

La ricombinazione del DNA

Processo enzimatico con il quale l'organizzazione lineare del DNA viene modificata mediante unioni e rotture.

La ricombinazione del DNA può essere suddivisa in due categorie :

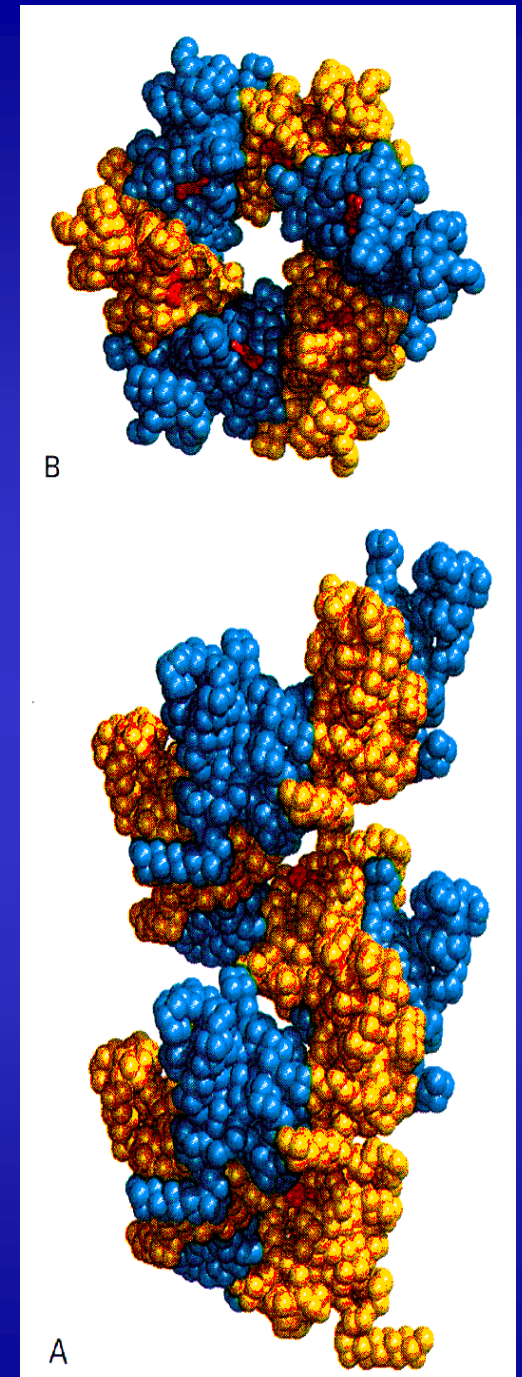
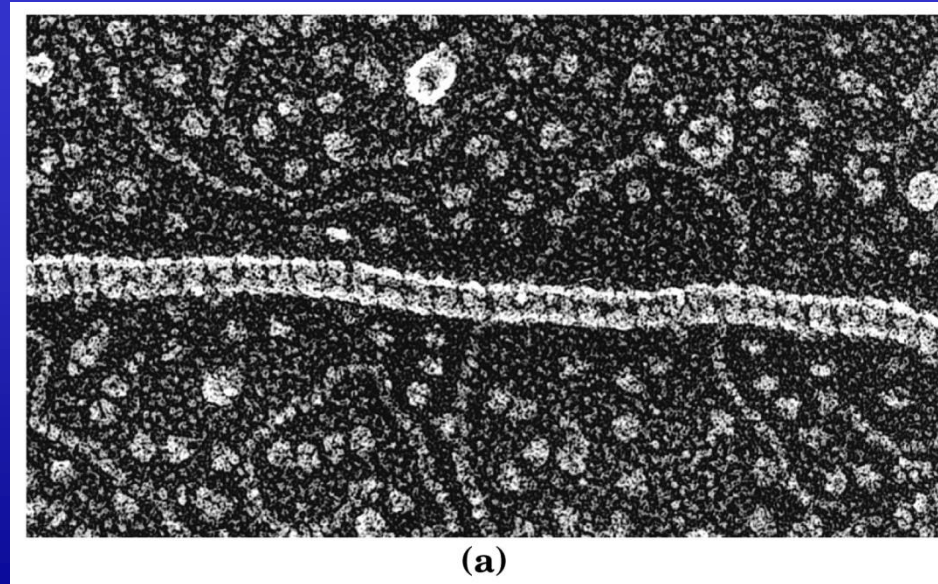
La ricombinazione omologa o generale

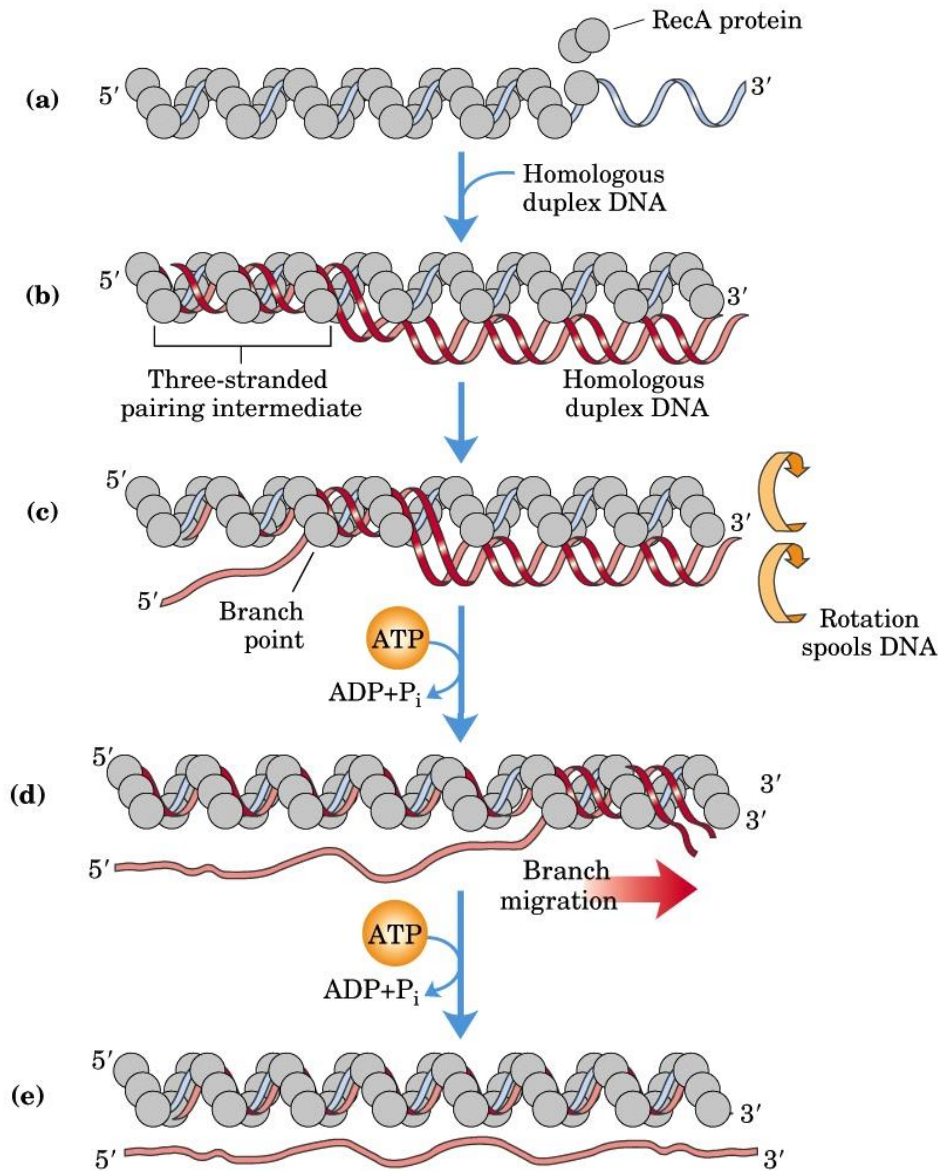
- **Avviene tra sequenze di DNA che presentano una omologia di sequenza di almeno 500-1000 bp**
- **Vi sono coinvolte molte proteine tra le quali, la più importante, RecA**

La ricombinazione sito specifica

- **Avviene tra sequenze di DNA brevi e specifiche**
- **è mediata da proteine specifiche che prendono il nome di integrasi, resolvasi, trasposasi, etc che riconoscono sequenze ben determinate**

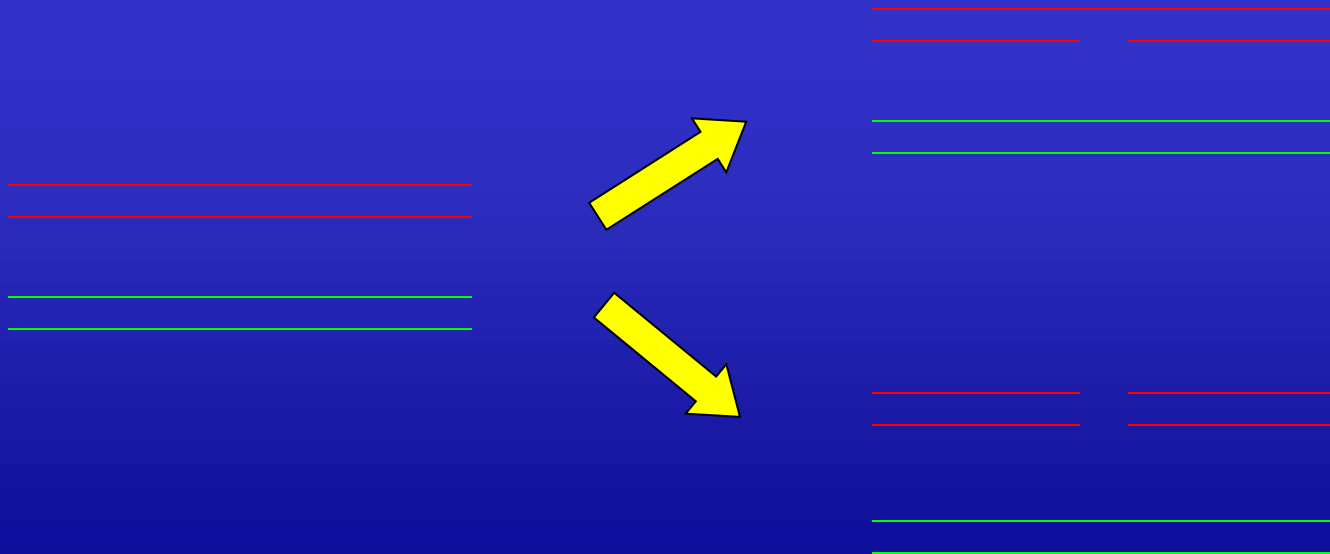
La proteina RecA ha una struttura elicoidale che si attorciglia intorno al singolo filamento di DNA, lo protegge e lo guida all'interno di una alfa elica omologa





La ricombinazione omologa può intervenire quando sono presenti:

- Due molecole di dsDNA omologhe in sequenza**
- Almeno una delle due molecole presenti un'interruzione su singolo filamento o su entrambi i filamenti**

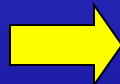
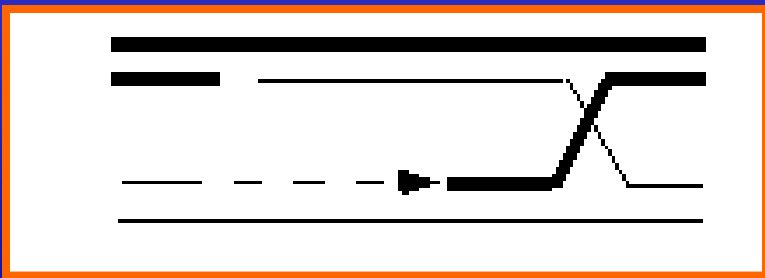
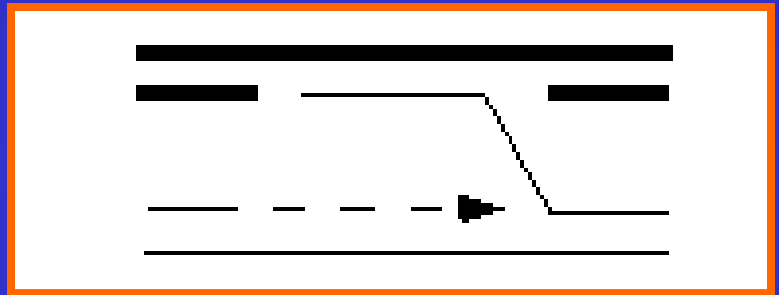
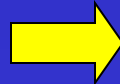
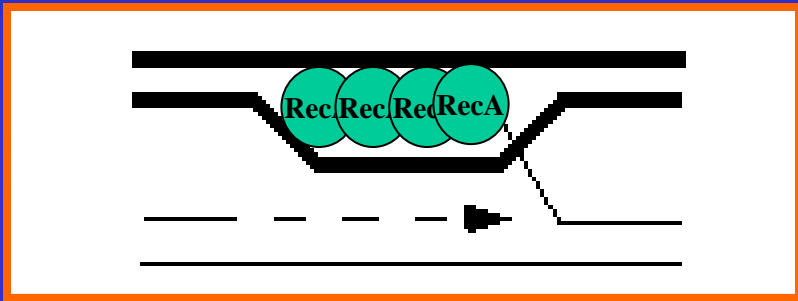
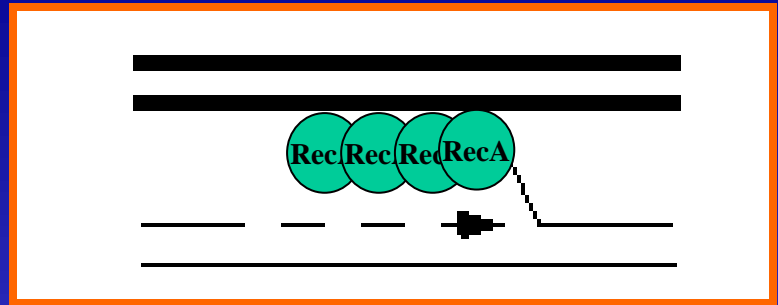
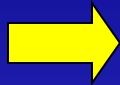
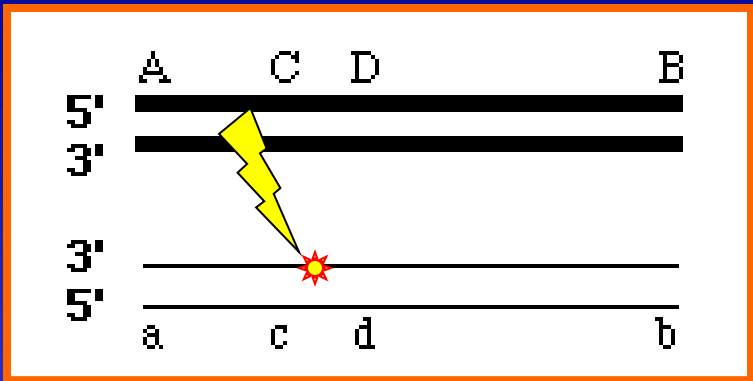




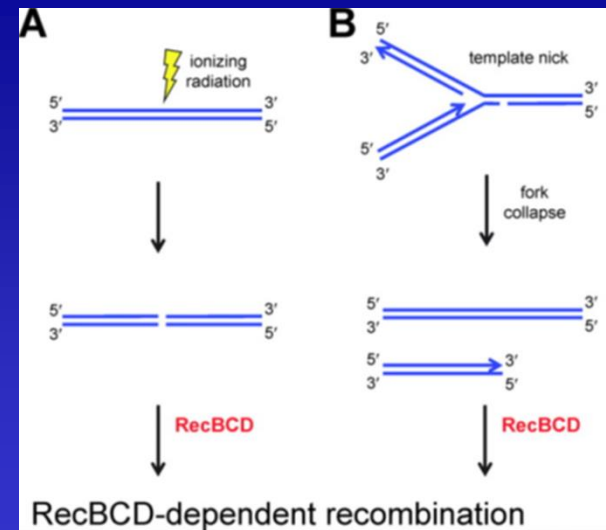
In questo primo caso intervengono la proteina RecA e altre due proteine denominate:

