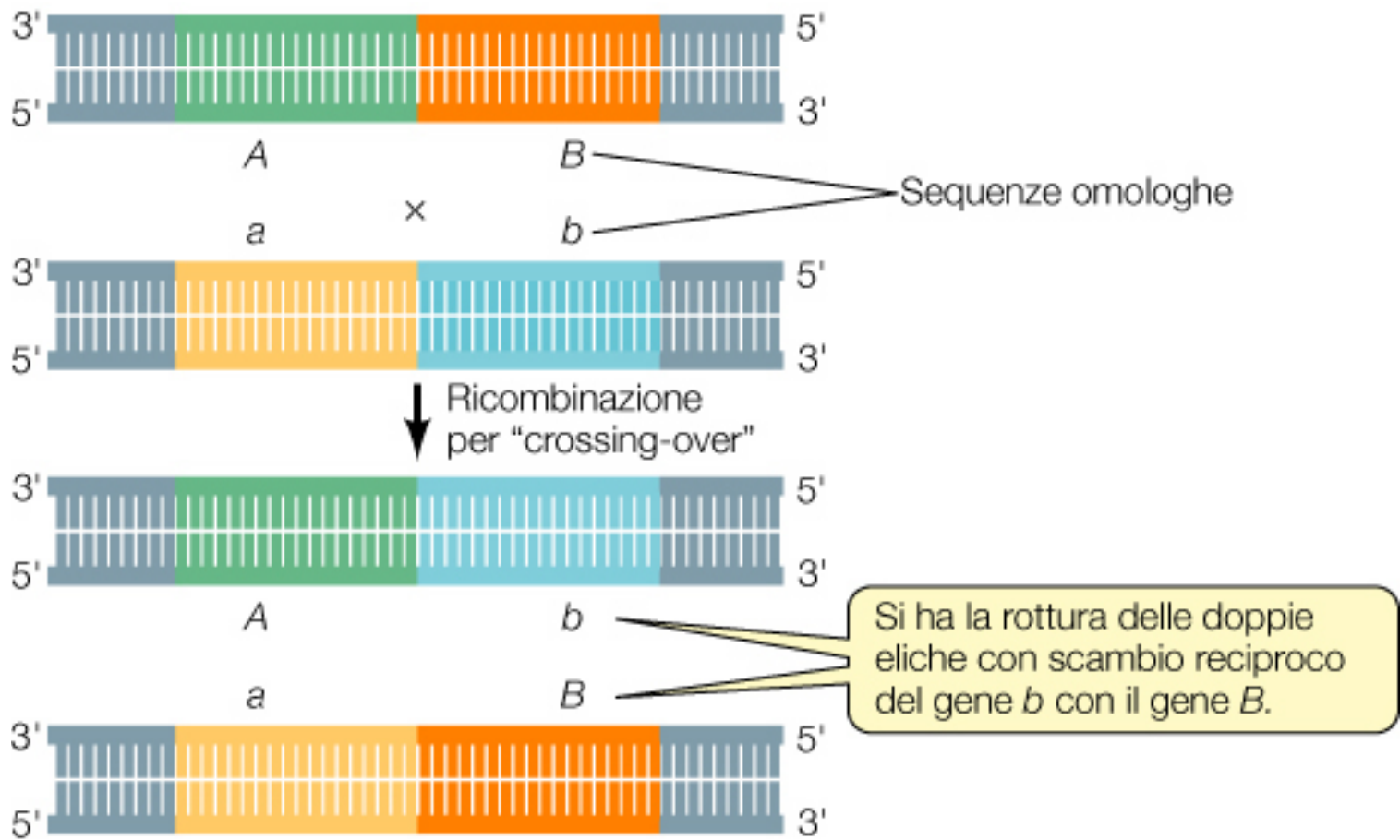
LA RICOMBINAZIONE OMOLOGA

Il processo di ricombinazione omologa consiste nello scambio di sequenze di DNA tra molecole che contengono sequenze identiche o quasi.

La regione in comune viene definita regione di *OMOLOGIA* da un minimo di 100 bp a tutto il cromosoma

Piu grande è la regione di omologia più elevata sarà la frequenza di ricombinazione tra due sequenze.

Ricombinazione omologa : avviene tra sequenze che condividono ampie regioni di omologia



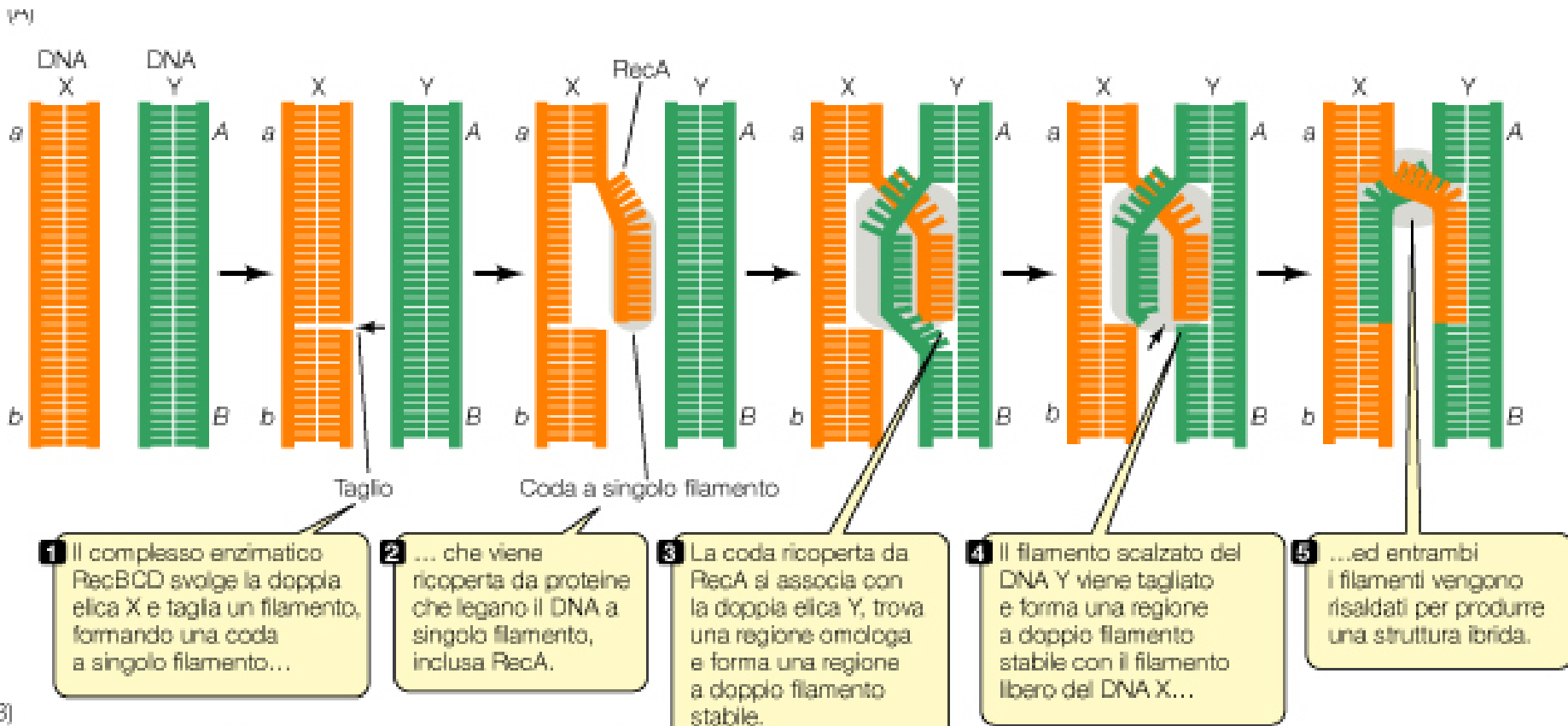
Requisiti necessari perché possa avvenire ricombinazione omologa

- vi siano regioni di DNA omologo (da 30 bp a 1-2 kb)
- che si possano formare legami idrogeno tra le basi di un'elica di una molecola di DNA e le basi sull'elica complementare di un'altra molecola
- che vi siano nella cellula le proteine di ricombinazione

Classi principali di proteine coinvolte nella ricombinazione:

- Proteine che permettano alle due sequenze omologhe di congiungersi
- Enzimi in grado di tagliare i legami fosfodiesterici (eso o endo-nucleasi)
- Enzimi in grado di rilegare i legami fosfodiesterici (ligasi)

La ricombinazione omologa necessita la proteina RecA ed il complesso RecBCD



Le proteine di ricombinazione comprendono

- Proteine che facilitano il legame tra le due eliche
- Enzimi che tagliano i legami fosfodiesterici eso-ed endo nucleasi
- Proteine che portano avanti il processo di ricombinazione

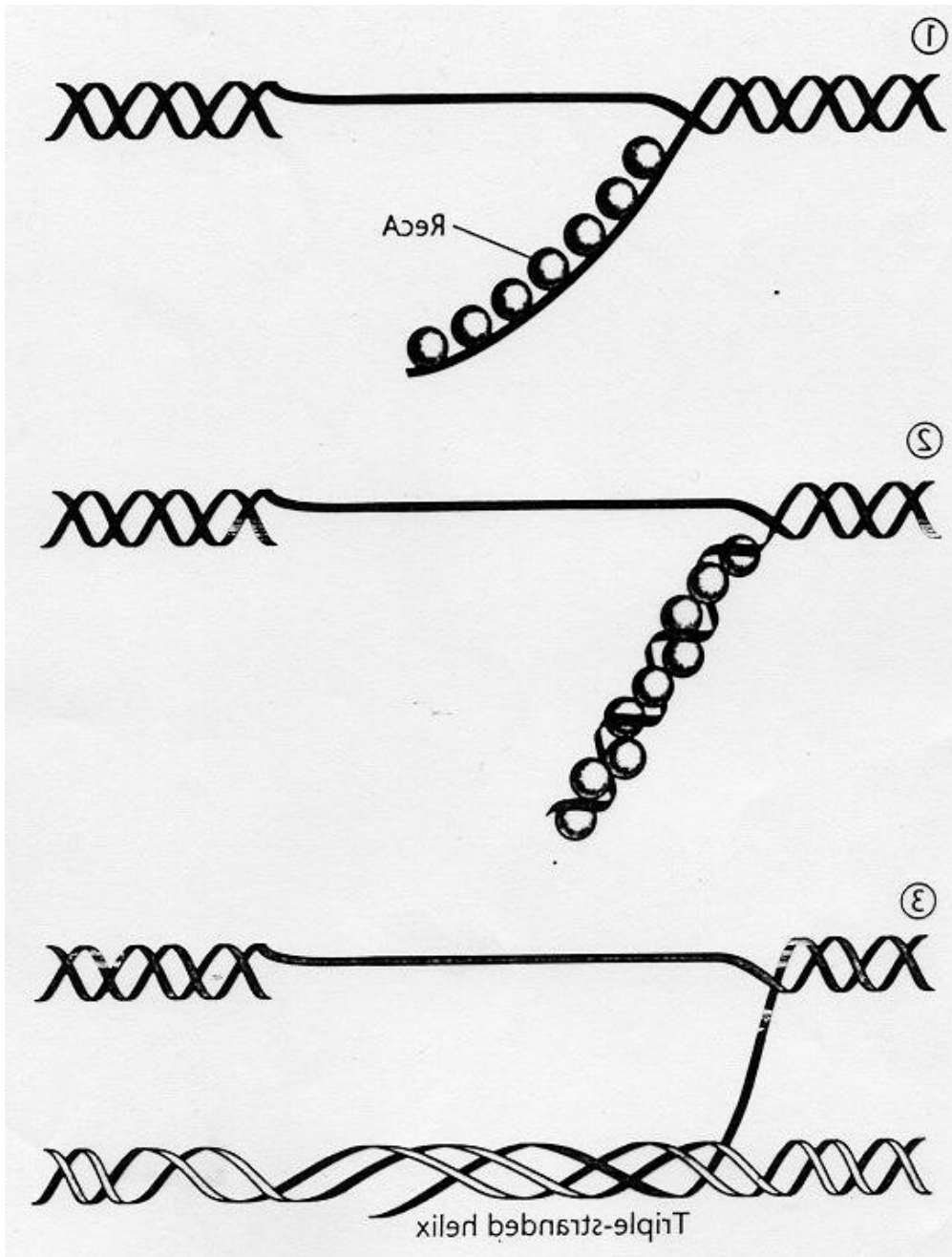
Isolando mutanti difettivi nella ricombinazione si è identificata

Proteina RecA

RecA si lega al DNA a ss in presenza di ATP
si lega ogni 5 bp

RecA è una ATPase DNA dependente in grado di idrolizzare ATP in presenza di DNA

Un complesso RecA-ssDNA può legarsi e svolgere (rompendo legami idrogeno) un'altra molecola di DNA ds promuovendo l'appaiamento dei nucleotidi nel ssDNA con le basi nel filamento complementare di ds DNA.



RecA si lega al DNA a singolo filamento formando un complesso RecA-ssDNA che può invadere una molecola di DNA a doppia elica formando il complesso

ssDNA-RecA-dsDNA

Il complesso che si viene a formare costituito da
ssDNA-RecA-dsDNA

stimola ulteriormente lo svolgimento del dsDNA in modo
che un numero maggiore di nucleotidi del ssDNA si
possano impegnare nell'appaiamento con le basi dell'elica
complementare all'interno del dsDNA

Proteine SSB (**S**ingle **S**trand **B**inding protein) cooperano
con RecA nel proteggere il DNA SS dalla degradazione

RecA è una proteina fondamentale nel processo di ricombinazione omologa. Ceppi *recA* difettivi hanno un'efficienza di ricombinazione ridotta di circa 1000 volte.

RecA ha omologhi in tutte le specie batteriche

RecA necessita DNA SS per iniziare il processo di appaiamento

Chi crea molecole di DNA SS?

Per questo è necessario il complesso costituito dalle proteine

RecB - RecC - RecD

Il Complesso RecBCD è un complesso multifunzionale

- dotato di attività nuclesica su DNA ss e ds
- dotato di attività elicasica
- dotato di attività ATPasica (idrolizza ATP)

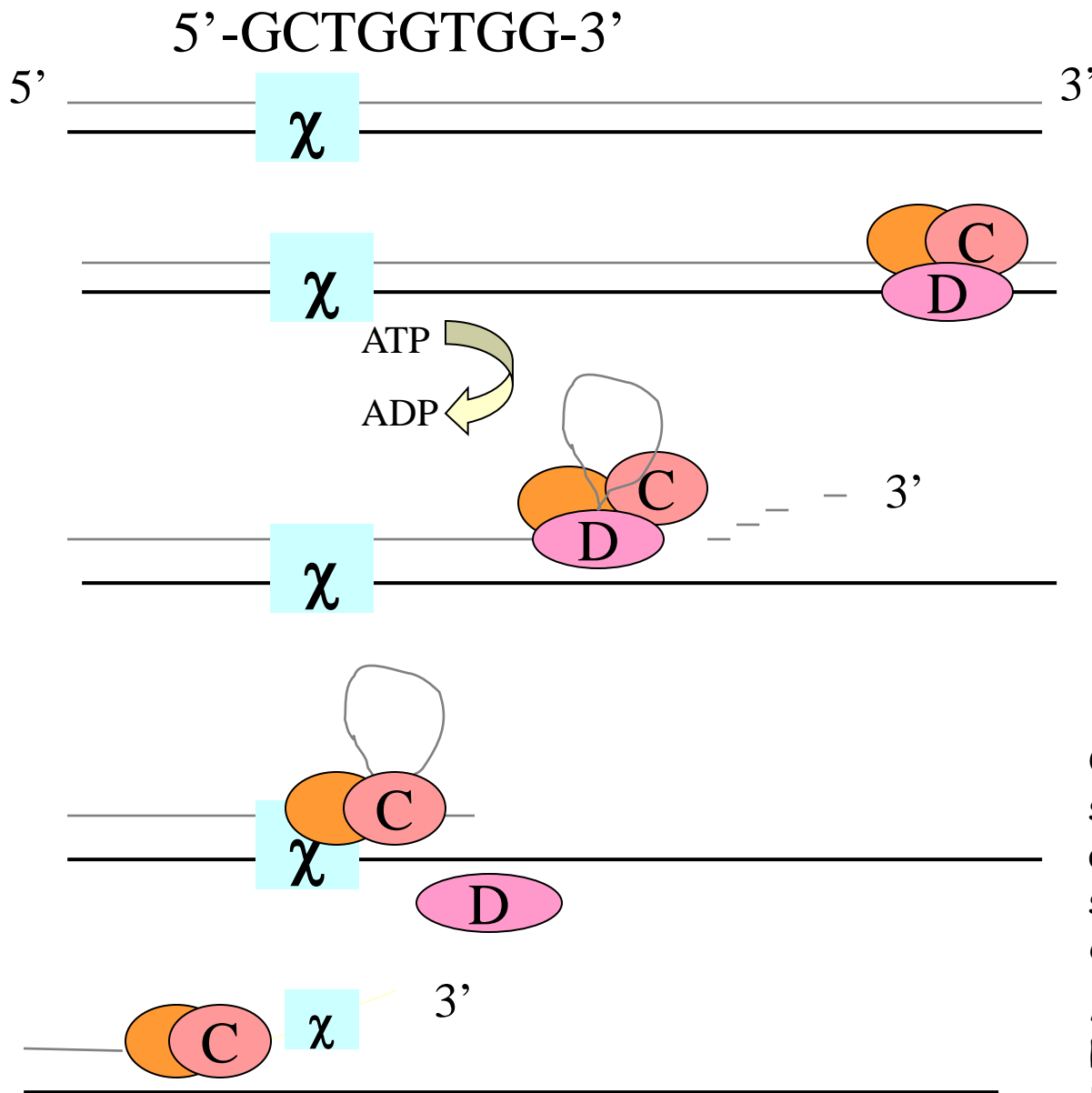
Le sequenze Chi(χ)