- **RecQ (con funzione elicastica)**
- **RecJ (con funzione nucleasica)**

Oltre a queste specifiche proteine intervengono anche una DNA polimerasi ed altri fattori ad attività sconosciuta



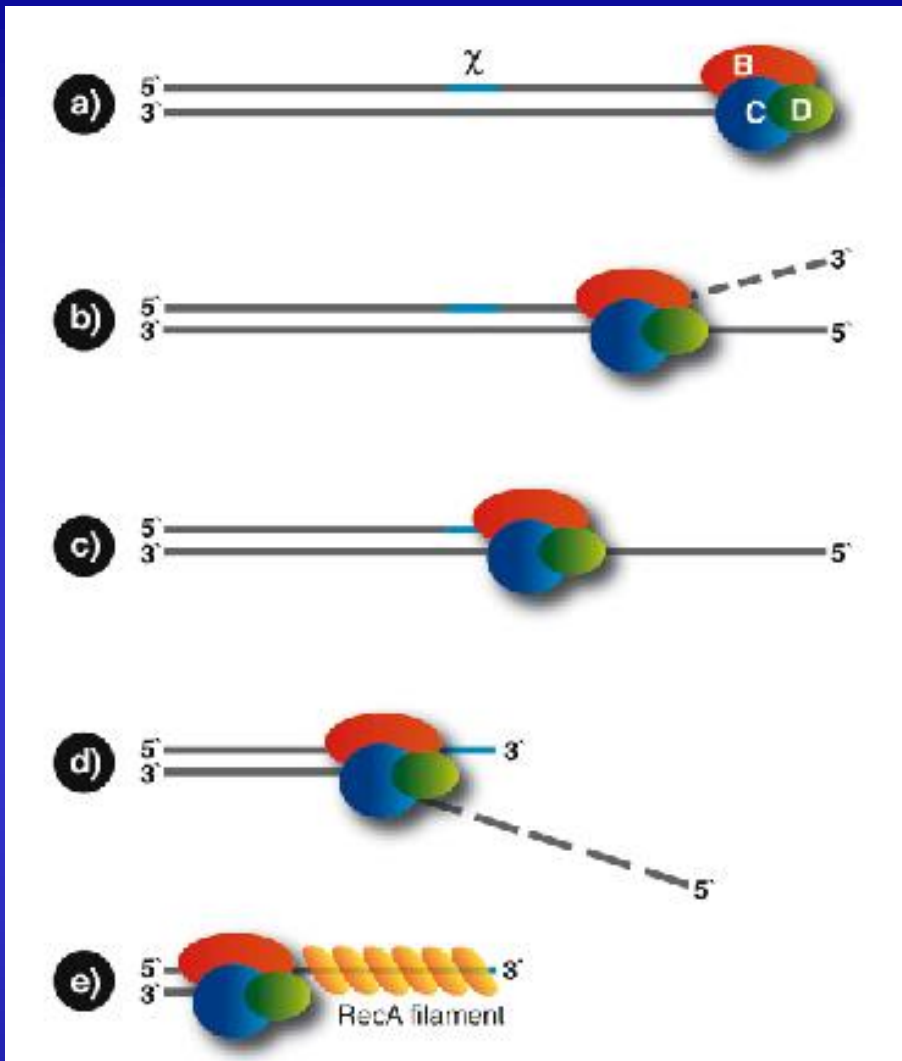
**Strutture di
Holliday**



Nel secondo caso interviene il complesso delle proteina RecBCD.

Il complesso RecBCD ha attività:

- **elicastica**
- **esonucleasica per DNA a singolo e doppio filamento**
- **endonucleasica per singolo filamento**



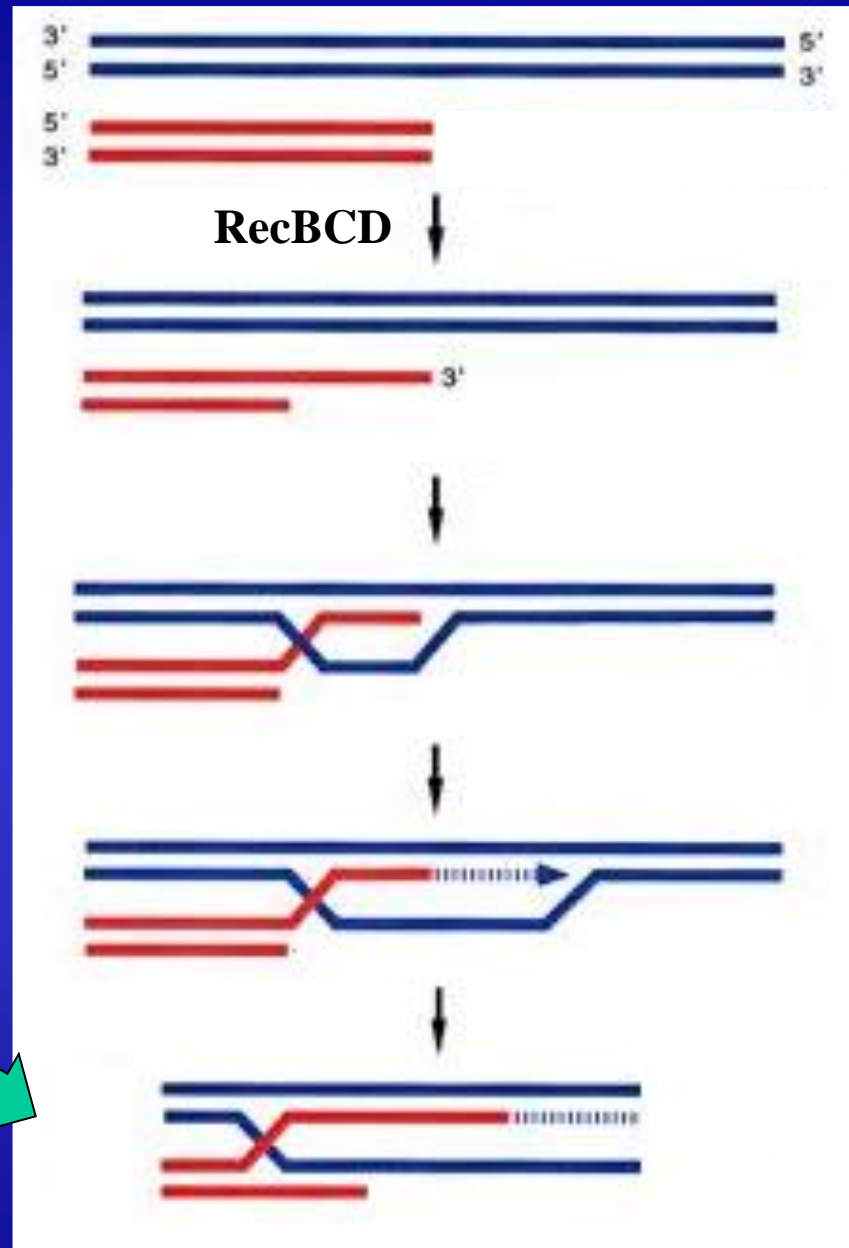
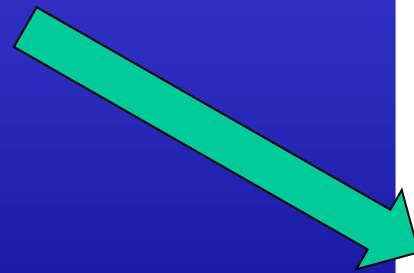
Il complesso RecBCD riconosce e lega un 3' nella molecola di DNA. Questo complesso degrada un filamento in direzione 3'->5' finché incontra un sito *chi* (gctgggtgg). A questo punto il complesso cambia filamento e polarità degradando in direzione 5'->3' il filamento complementare. In questo modo si produce un singolo filamento che viene riconosciuto e introdotto nell'alfa elica omologa dalla proteina RecA. Questo filamento scalza la sua controparte che complementa con l'altra estremità della prima molecola.

La DNA polimerasi III e la ligasi fanno il resto.

L'incrocio tra i due filamenti eterologhi è in grado di scorrere prima di essere risolto

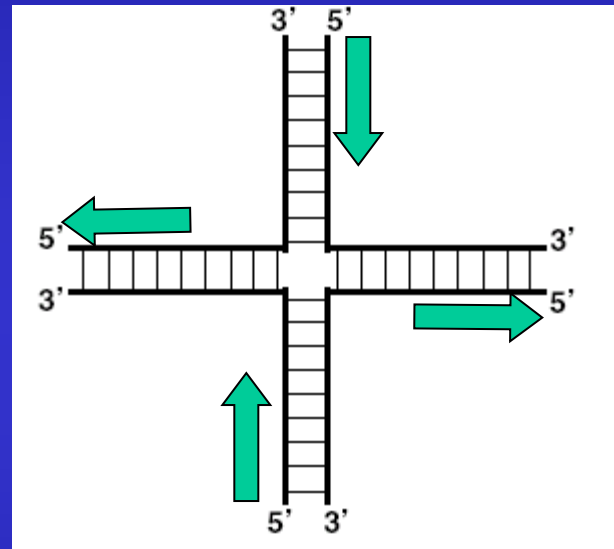
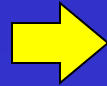
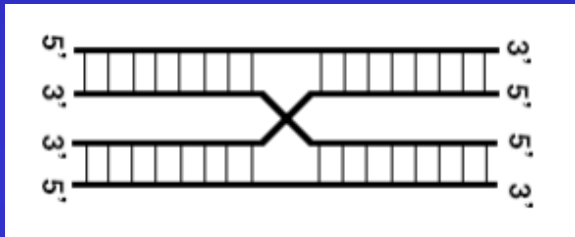


Anche nel caso
dell'intervento di
RecBCD la fase
cruciale è la
formazione di una
struttura di
Holliday



Gli aspetti importanti di entrambi i modelli sono il ruolo della proteina RecA e la migrazione del chiasma attraverso le strutture di Holliday

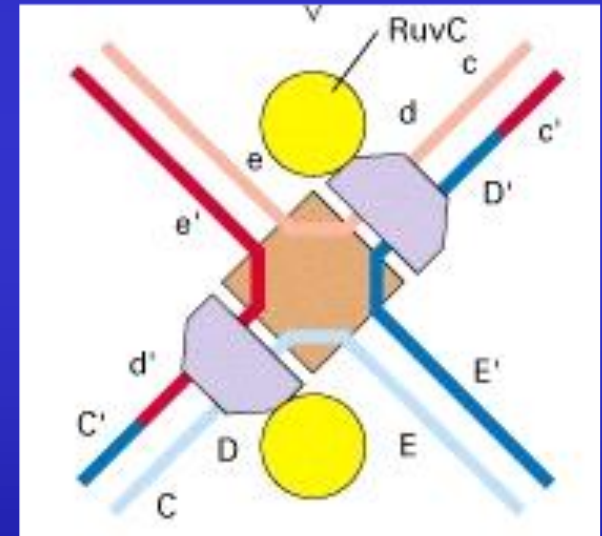
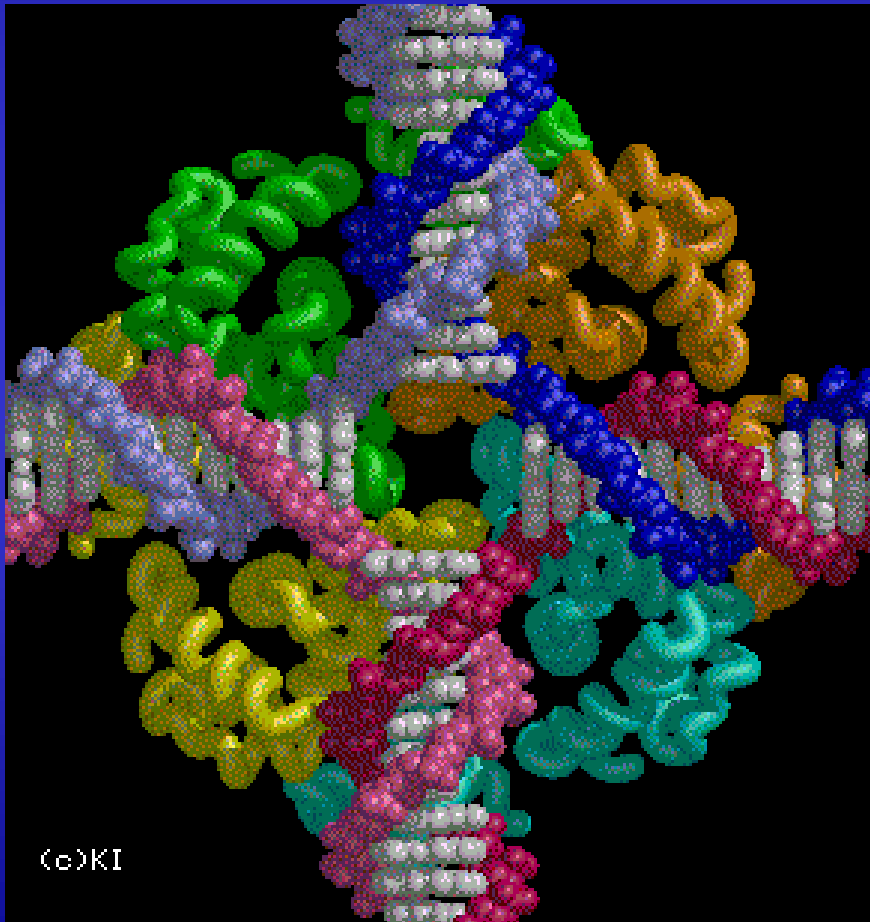
Questo processo determina la formazione di una struttura caratteristica della ricombinazione omologa: la struttura di Holliday