E.coli contiene un numero molto elevato di sequenze chi(χ)

Sequenza specifica di basi (5'-GCTGGTGG-3')

Nel cromosoma di *E.coli* è presente

una sequenza Chi circa ogni 5 kb

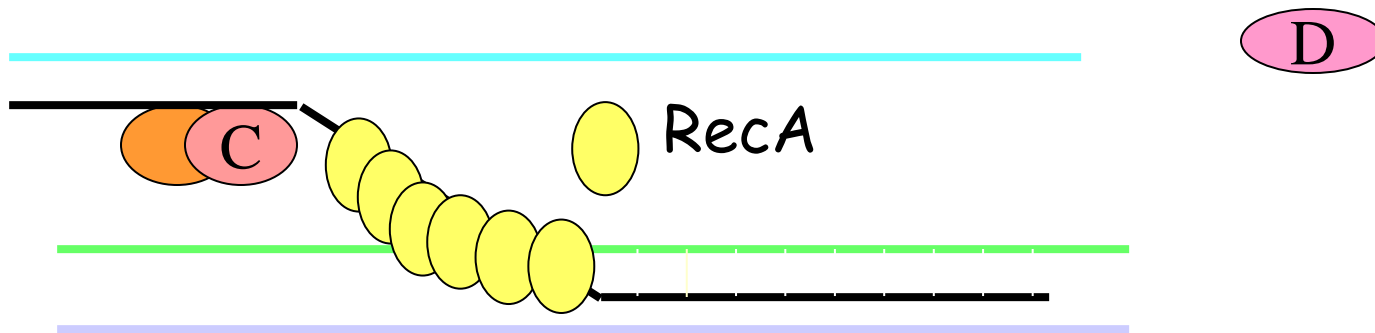


Il complesso RecBCD si lega Al DNADs

RecBCD usa ATP per muoversi sul DNADs e degrada 3'-5' (ExoV) Grazie alla sua attività elicastica svolge il DNA più rapidamente di quanto lo degradi

Quando il complesso arriva al sito X la subunità D dotata di attività esonucleasica si stacca mentre l'elicasi continua a svolgere il DNA

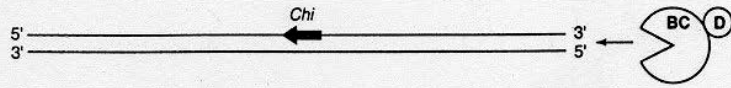
A questo punto se è presente RecA, ATP e una molecola di DNA complementare può avvenire ricombinazione



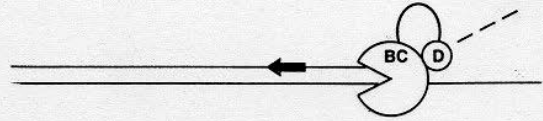
Grazie a questo processamento mediato dal complesso RecBCD si può creare una regione di DNA a singolo filamento.

RecA sarà in grado di riconoscere e legarsi a questo filamento di ssDNA

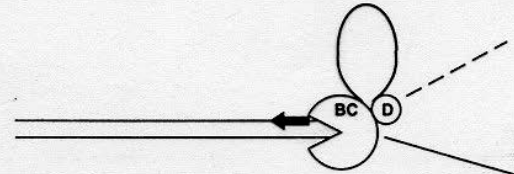
Si potrà avere il processo di ricombinazione per invasione di una regione omologa di dsDNA da parte del complesso RecA-ssDNA



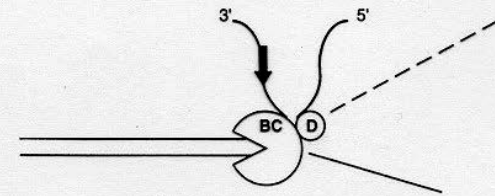
↓ RecBCD protein enters the DNA at double-stranded break.



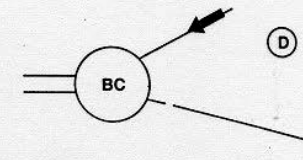
↓ (1) RecBCD helicase activity unwinds the DNA using 2 ATP per base pair.
 (2) RecBCD nuclease activity asymmetrically degrades the DNA (3' strand >> 5' strand).



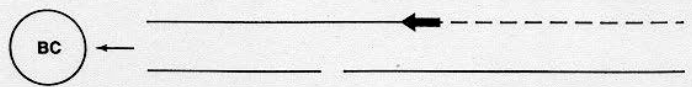
↓ When RecBCD encounters a Chi site (5' GCTGGTGG 3') it nicks the DNA just upstream of the Chi site.



↓ The RecBC protein is functionally modified at the Chi site (possibly by release of the RecD subunit) and retains its helicase activity but loses its nuclease activity.



↓ The RecBC protein continues to unwind the DNA. The resulting single stranded DNA is coated with single-stranded DNA binding protein.