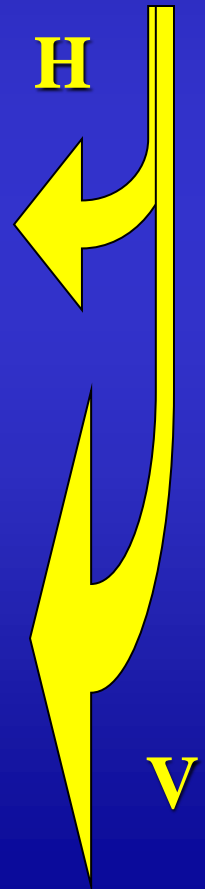
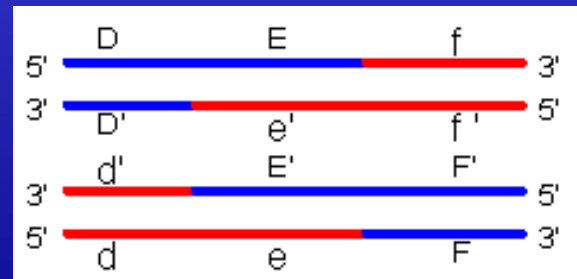
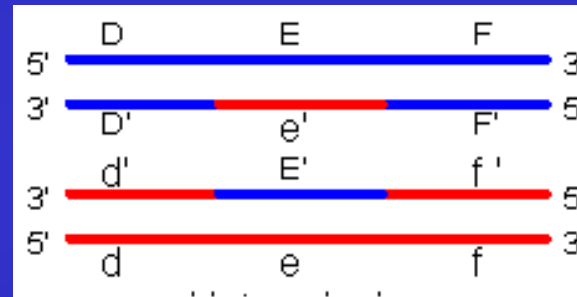
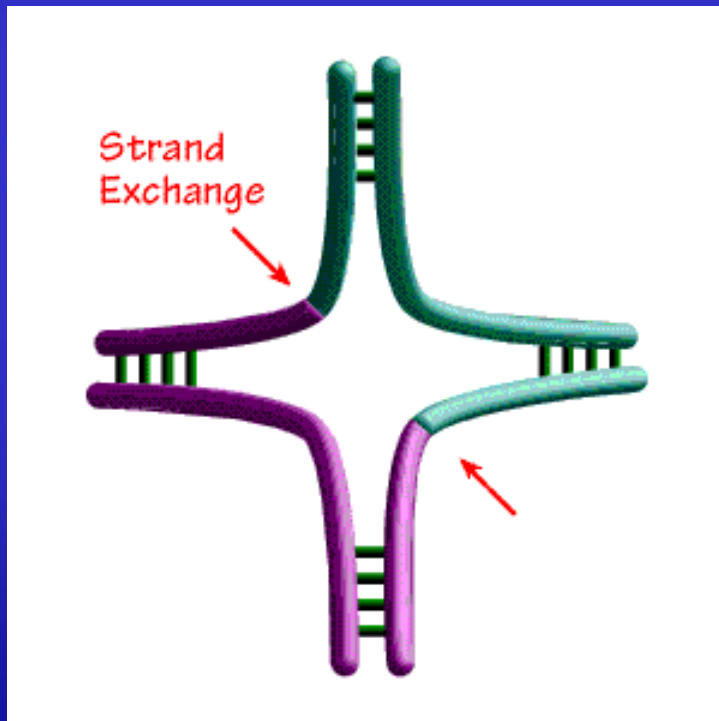
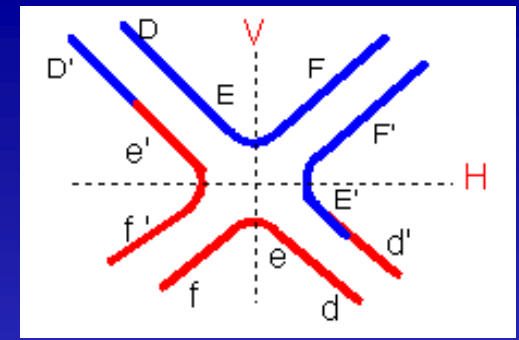
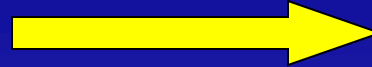
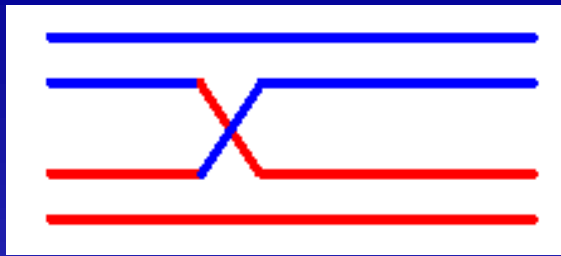


Questa struttura è responsabile dello scorrimento dell'incrocio dei due filamenti eterologhi con la collaborazione di un complesso proteico costituito da due proteine denominate RuvA e RuvB



Il complesso RuvAB aumenta la velocità di scorrimento dell'incrocio mentre la proteina RuvC si prepara a risolvere la struttura



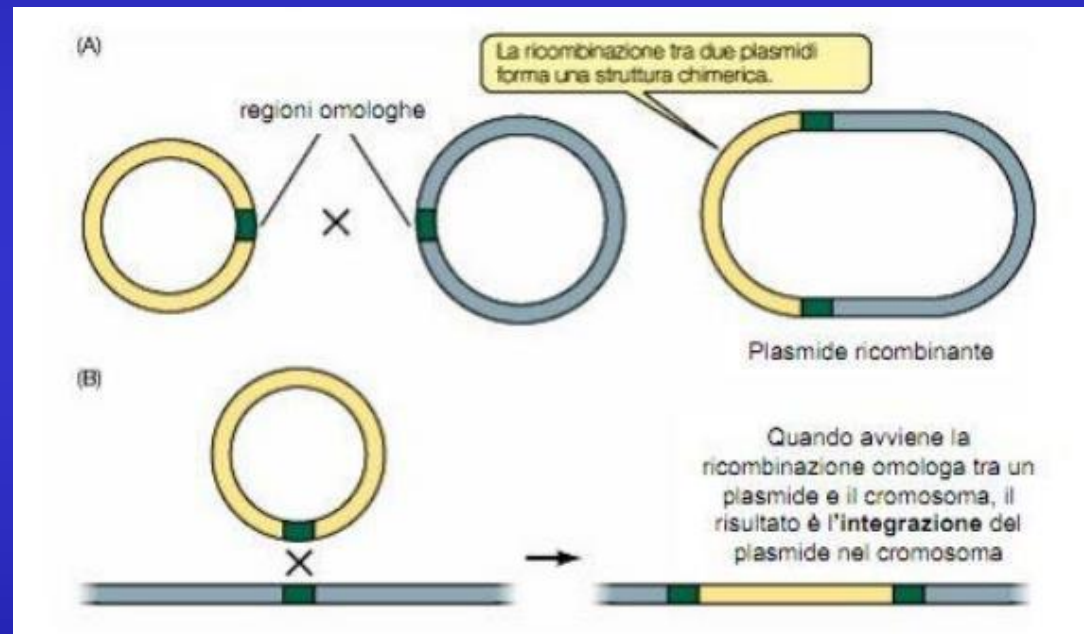
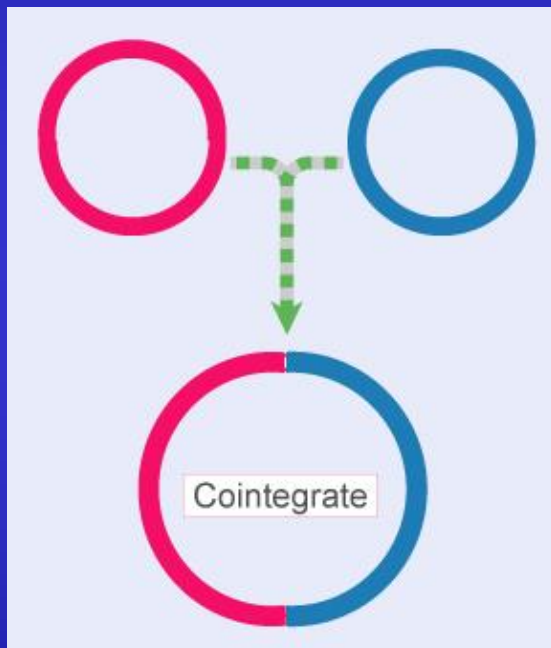


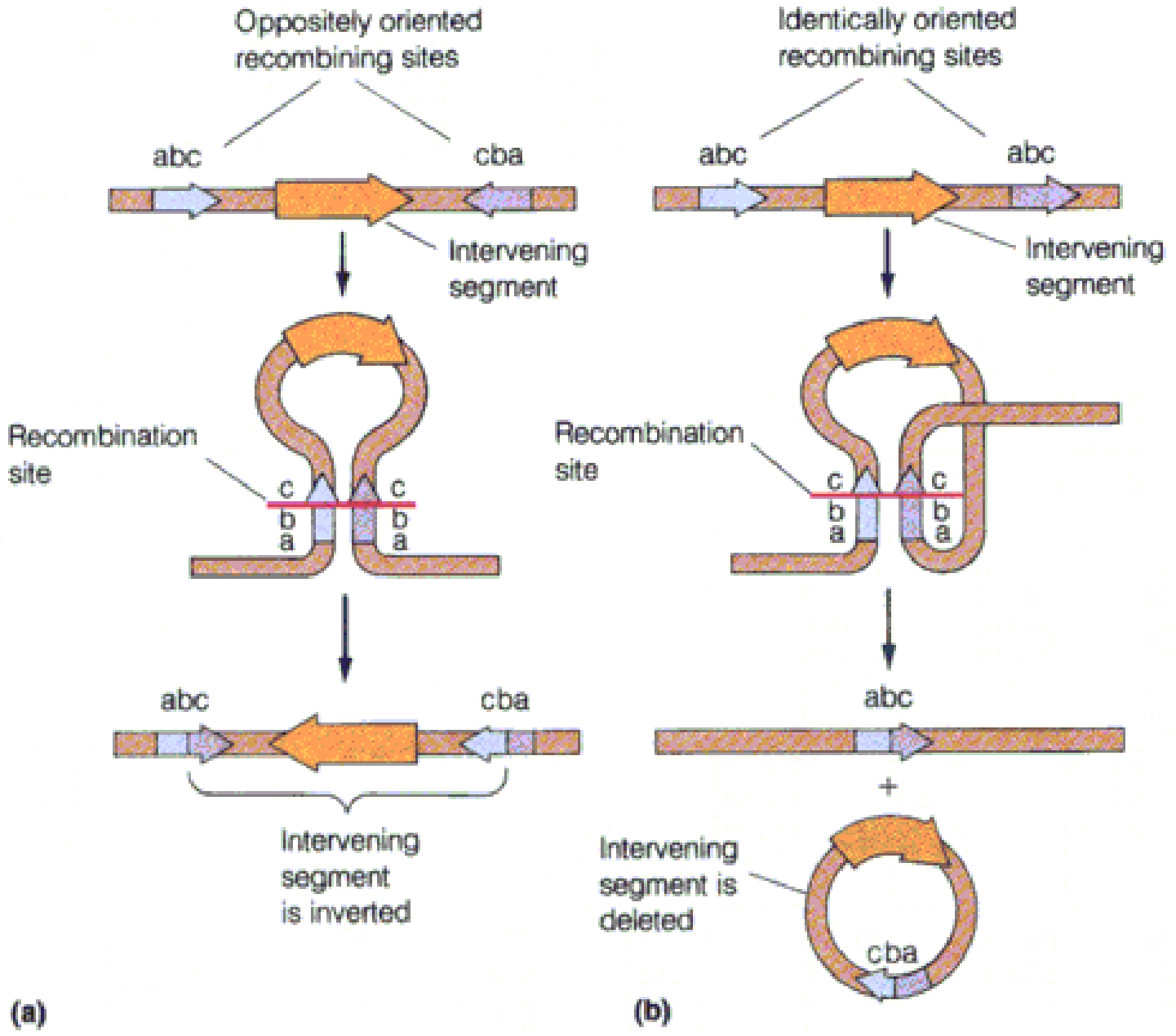
Video

Scambio di filamenti

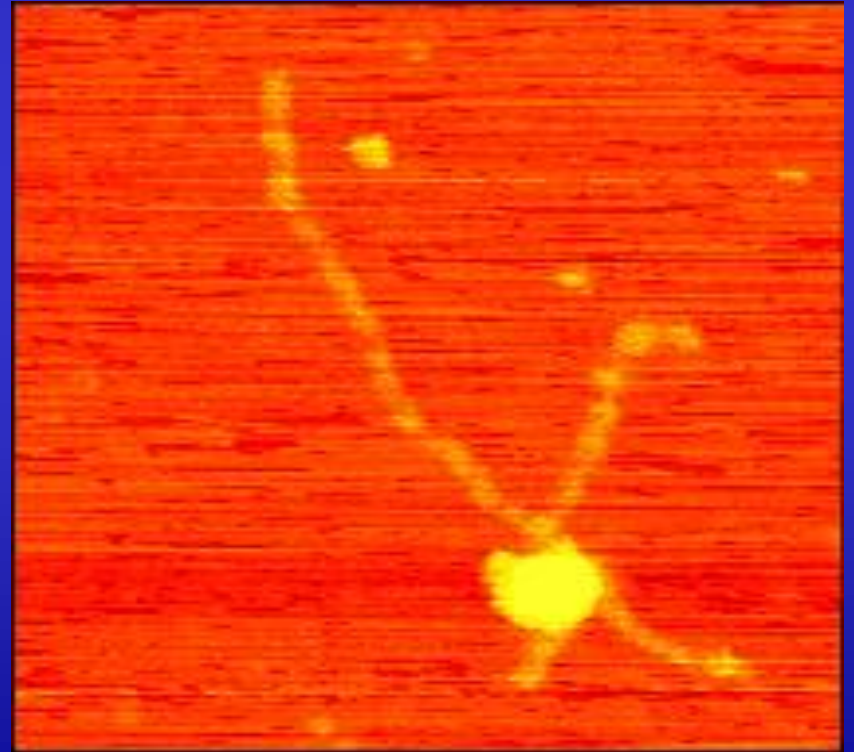
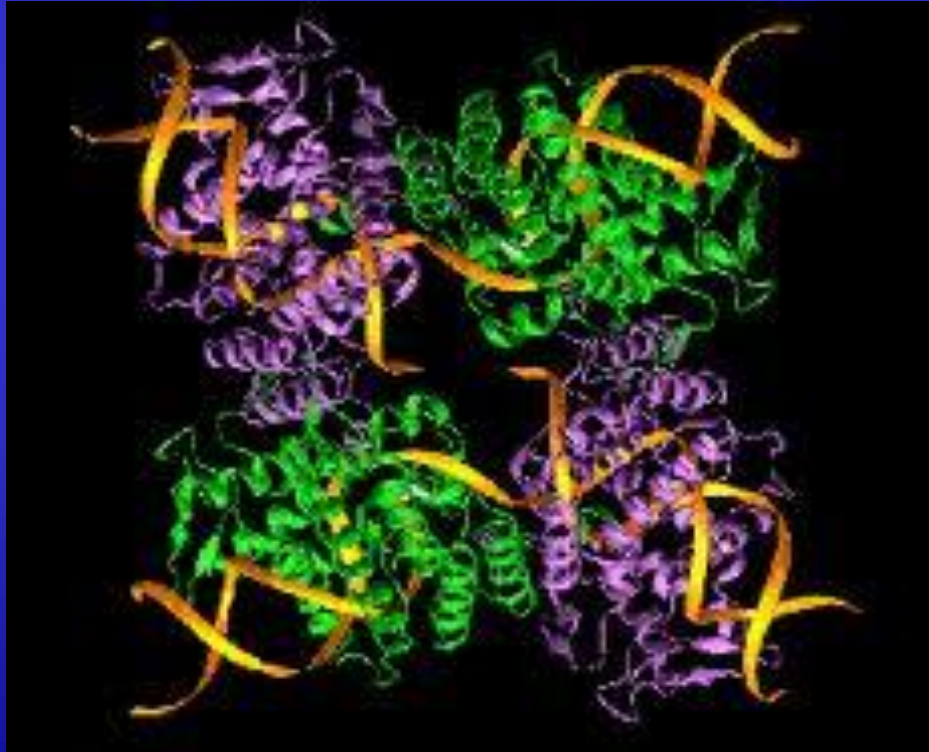
Scambio filamenti / Cross over

Esempi di risoluzione sull'asse «verticale»



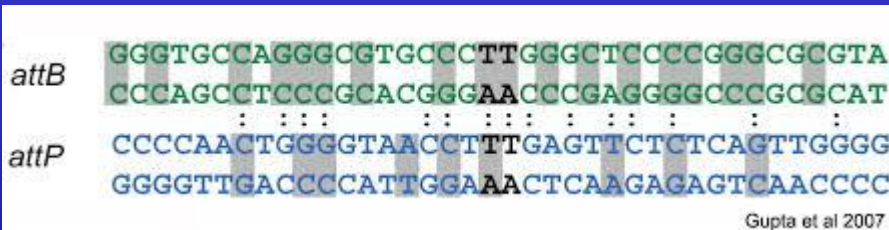
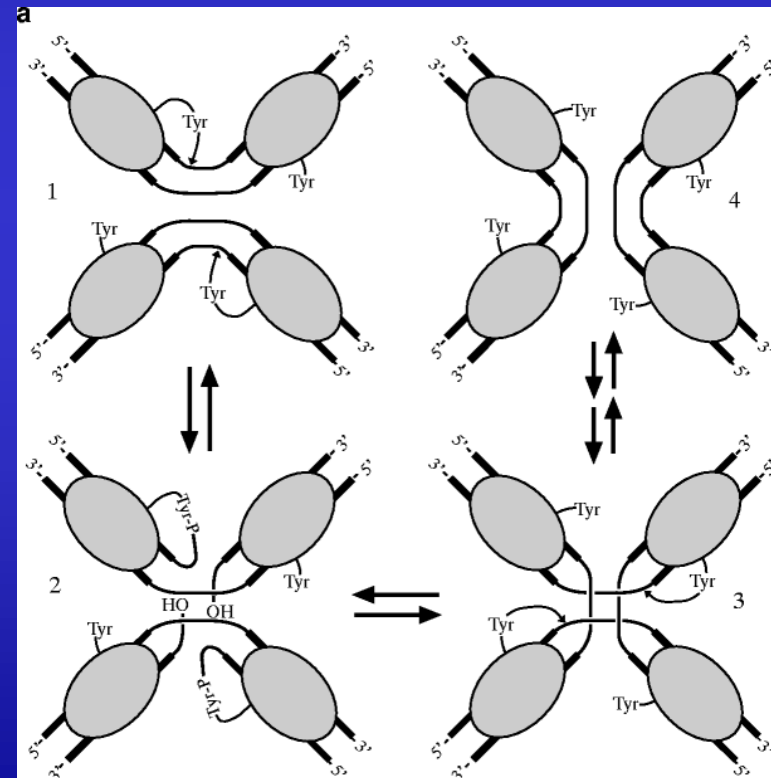
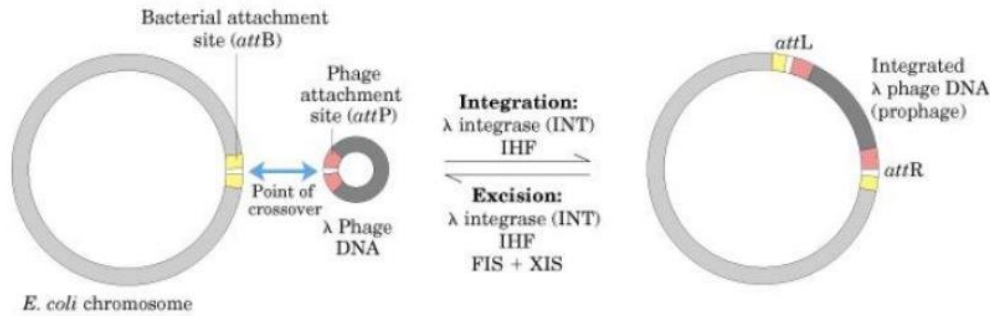


Cre loxP ricombinasi



Ricombinazione sito specifica: il fago lambda

Integrazione e rimozione del DNA del batteriofago λ nel sito bersaglio del cromosoma



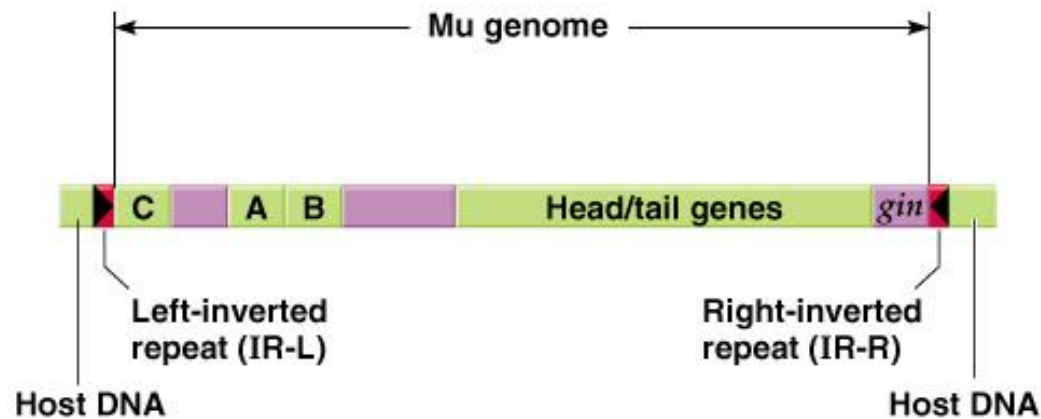
Alcuni esempi di ricombinazione deputati alla regolazione genetica dei procarioti:

- Il segmento G del fago Mu
- L'inversione di fase in *Salmonella*
- Gli integroni

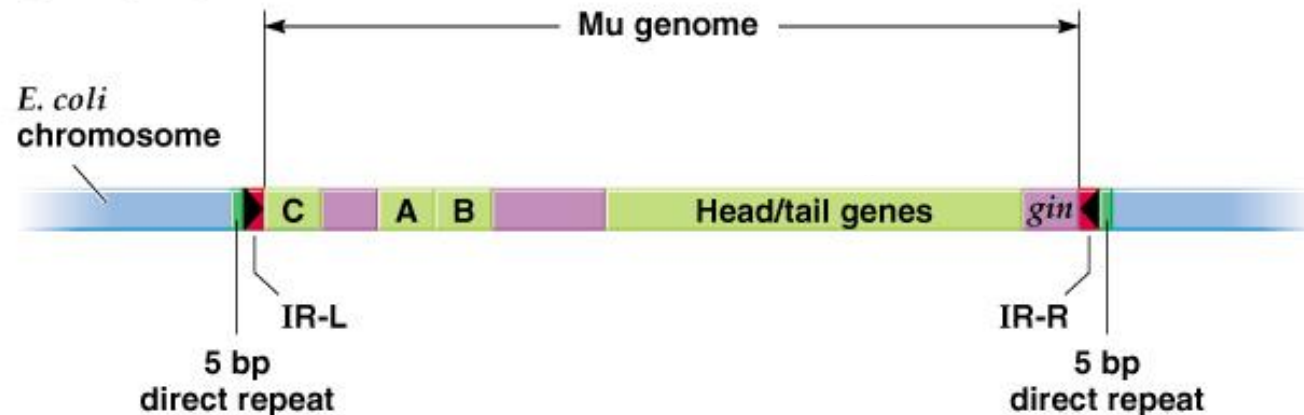
Il fago Mu

Si tratta di un fago temperato di *E.coli* il cui ciclo vitale dipende dall'integrazione nel cromosoma batterico.

a) Phage DNA present in virus particles



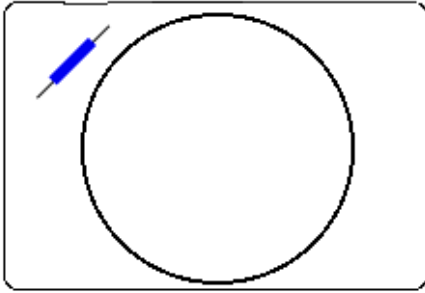
b) Prophage DNA



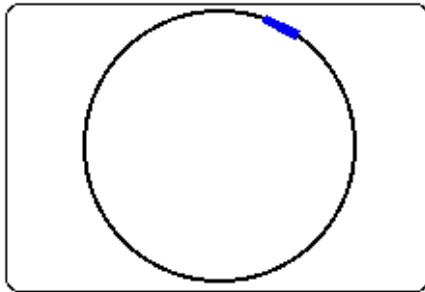
MU Phage



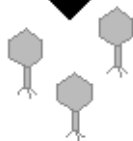
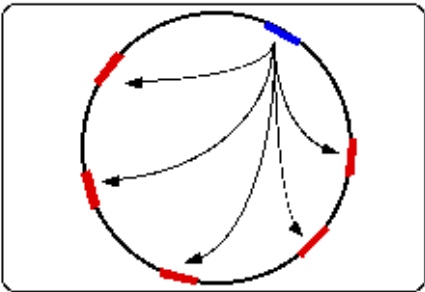
(A)



(B)



(C)

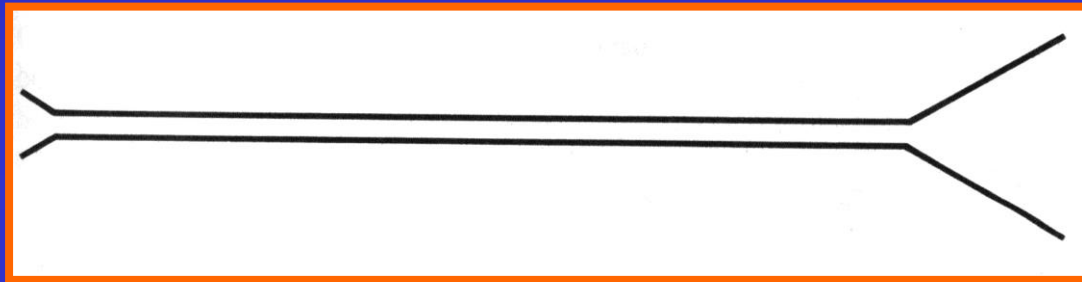


Esso è caratterizzato dall'integrazione nel cromosoma ospite del genoma fagico immediatamente dopo l'infezione. Questa integrazione segue il meccanismo di trasposizione "cut and past".

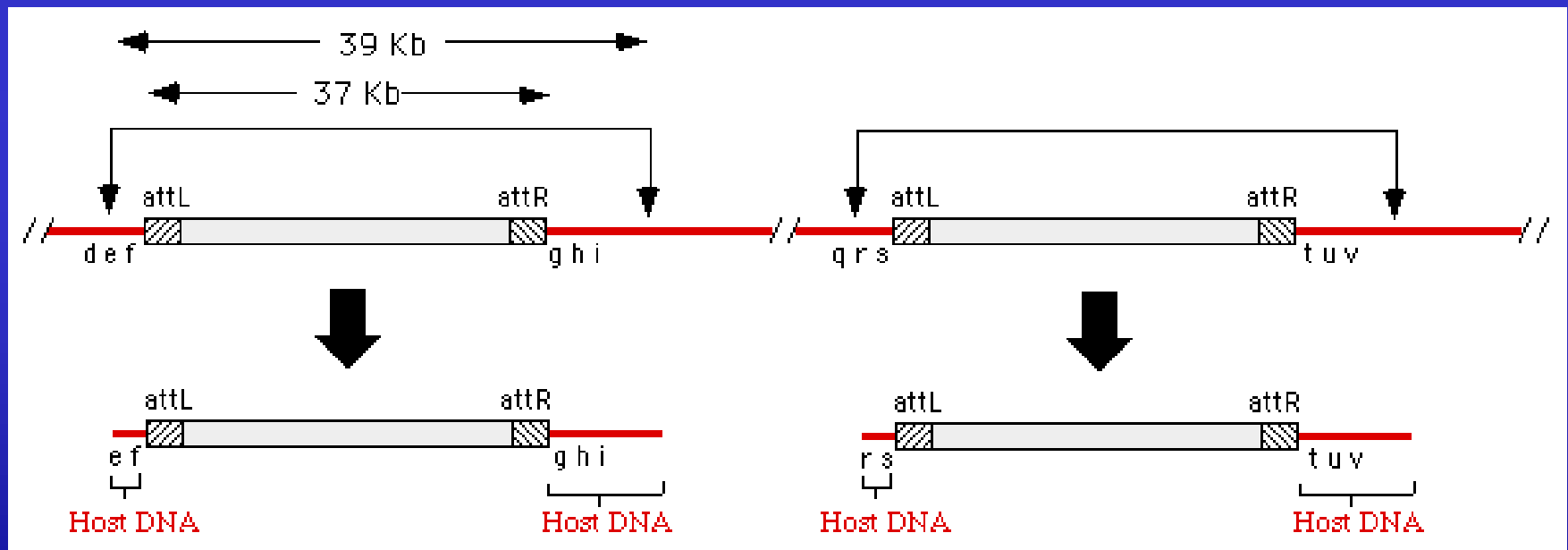
Se l'infezione si blocca a questo livello abbiamo un ciclo di tipo lisogenico

Se viene indotta la fase litica il genoma del fago Mu si diffonde attraverso il meccanismo di trasposizione replicativa

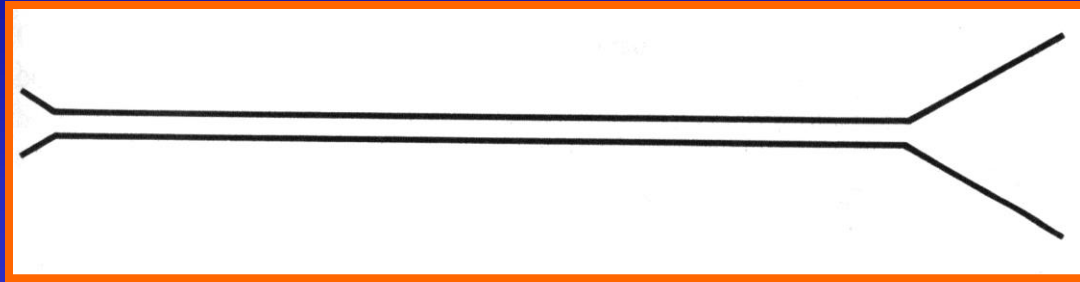
Esperimenti di denaturazione e rinaturazione del genoma fagico



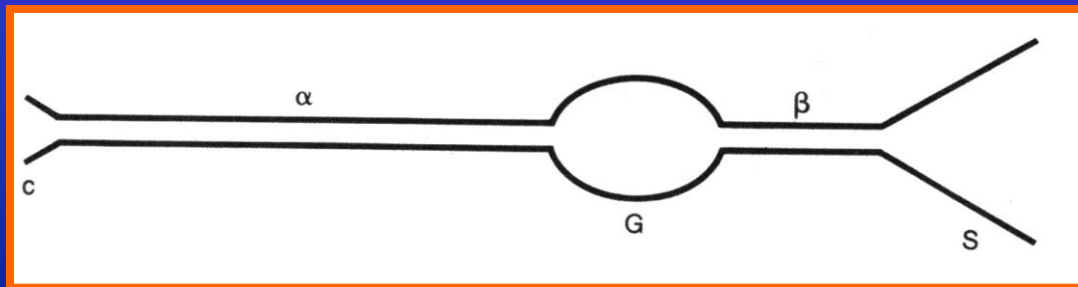
Infine con la fase di impacchettamento il genoma viene estratto dal locus cromosomale in maniera, però, che conserva alle estremità le sequenze del cromosoma di *E.coli* ove si è inserito (in totale 39 kb).