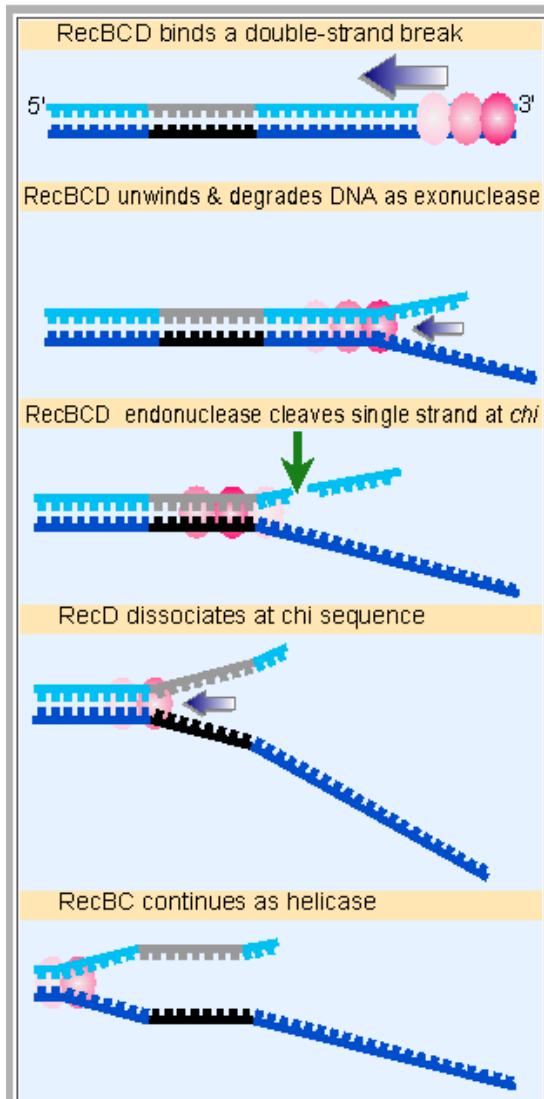
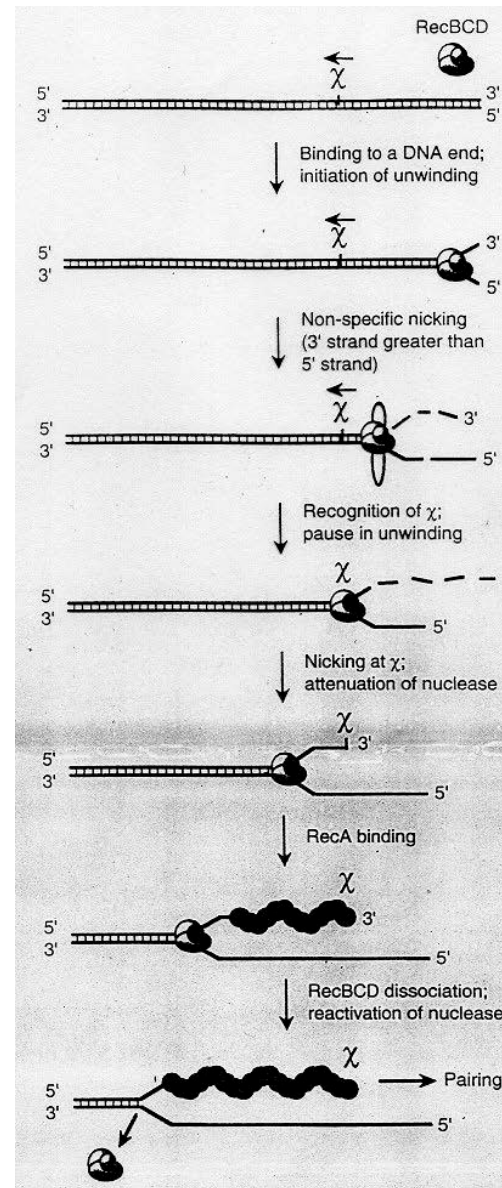
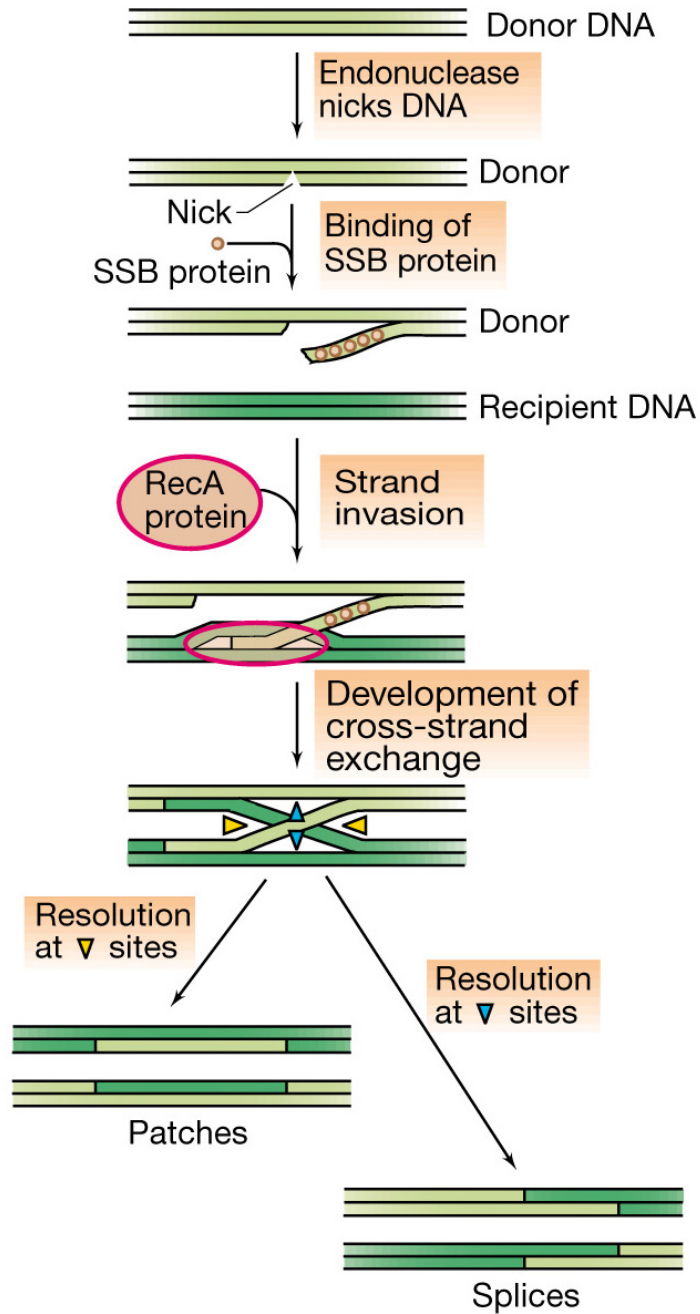


Figure 14.9 RecBCD nuclease approaches a *chi* sequence from one side, degrading DNA as it proceeds; at the *chi* site, it makes an endonucleolytic cut, loses RecD, and retains the helicase activity.

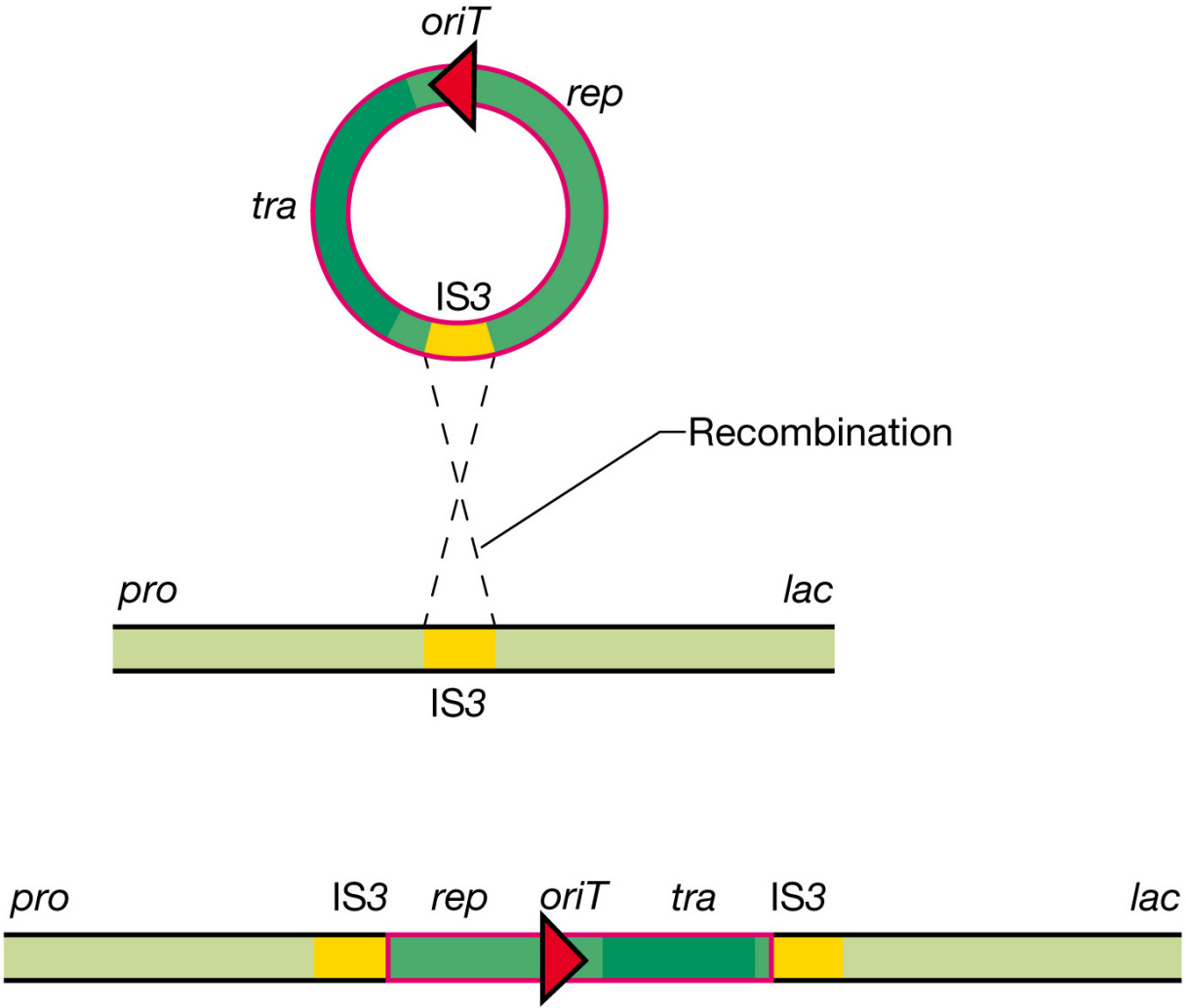




Alcuni esempi di ricombinazione omologa:

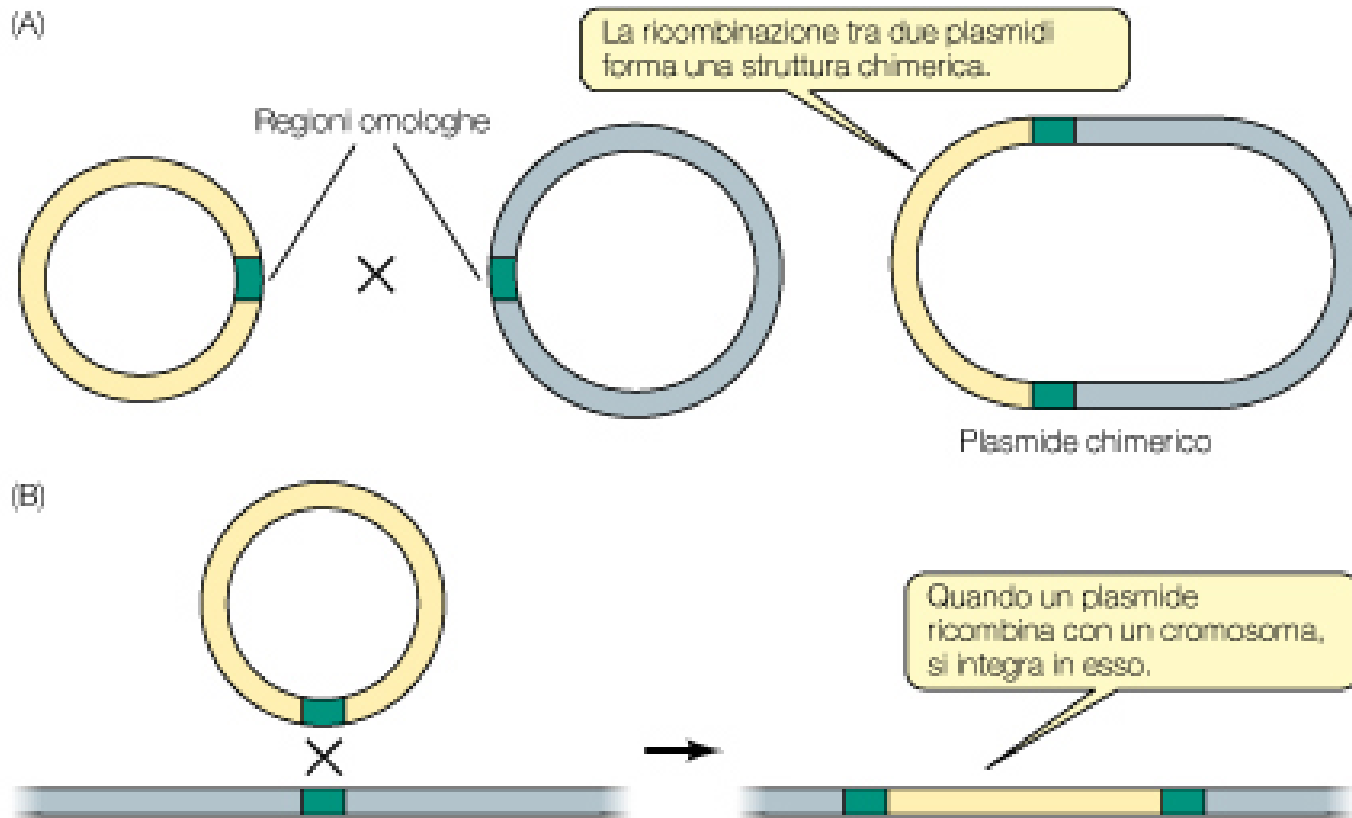
- Integrazione del fattore F all'interno del cromosoma
Le regioni di omologia sono costituite da elementi trasponibili (sequenze IS o trasposoni)
- Fusione di 2 plasmidi in un unico plasmide di grandi dimensioni
- Ricombinazione di frammenti di DNA del donatore Hfr con sequenze omologhe (o parzialmente omologhe presenti sul cromosoma del recipiente)
- Inversioni o delezioni create dalla ricombinazione di sequenze IS identiche (che costituiscono le regioni di omologia): il risultato (inversione o delezione) dipende dall'orientamento reciproco delle sequenze IS

Gli elementi IS sono le regioni di omologia che determinano l'integrazione del plasmide nel cromosoma per **RICOMBINAZIONE OMOLOGA**