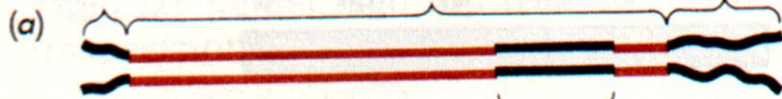
Esperimenti di denaturazione e rinaturazione del genoma fagico



Individuazione del segmento G

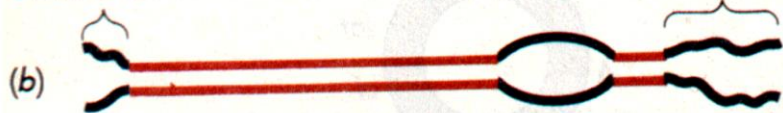


Estremità sinistra divisa
(DNA batterico) DNA
di Mu Estremità destra divisa
(DNA batterico)

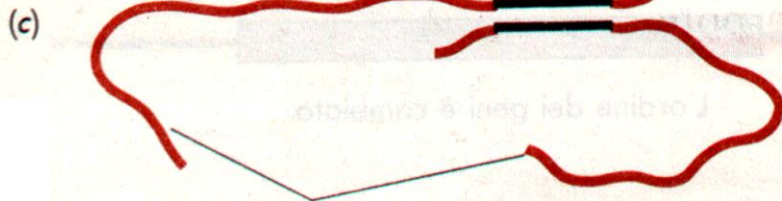


Segmento G nello stesso orientamento su entrambi i filamenti

Estremità sinistra divisa Estremità destra divisa



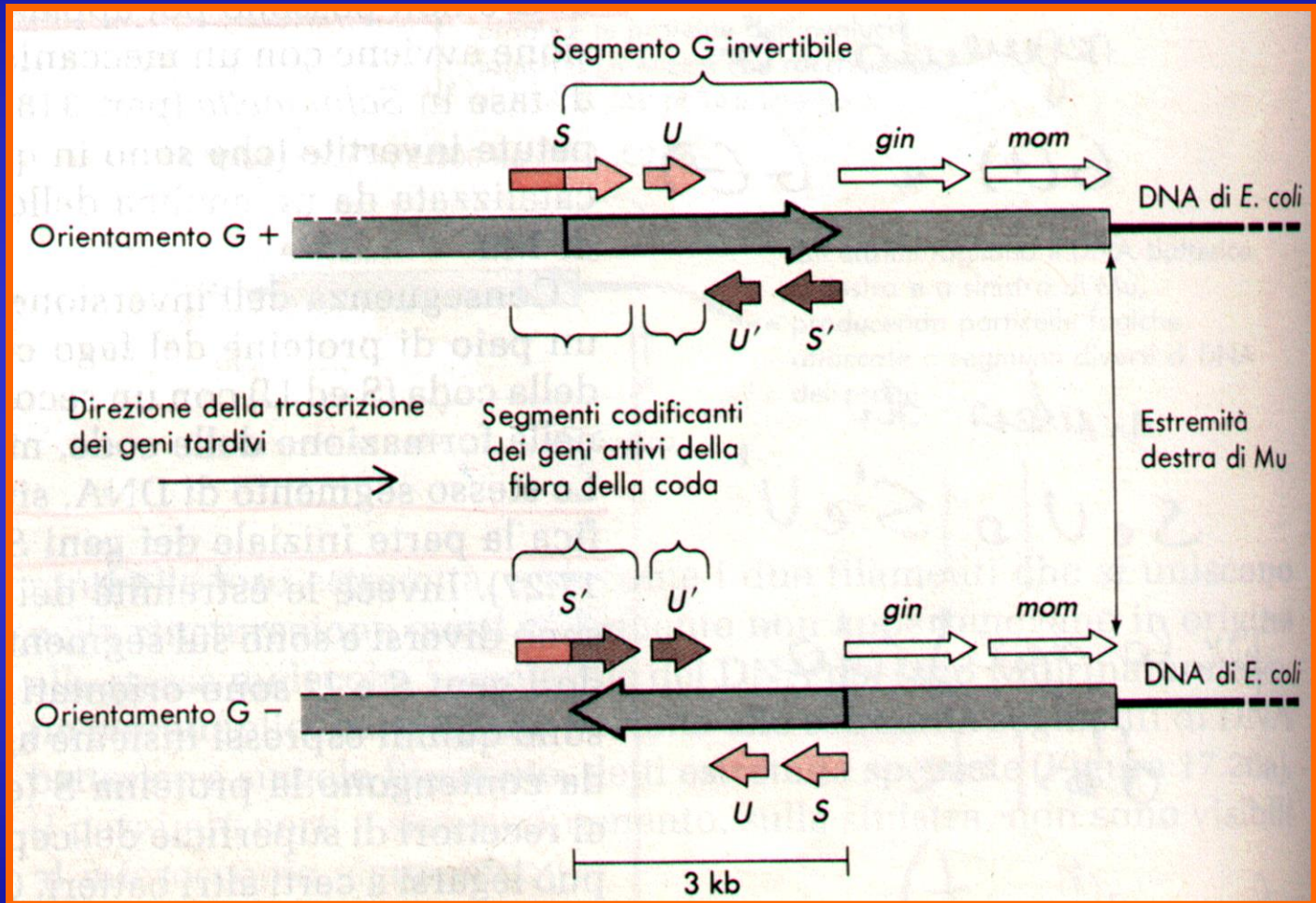
Segmento G che presentava uno dei due filamenti di DNA che si sono rinaturati nell'orientamento + e l'altro nell'orientamento -



Parte rimanente del DNA di Mu, in cui i segmenti omologhi si trovano ai lati opposti del segmento rinaturato G

Il segmento G è risultato essere ben presto un segmento di DNA invertito

L'inversione del segmento G determina un cambiamento nell'espressione dei geni che codificano le proteine della fibra della coda del fago. Queste determinano la specificità d'ospite



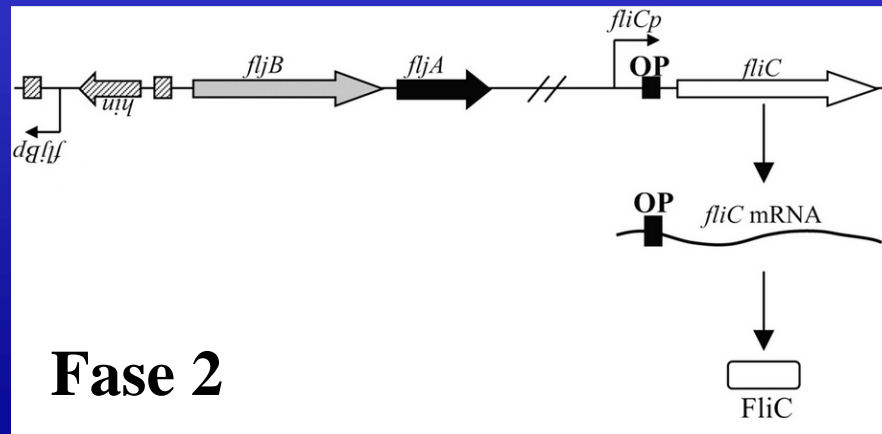
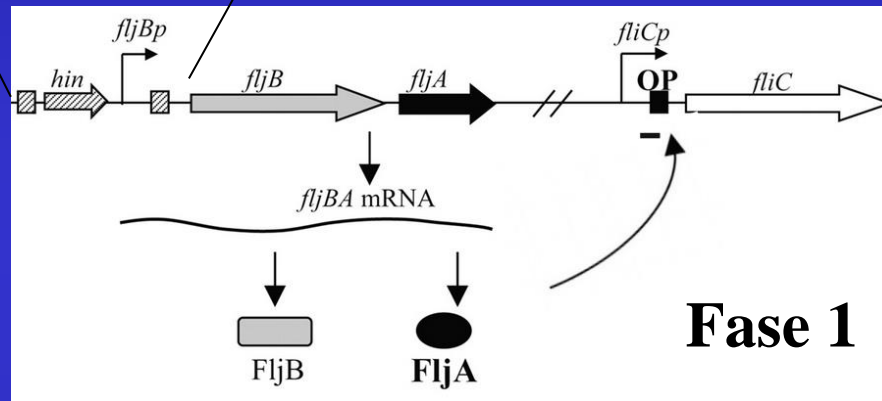
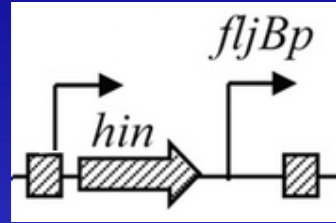
L'inversione è mediata dalla proteina codificata dal gene *g_{in}*

Variazione di fase in *Salmonella*



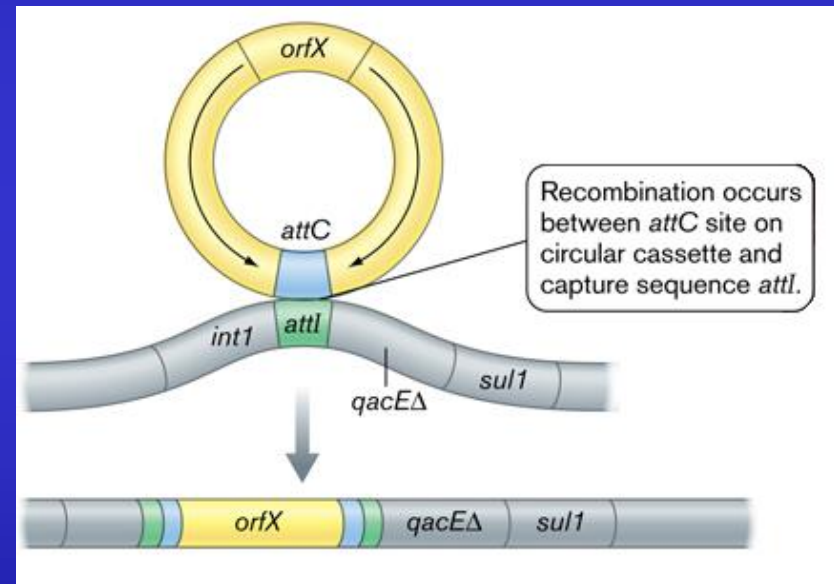
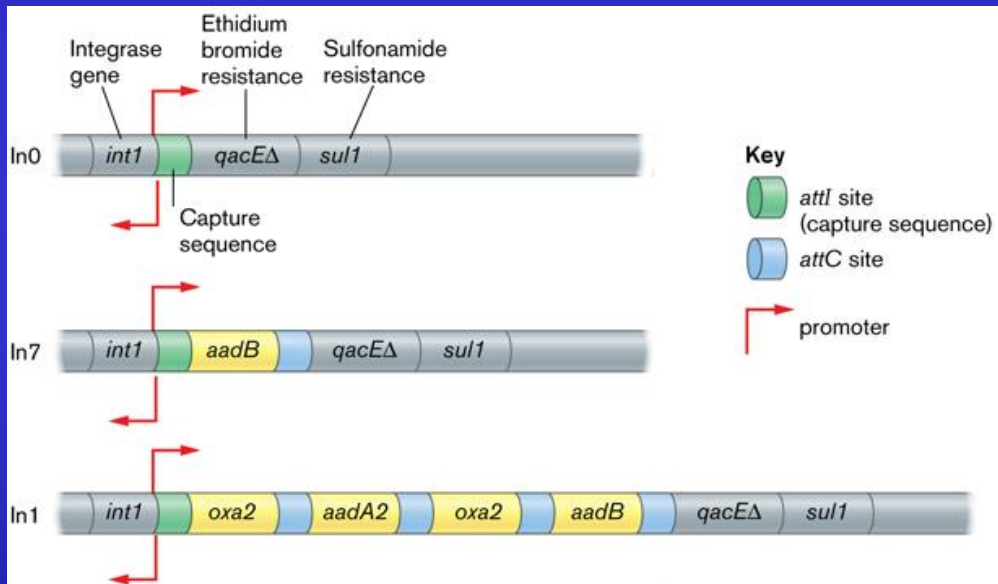
La variazione di fase di *Salmonella* è relativa alla capacità che questo microrganismo ha di modificare periodicamente alcune proteine di superficie. In particolare le proteine con caratteristiche altamente immunogeniche come quelle che costituiscono il flagello. Questa capacità è determinata da un riarrangiamento genetico del *locus* deputato alla sintesi della flagellina.

Riarrangiamento genico nella variazione di fase in *Salmonella*

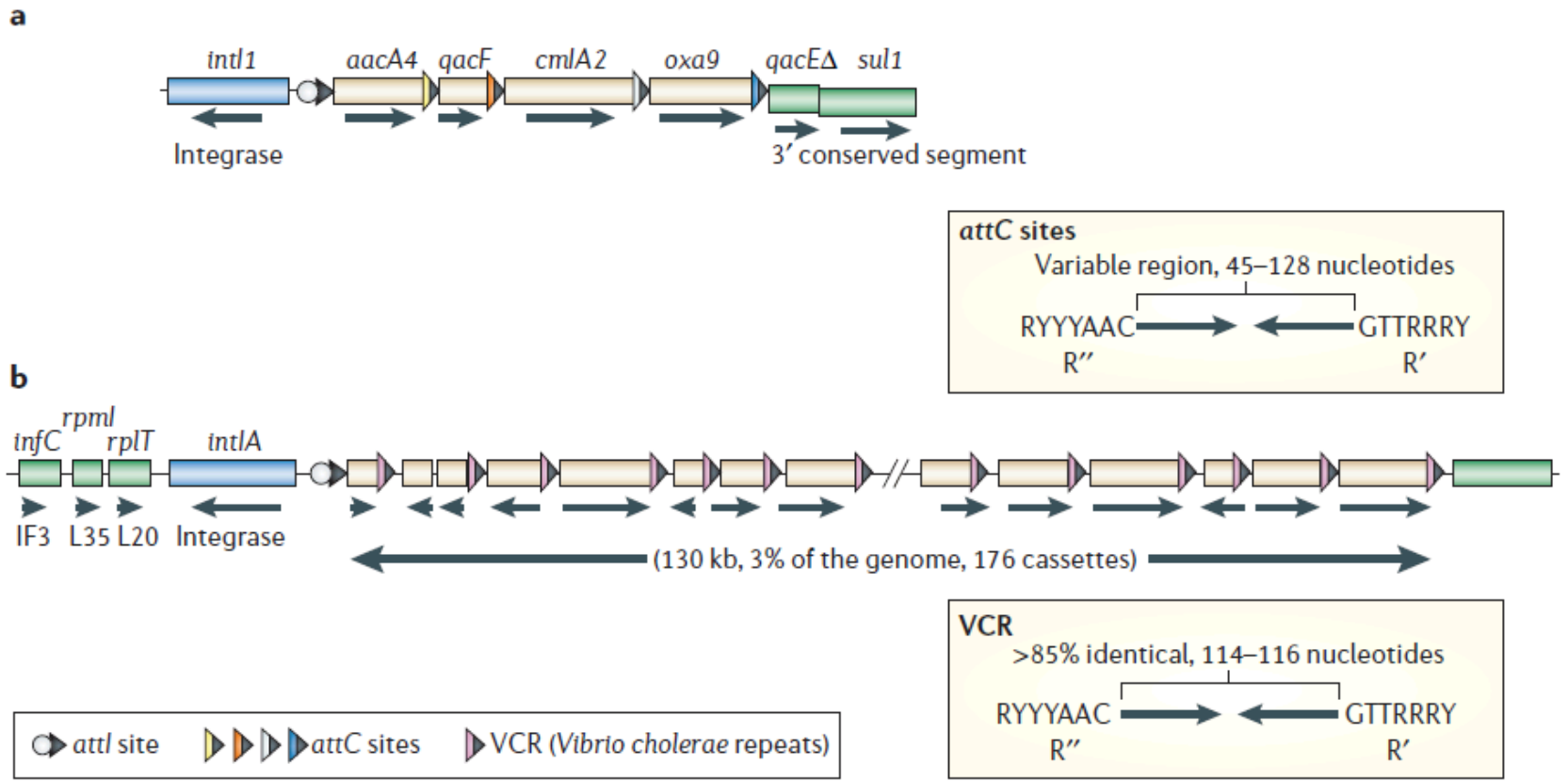


Gli integroni

Gli **integroni** sono elementi genetici che hanno la capacità di recuperare geni di varia origine e farli esprimere.



Gli integroni



- Il gene *intI* codifica per l'integrasi
- Il sito di integrazione delle “cassette” può (*attC*) ha dimensioni che vanno da un minimo di 59 bp ad un massimo di 149 bp..... Ma posseggono una sequenza consensus di 7 bp del tipo GTTRRRY (dove R= A o G, e Y= C o T)
- I geni al 3' codificano per la resistenza ai composti quaternari dell'ammonio (*qacEΔI*), al sulfametossazolo (*sulI*), mentre *orf5* non è noto

I genomi dei microrganismi, in particolare dei batteri, sono molto ricchi di sequenze ripetute che sono spesso costituite dai trasposoni

Allo stesso tempo i trasposoni sono un ottimo esempio di ricombinazione sito specifica

I trasposoni sono elementi genetici in grado di “saltare” da un sito genico ad un altro in maniera del tutto autonoma.

La loro scoperta risale agli anni '50 quando Barbara McClintock li individuò nel genoma di granturco come agenti mutageni. In effetti il loro spostamento implica l'inserzione, e quindi l'interruzione, dell'integrità di un eventuale gene determinandone l'inattivazione



Nobel 1983



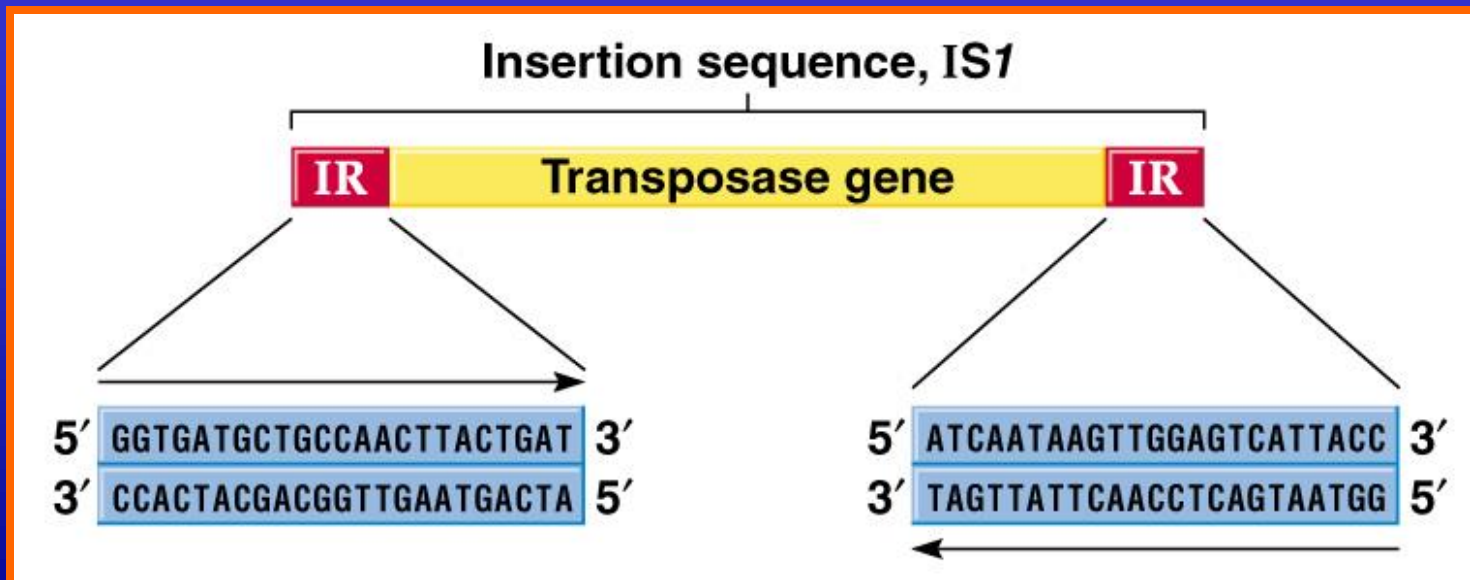
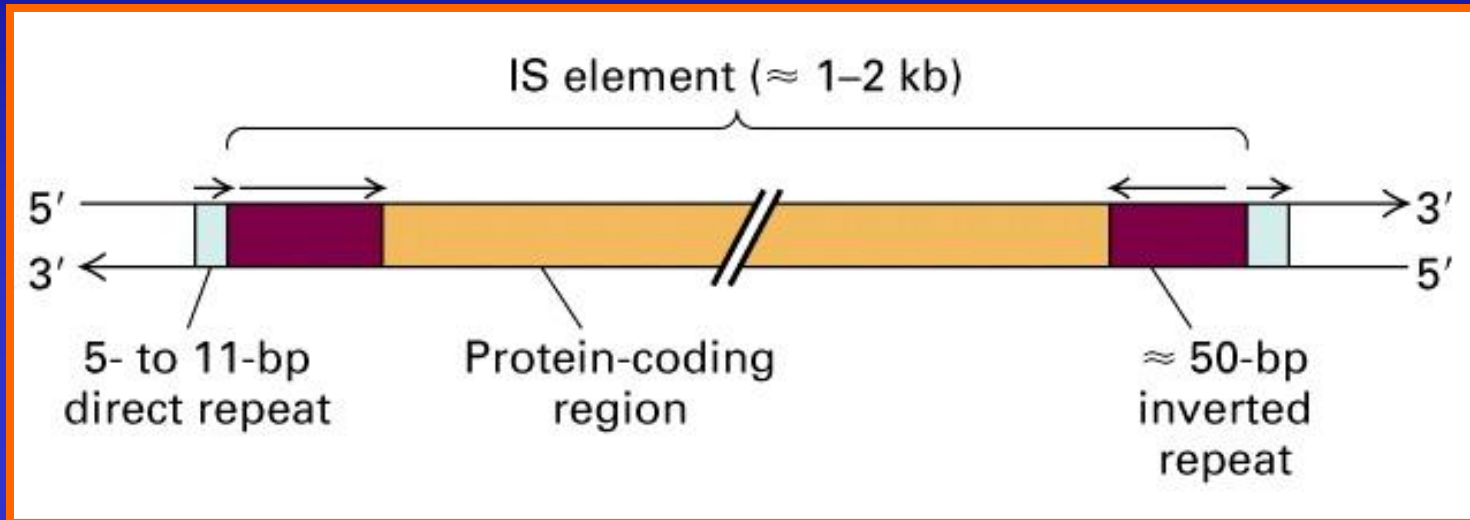
Ci vollero altri 20 anni prima di individuare e caratterizzare i trasposoni batterici che, oggi rappresentano il modello di studio di riferimento

I trasposoni possono essere classificati in tre gruppi in funzione delle loro caratteristiche strutturali:

- Le sequenze di inserzione (IS)**
- I trasposoni composti**
- I trasposoni non composti**

Tutti sono caratterizzabili ed identificabili perché presentano alle loro estremità delle sequenze direttamente ripetute e, procedendo verso il loro centro, due sequenze ripetute ma invertite. Inoltre tra queste sequenze deve essere presente un gene in grado di codificare la trasposasi, ovvero l'enzima responsabile del loro “movimento”.

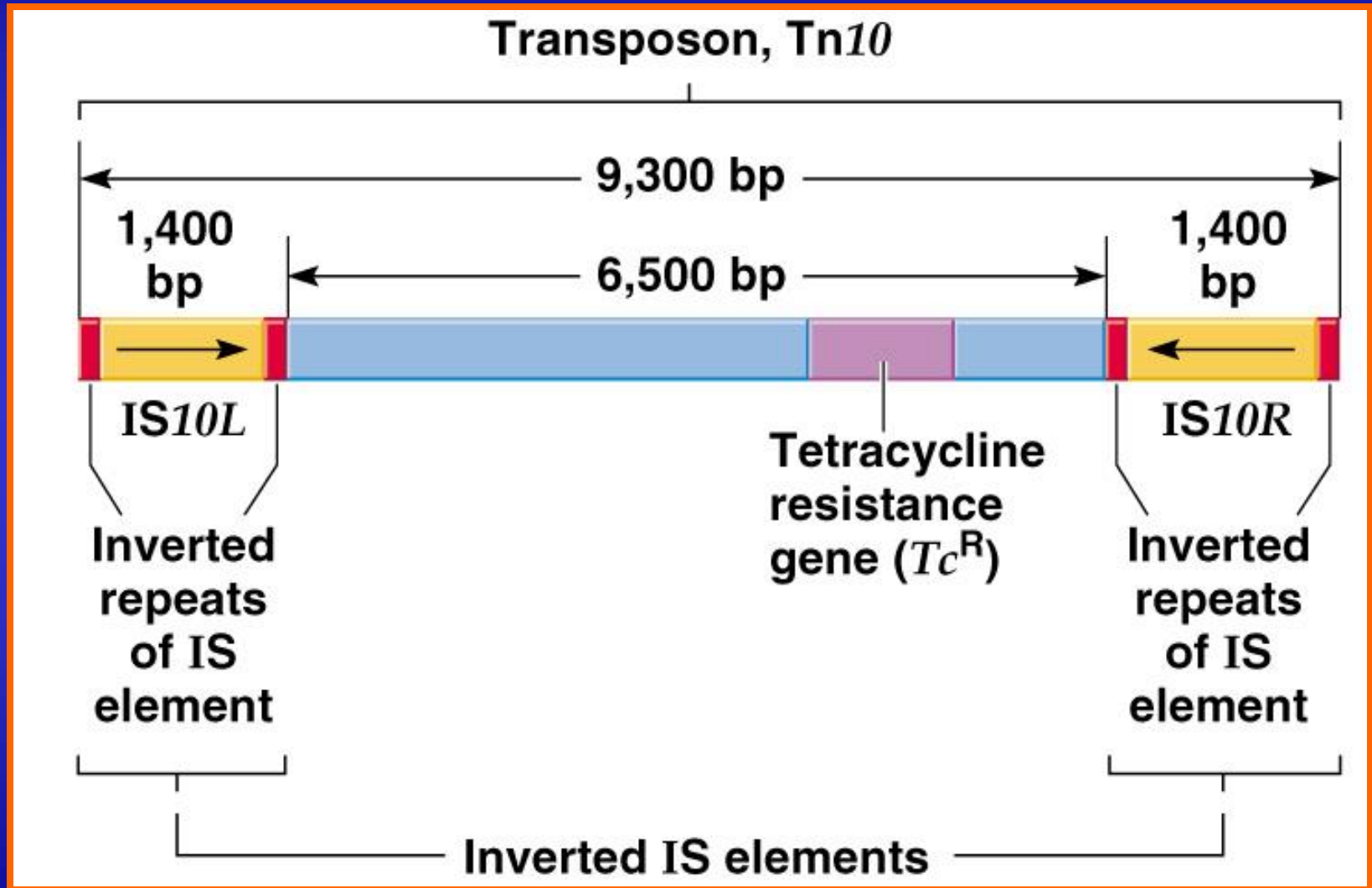
SEQUENZE DI INSERZIONE (IS)



SEQUENZE DI INSERZIONE (IS)

- Sono il tipo più semplice di trasposoni. Si trovano, a volte in numero molto elevato, sia nel cromosoma batterico sia nelle molecole epigenetiche come i plasmidi.
- Codificano solamente il gene per la mobilizzazione.
- Hanno dimensioni che vanno da 768 bp a 5 kb.
- IS1 è stata la prima IS ad essere stata identificata nell'operone galattosio di *E. coli*. Essa presenta dimensioni di 768 bp ed è presente in un numero di copie che va da 4 a 19 nel cromosoma di *E. coli*.
- Tutte le IS presentano alle loro estremità delle sequenze ripetute ed invertite (ITRs).

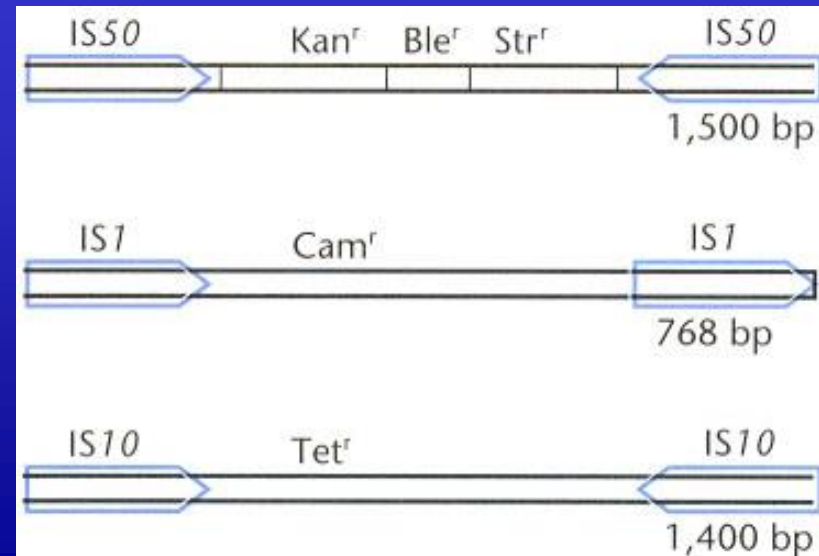
TRASPOSONI COMPOSTI



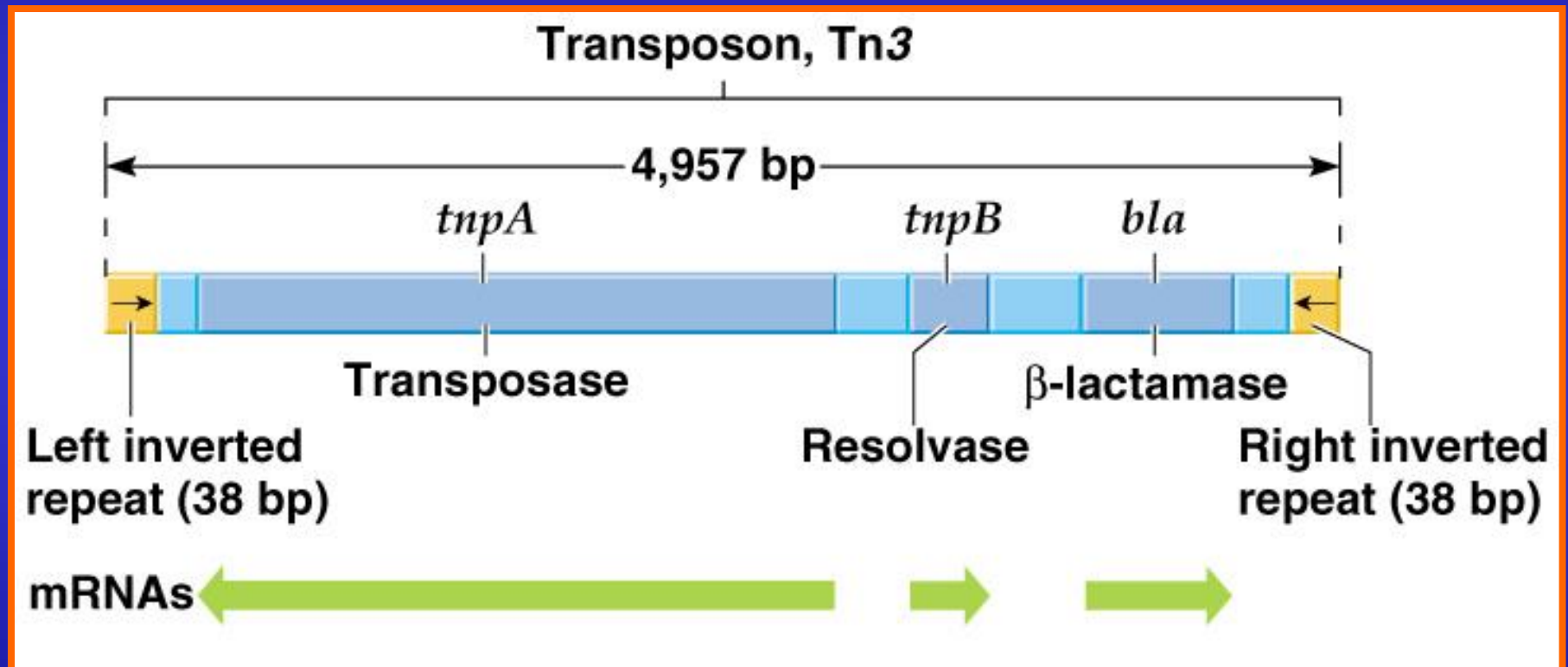
TRASPOSONI COMPOSTI

- Essi contengono e trasportano geni (come ad esempio quelli per la resistenza agli antibiotici) fiancheggiati ad entrambe le estremità dal elementi IS.
- Tn10 è un esempio di trasposone composto. Le sue dimensioni sono di 9.3 kb di cui 6.5 kb di DNA centrale (contenente il gene per la resistenza alla tetraciclina) ed un totale di 1.4 kb di elementi IS
- Almeno una IS fornisce la trasposasi mentre entrambe forniscono le sequenze ripetute ed invertite

• Gli elementi IS alle estremità di un trasposone composto possono essere disposte in direzioni opposte (Tn10 e Tn5) oppure nella medesima orientamento (Tn9)



TRASPOSONI NON COMPOSTI



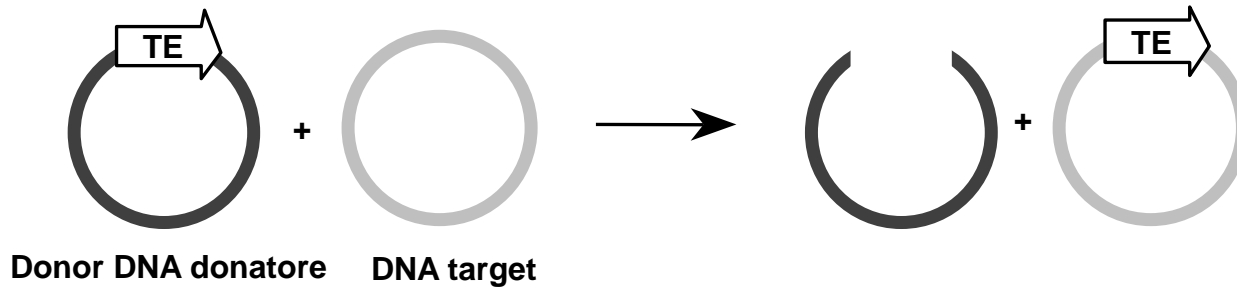
TRASPOSONI NON COMPOSTI

- Essi contengono geni (come quelli che determinano la resistenza agli antibiotici) ma non terminano con delle sequenze IS.
- Le estremità di questi trasposoni presentano sequenze ripetute di dimensioni differenti da quelle caratteristiche le le sequenze IS.
- Tn3 è un esempio di trasposone non composto. Esso è di 5 kb e presenta sequenze ripetute ed invertite di 38-bp. Inoltre presenta tre geni per la sintesi di una β -lactamase, di una transposase e di una resolvase.