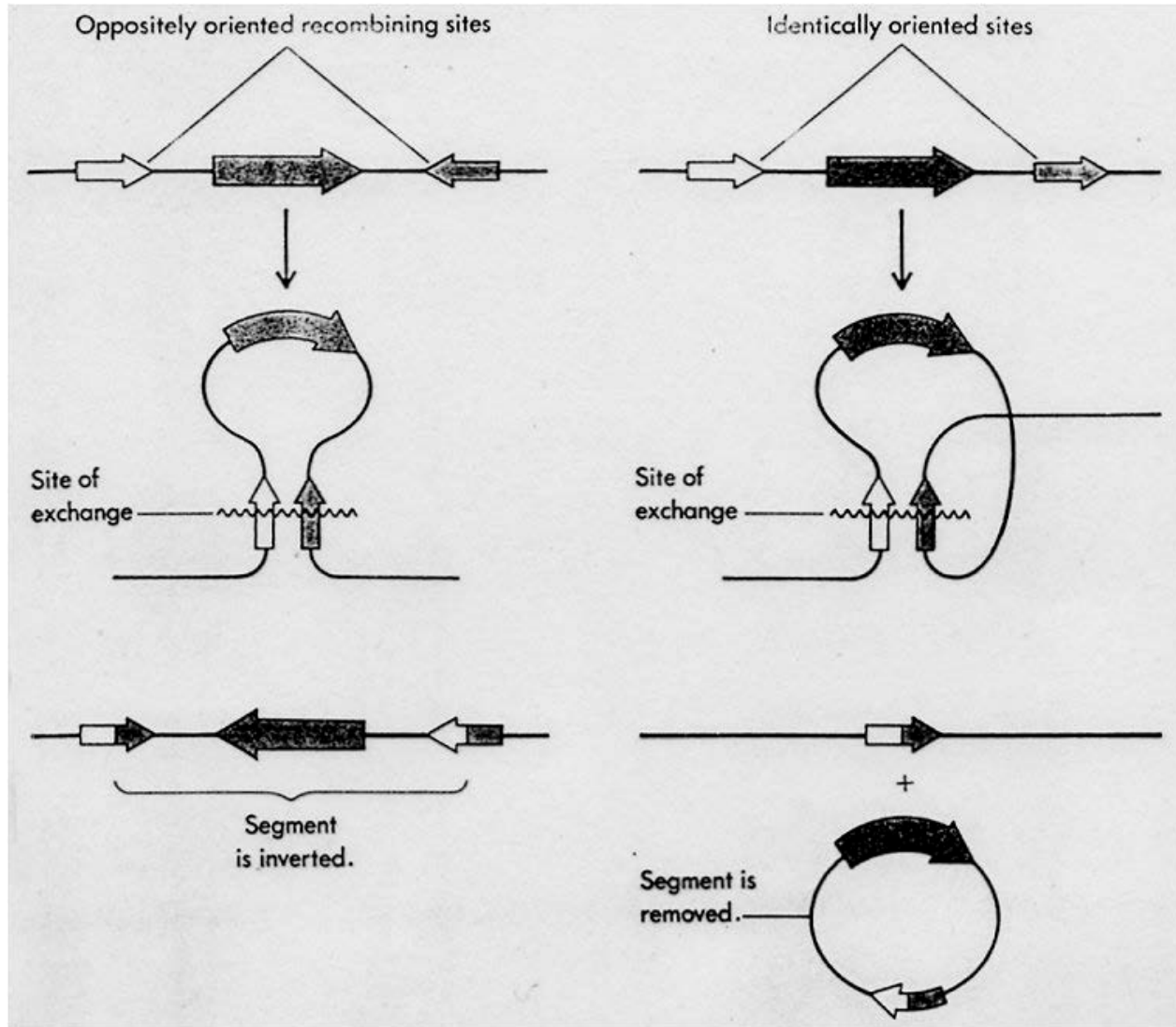


Processi di ricombinazione omologa mediati dagli elementi IS

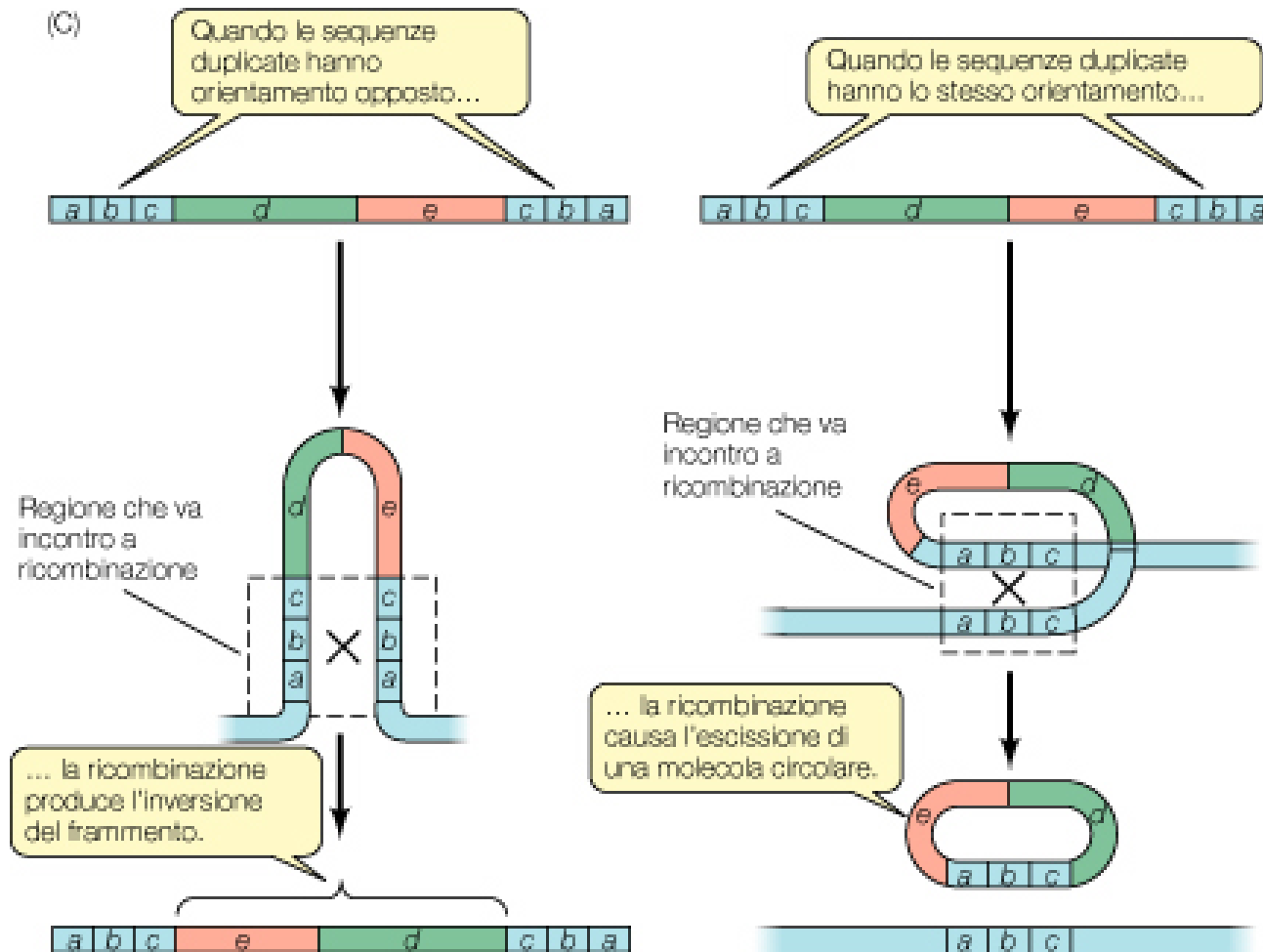
- formazione di plasmidi chimerici
- formazione di ceppi Hfr



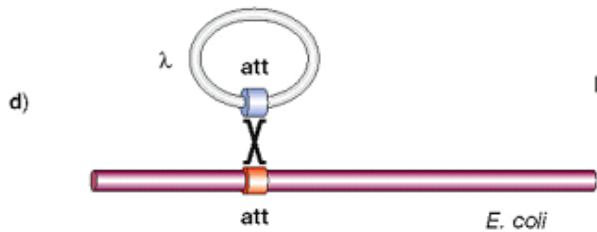
Riarrangiamenti genetici generati dagli elementi trasponibili : INVERSIONI E DELEZIONI



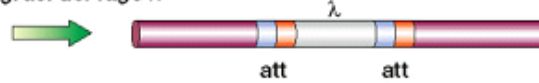
- formazione di inversioni quando gli elementi si trovano in orientamento opposto
- formazione di delezioni quando gli elementi si trovano nello stesso orientamento



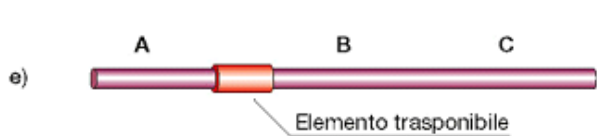
LA RICOMBINAZIONE NON OMOLOGA



Integrasi del fago λ



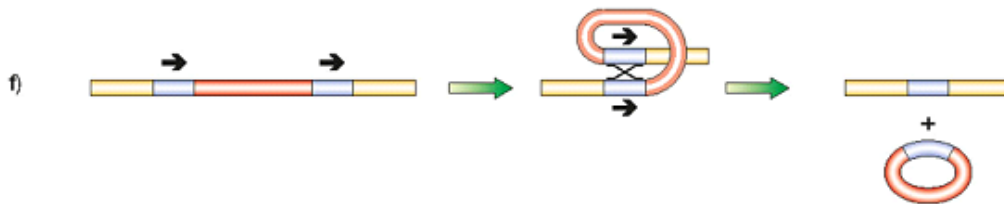
Integrazione dei fagi temperati (λ , ICE, Integroni)



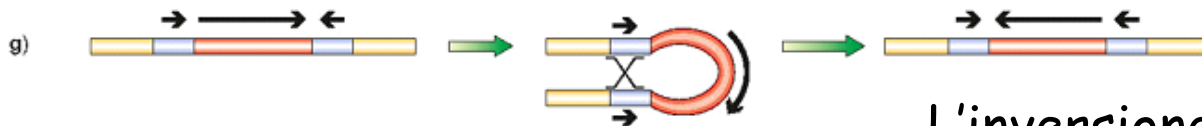
Trasposasi



La trasposizione



L'excisione di un frammento di DNA per ricombinazione tra sequenze direttamente ripetute (formazione di pro- σ^k nella cellula madre x la sporulazione)



L'inversione di un frammento di DNA mediata dall'INVERTASI HIN per la sintesi della flagellina

LA RICOMBINAZIONE NON OMOLOGA

Ricombinazione sito specifica

- Integrazione dei fagi temperati (p.e.λ) nel cromosoma
- L'integrazione degli ICE
- L'integrazione delle cassette negli integroni

Trasposizione

- Duplicazione di una sequenza definita Trasposone intramolecolare o intermolecolare
- Spostamento di una molecola tra due molecole di DNA o all'interno della stessa molecola