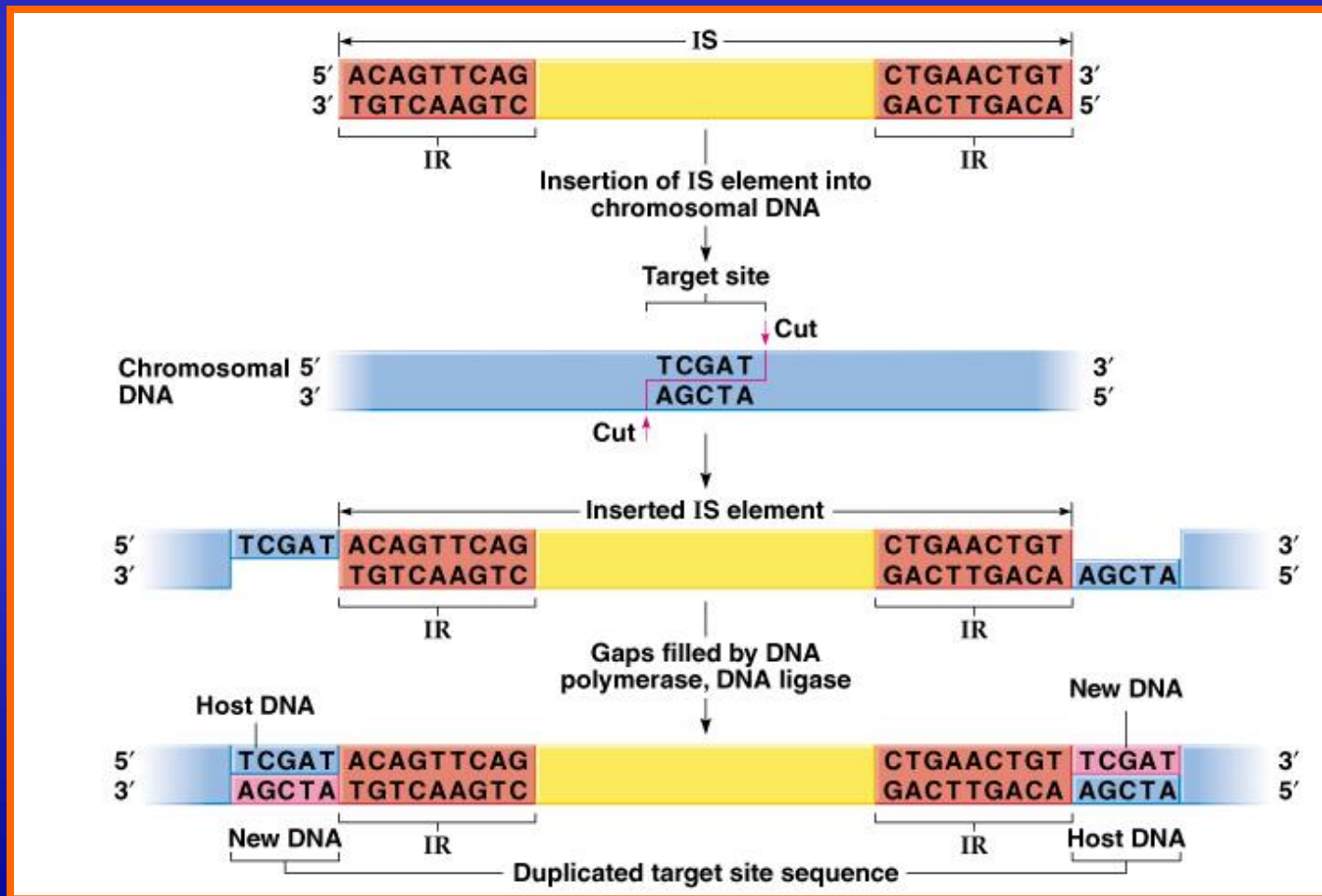
I meccanismi di trasposizione ipotizzati sono due:

- La trasposizione “cut and past”**
- La trasposizione replicativa**

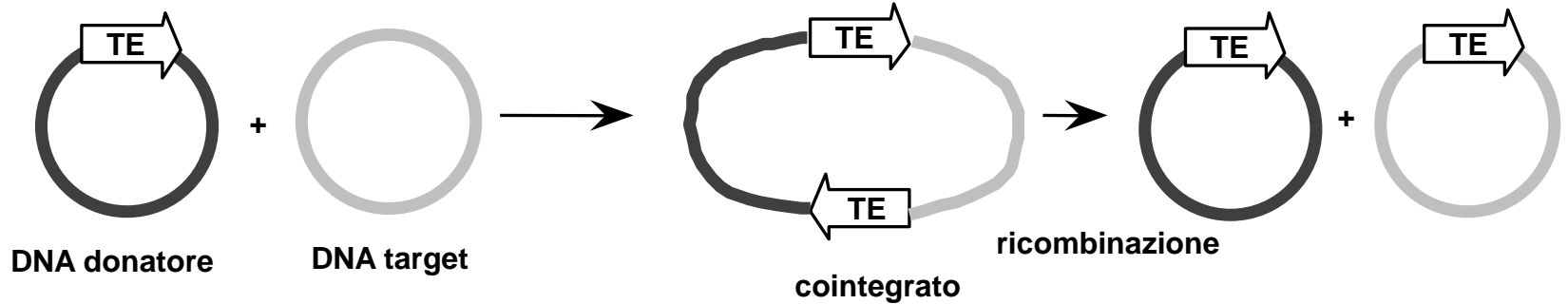
Nel primo caso il Trasposone “salta” letteralmente da un sito all’altro



Nella replicazione “cut and past” il processo è sostanzialmente lo stesso Cambia solamente che la trasposasi effettua un taglio su entrambi i filamenti alle estremità del trasposone !!!

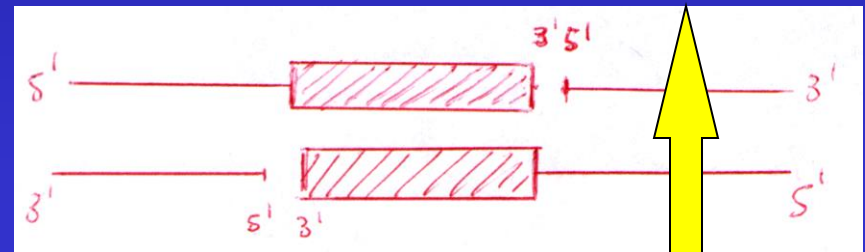
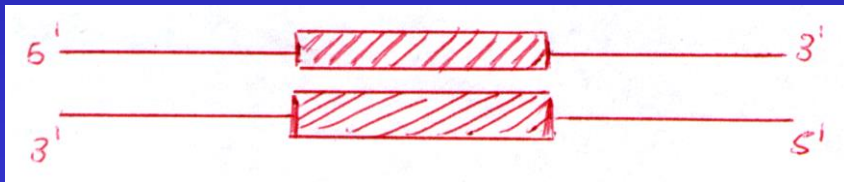


Nel secondo caso il DNA donatore, contenente il trasposone, mantiene una copia dello stesso permettendone la “replicazione” di uno nuovo in un sito target (il DNA accettore)

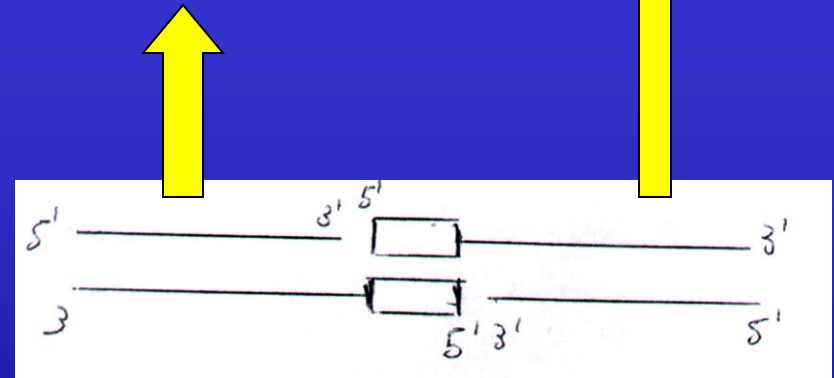
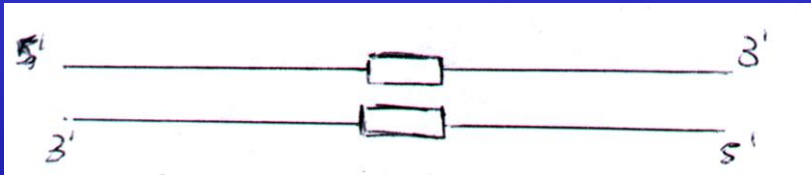


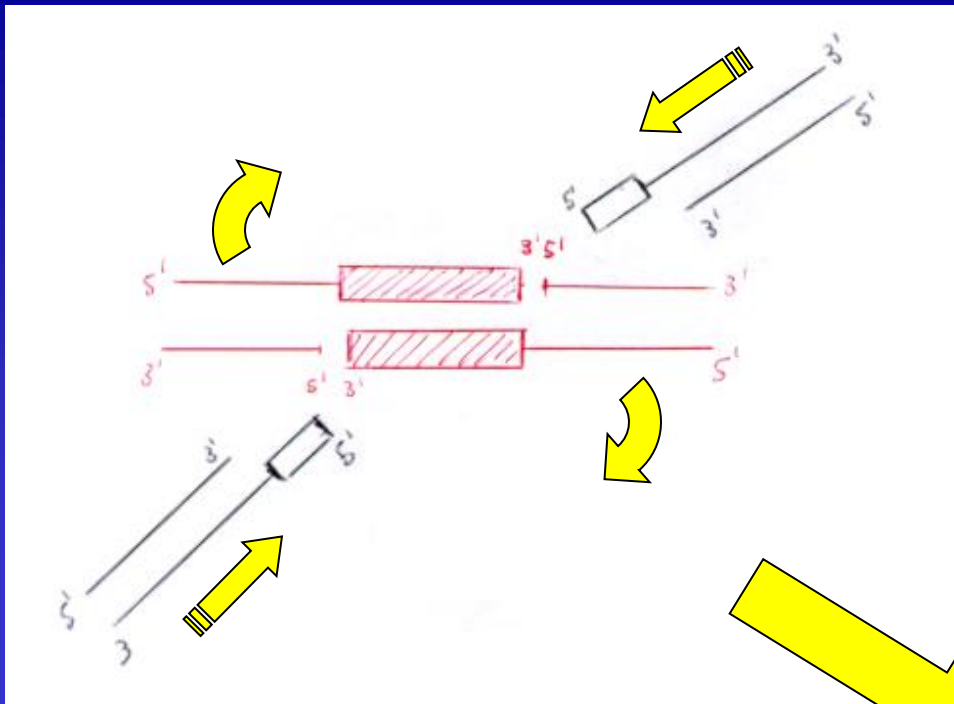
MECCANISMI DI TRASPOSIZIONE

DNA donatore + Tn



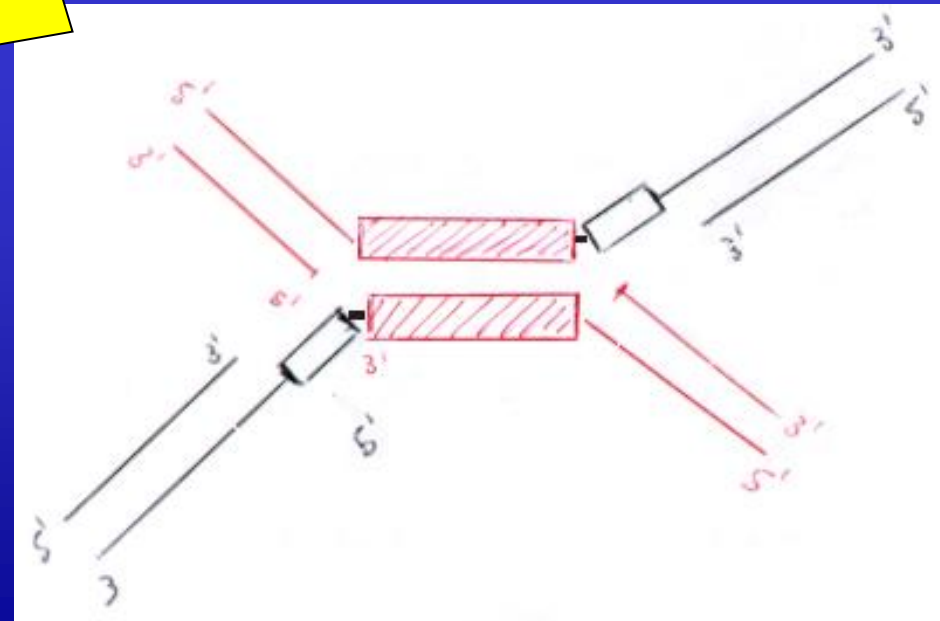
DNA target



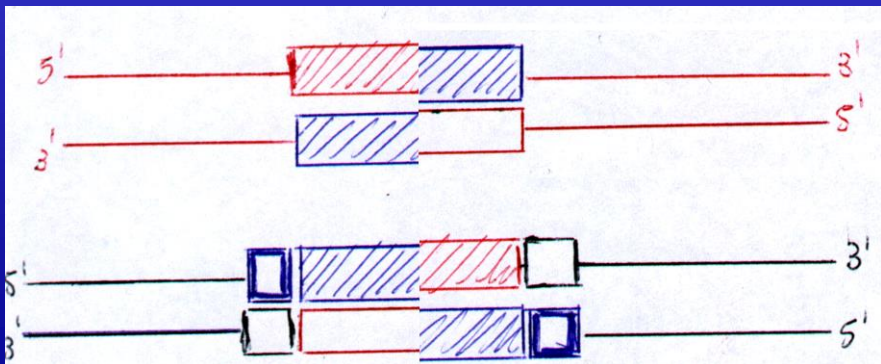
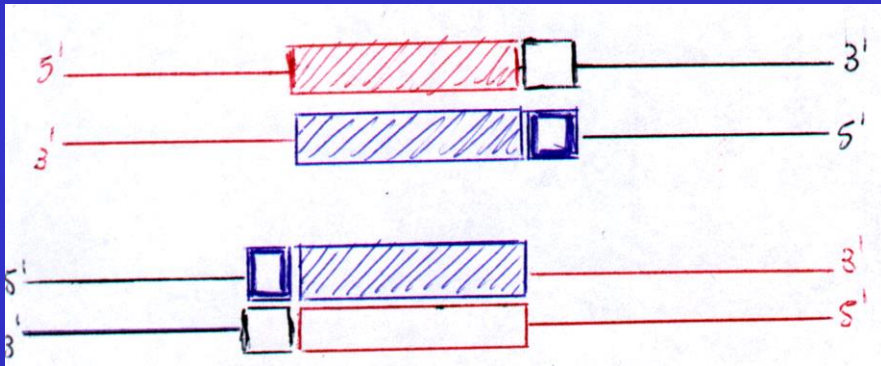
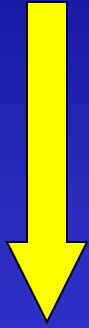