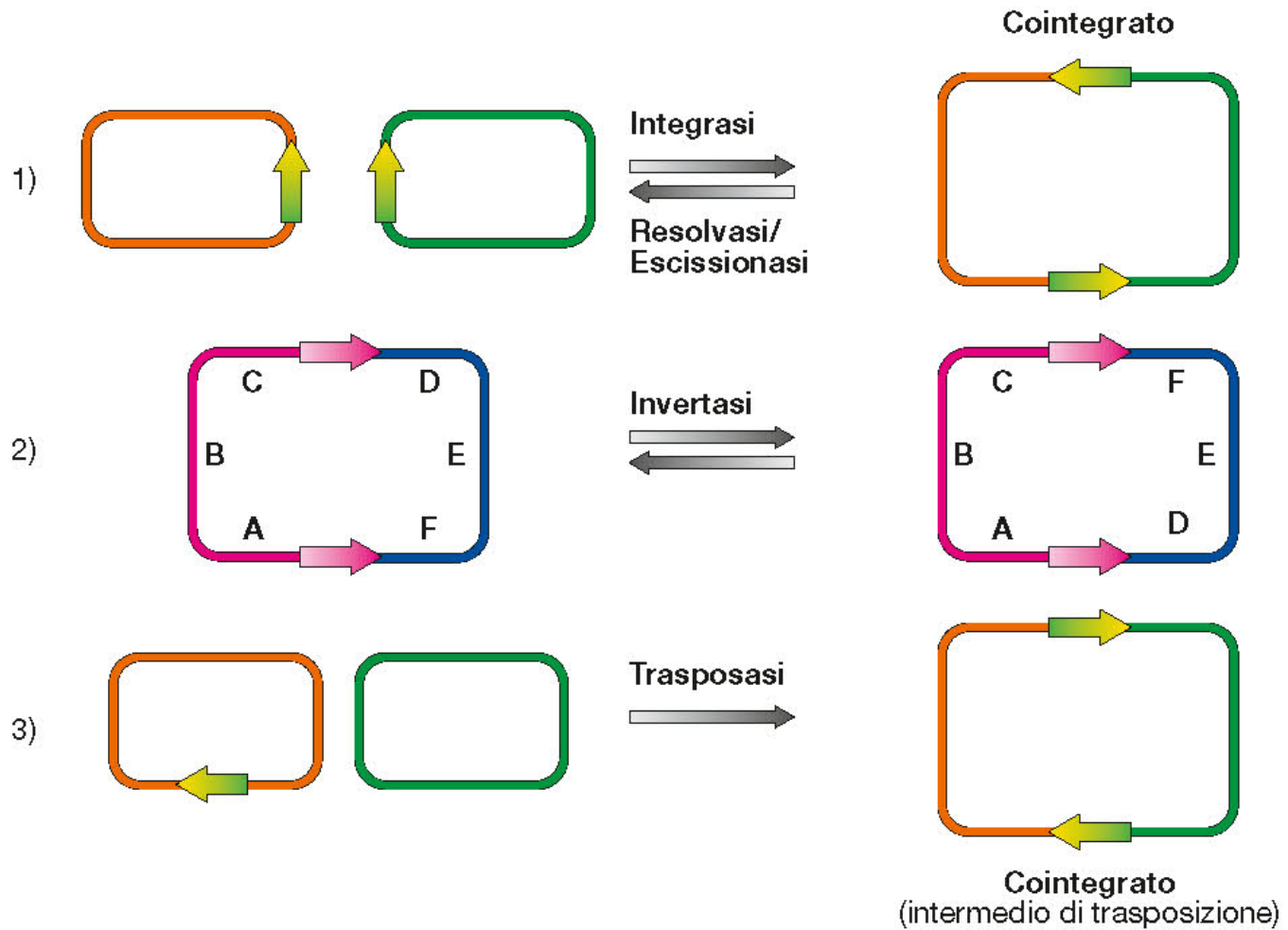
La differenza tra questi due processi risiede

- Nelle sequenze bersaglio
- Nel tipo di enzimi (ricombinasi o trasposasi)

Nella ricombinazione SITO-SPECIFICA sono riconosciute sequenze particolari su entrambe le molecole (donatore e recipiente (attB e attP)

Nella trasposizione l'enzima TRASPOSASI riconosce sequenze specifiche solo per le sequenze presenti nel TRASPOSONE localizzato sulla molecola donatore

Enzimi coinvolti nella ricombinazione non omologa



Gli enzimi che promuovono la ricombinazione sito specifica sono **RICOMBINASI**

Si viene a formare un intermedio in cui l'enzima forma un legame fosfodiesterico con il DNA a livello di uno specifico AA

Tirosina tirosin ricombinasi

Serina serin ricombinasi

I bersagli delle ricombinasi sono sequenze particolari specifiche per ogni enzima

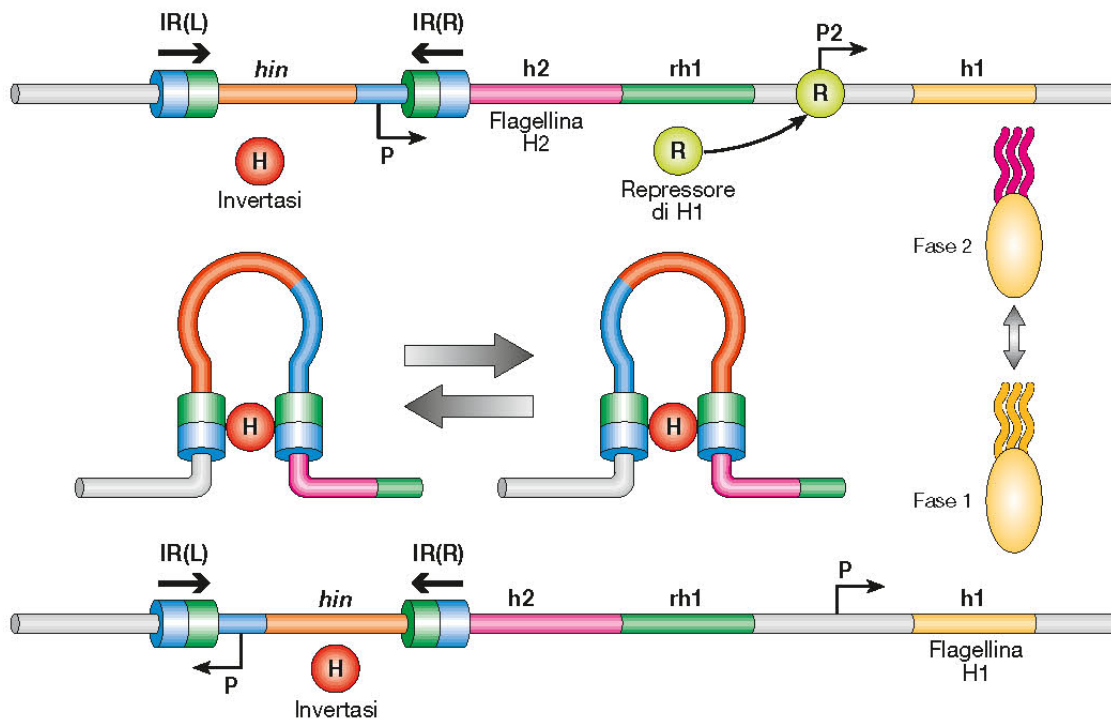
Integrasi : siti att

Invertasi : sequenze IR

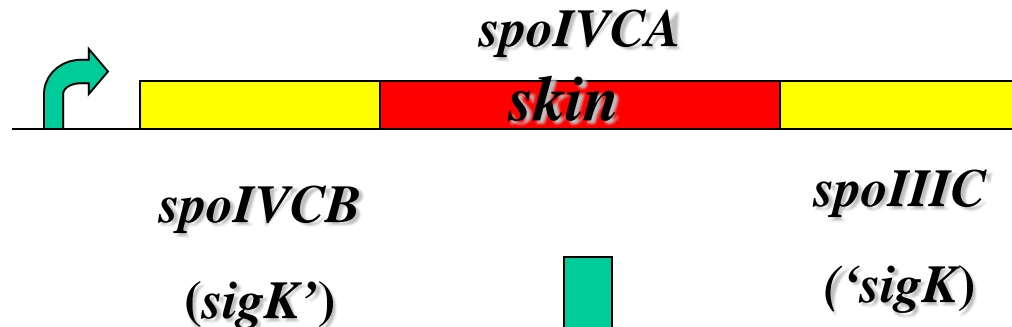
Resolvasi siti : RES

Esempi di ricombinazione non omologa definita anche illegittima o sito specifica

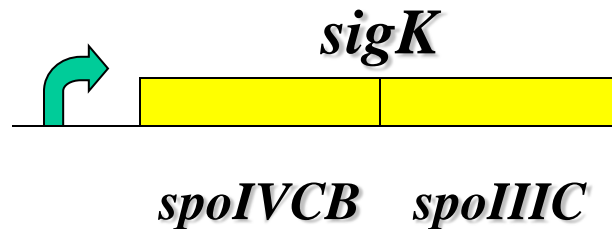
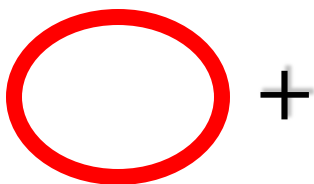
Inversione di fase in *Salmonella*: le regioni IR sono riconosciute dalla invertasi Hin codificata dal frammento che sarà invertito



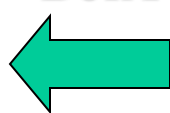
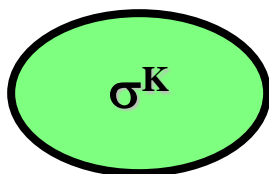
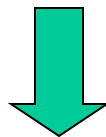
Sintesi del fattore pro- σ^K nella cellula madre



Questo processo e viene effettuato da una ricombinasi specifica codificata dal frammento exciso che riconosce brevissime sequenze di omologie (10-15 basi) e non avviene nella prespora



SpoIVB
SpoIVFB
SpoIVFA
BofA



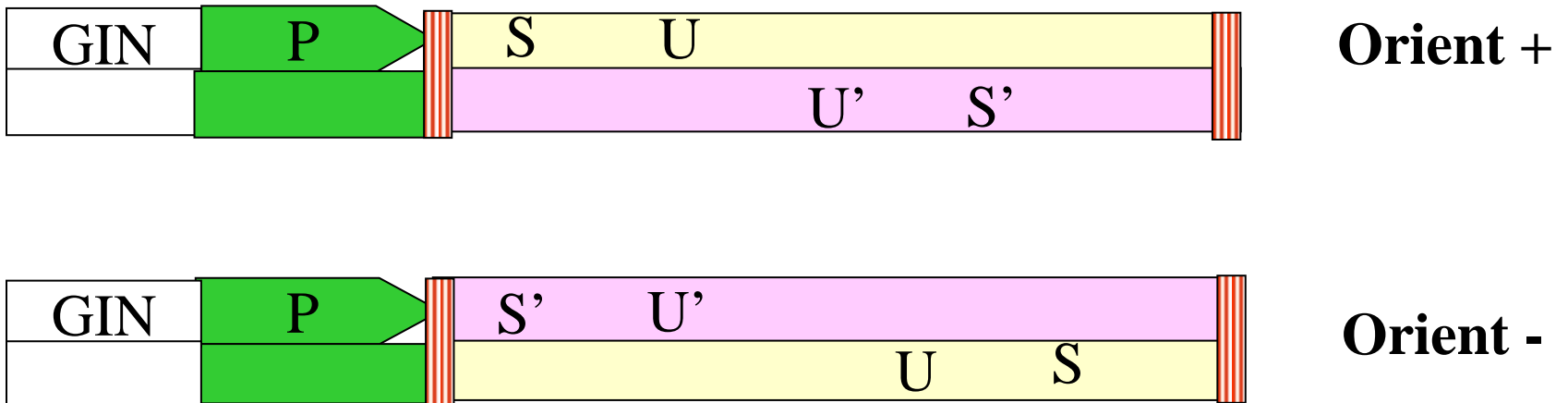
Alcuni esempi nei fagi di
ricombinazione illegittima o sito
specifica

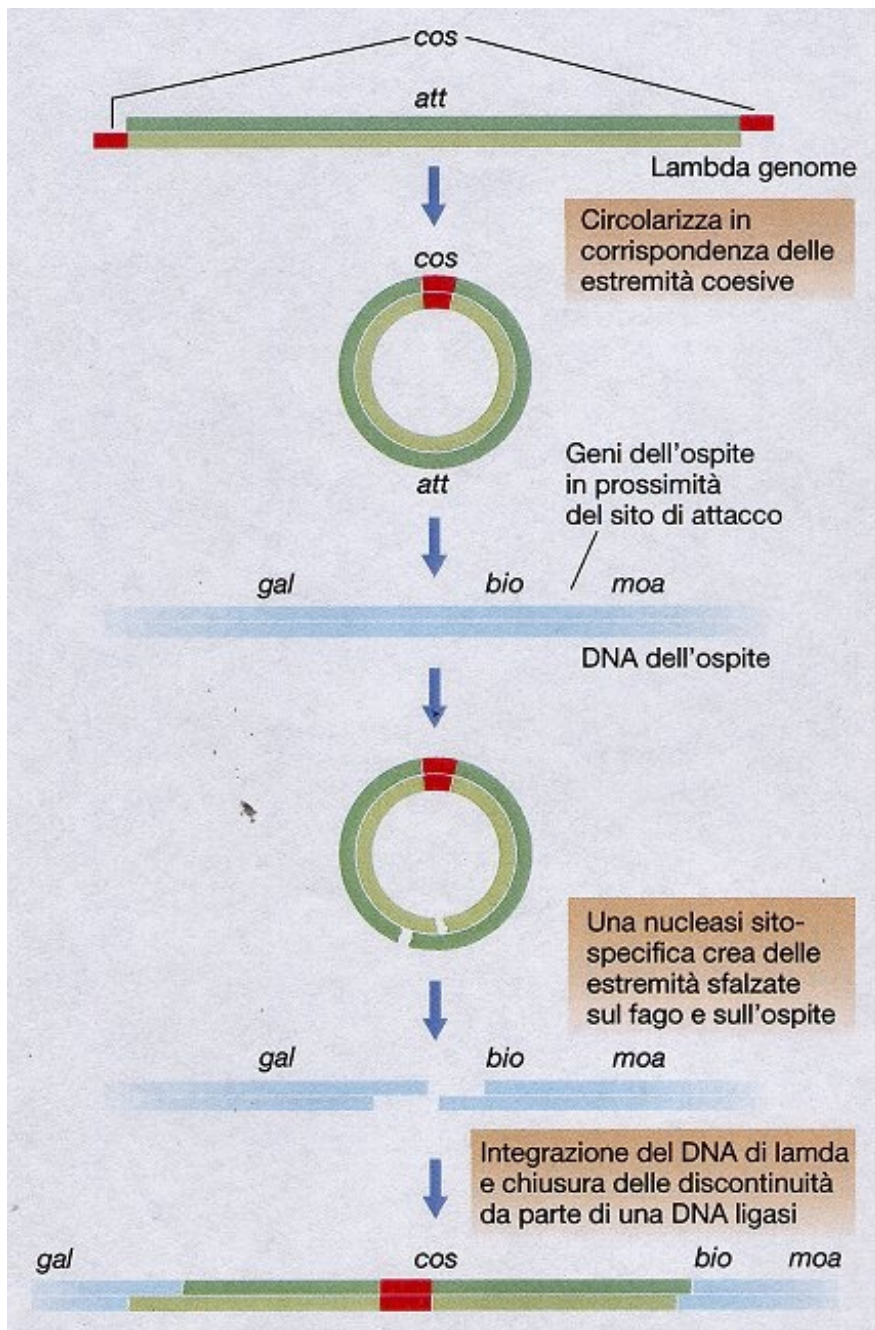
Inversione del frammento G nel Batteriofago MU

L'inversione è mediata dalla proteina Gin codificata a monte dei geni SU

Il fago MU ha la potenzialità di codificare 2 tipi di fibre caudali SU oppure S'U' a seconda che il frammento che contiene questi geni (frammento G) si trovi nell'orientamento + o -

Dal momento che le fibre caudali servono per il riconoscimento di proteine o macromolecole situate sulla parete cellulare del batterio ospite se il frammento G si trova nell'orientamento + il fago Mu potrà infettare E.coli K12 se si trova nell'orientamento - potrà infettare altri enterobatteri.





Integrazione del fago lambda nel cromosoma di E.coli K12.

Il locus *attB* è localizzato tra i geni degli operoni *gal* (galattosio) e *bio* (biotina).

Si tratta di un meccanismo di ricombinazione sito-specifica mediato dalla proteina del fago *Int* e dalla proteina del nucleotide *IHF* (Integration Host factor).