Le estremità 5' del DNA target vengono ligate alla estremità 3' libere del trasposone

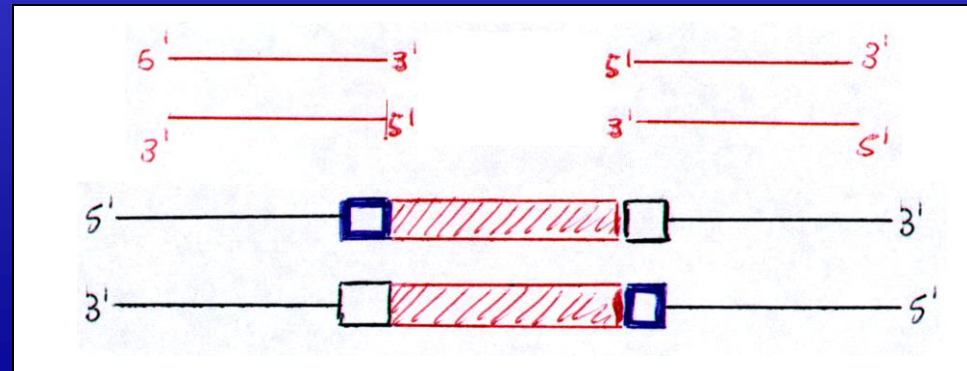
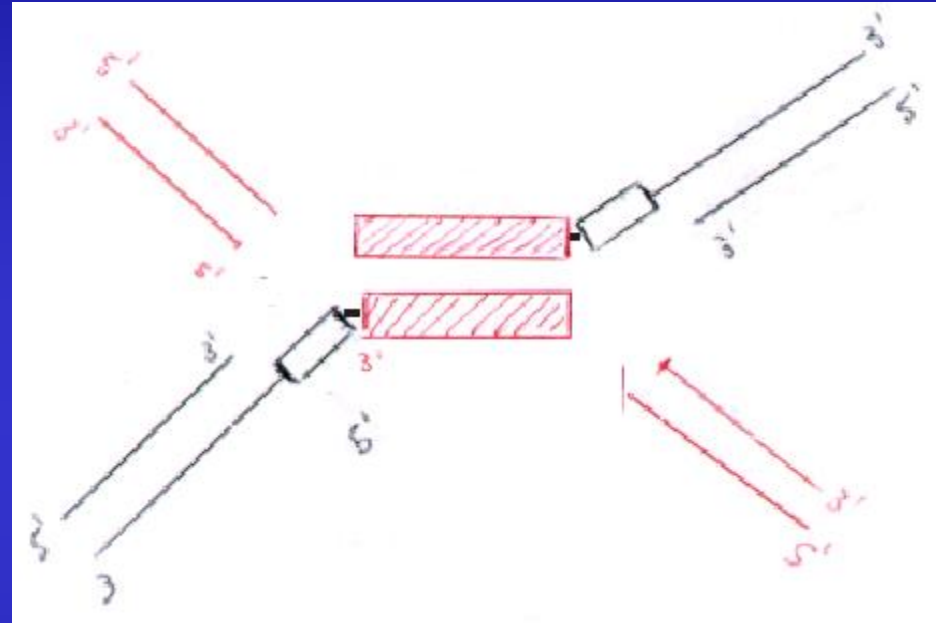
Si forma così l'intermedio di Shapiro che può essere risolto in due modi differenti a seconda del tipo di trasposone e trasposasi corrispondente

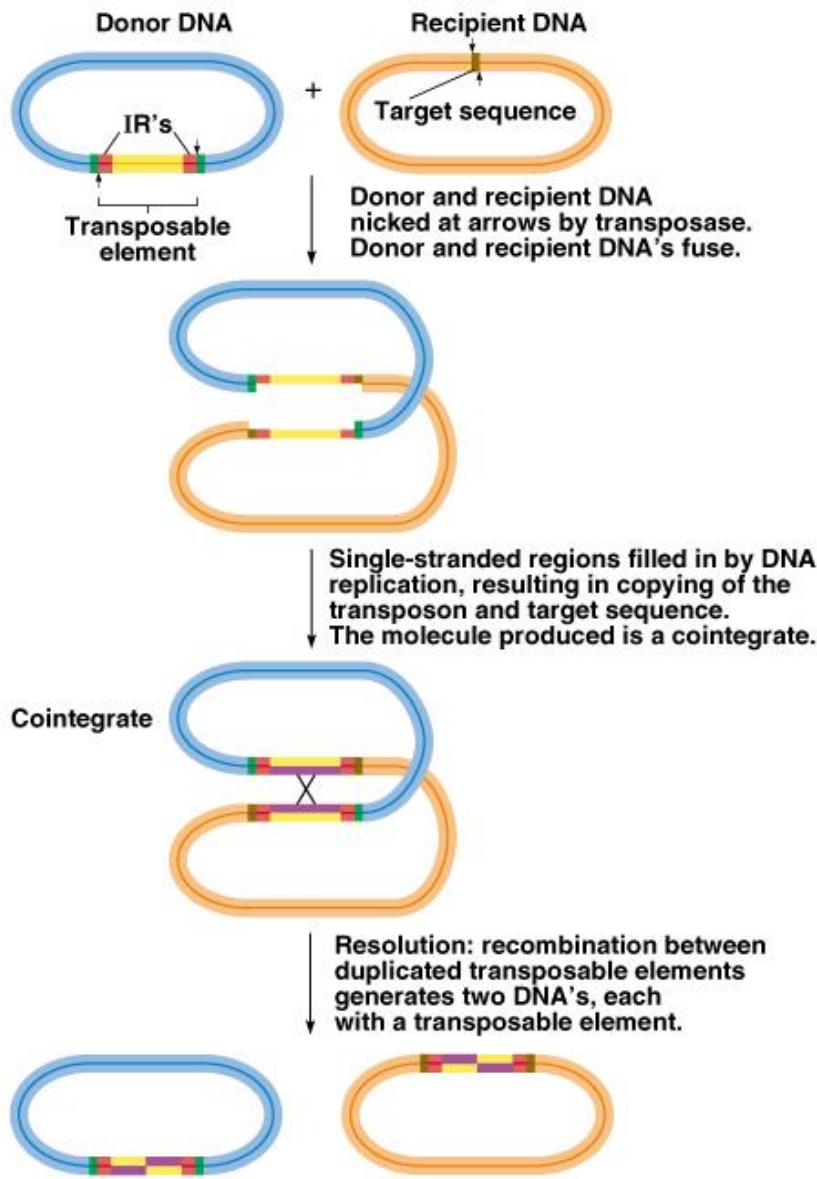


Replicazione del DNA a mo' di forche replicative



Taglio del II° filamento del DNA donatore





Nella trasposizione replicativa la trasposasi taglia, su entrambi i filamenti, il sito del DNA target in modo asimmetrico lasciando un filamento sporgente di tipo 5'

La stessa trasposasi effettua dei tagli su singolo filamento alle estremità delle sequenze ripetute invertite in modo da lasciare delle estremità sporgenti del trasposone di tipo 3'

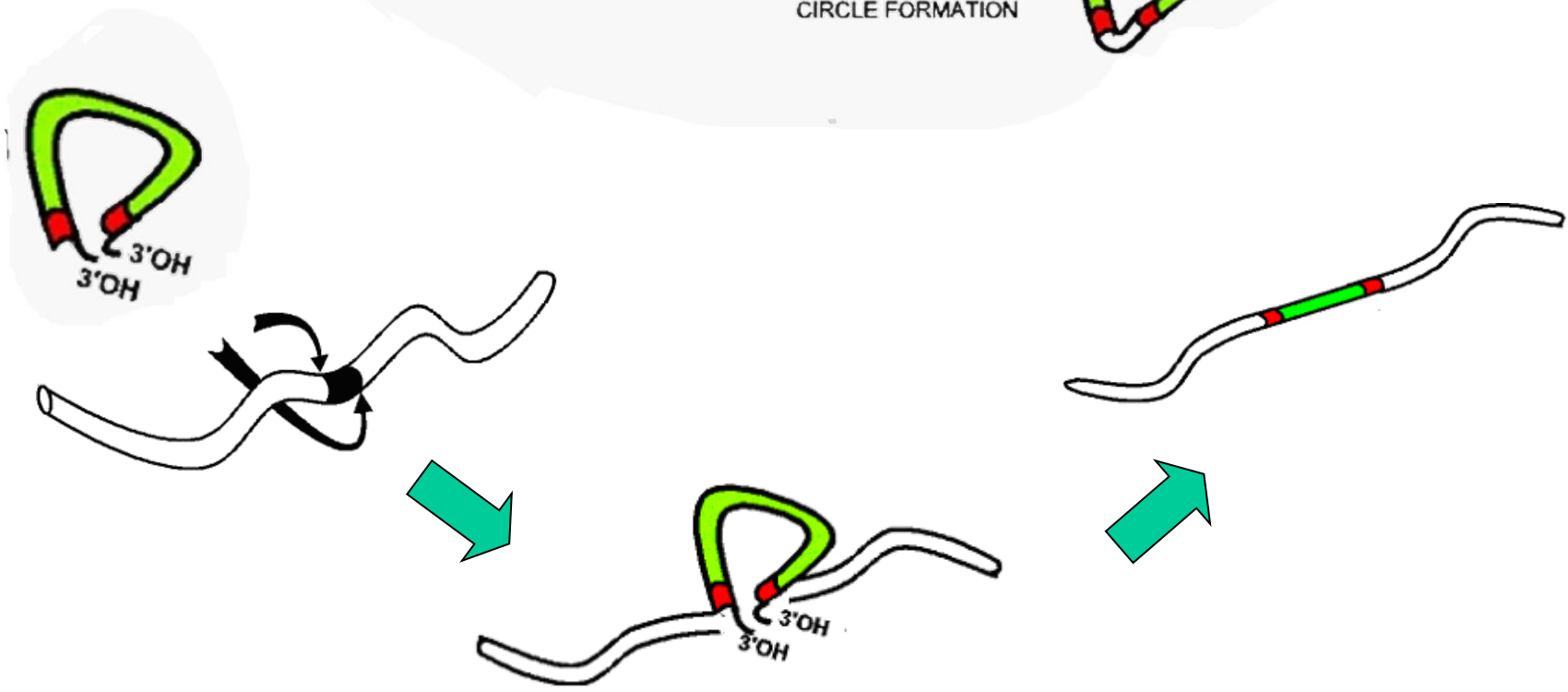
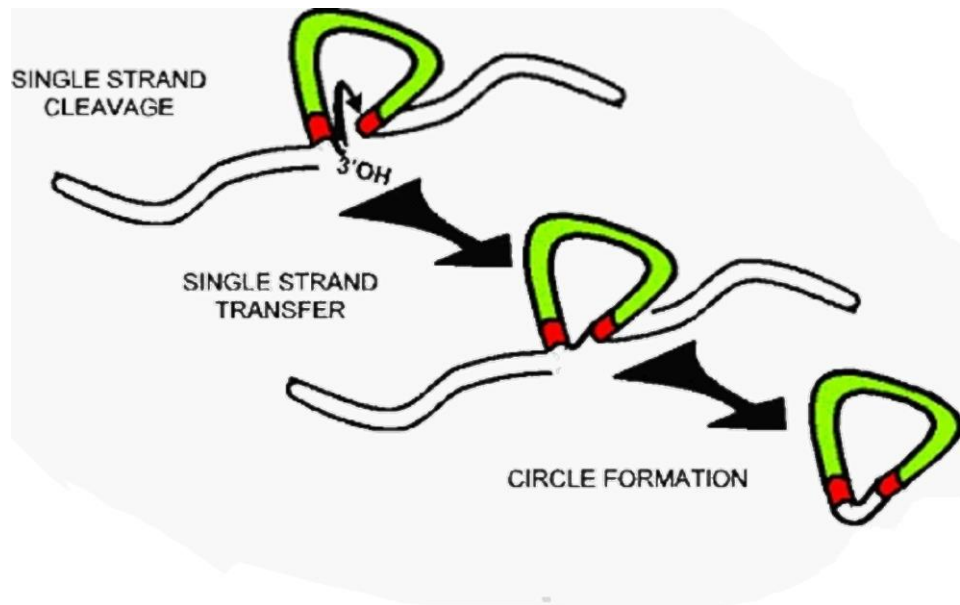
Infine, lo stesso enzima unisce le estremità 5' del DNA target con le estremità 3' libere del trasposone.

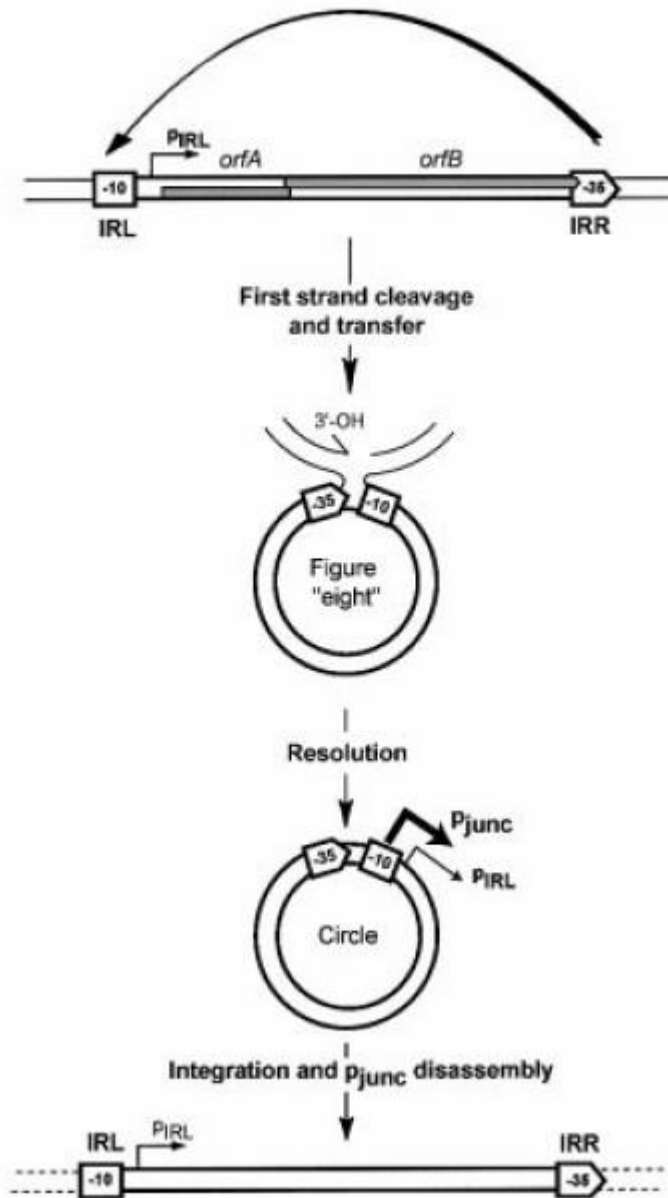
Le estremità 3' del DNA target funzionano da innesco per l'attività della DNA polimerasi III

Si viene a formare un cointegrato che viene risolto dal normale sistema di ricombinazione omologa della cellula

Negli ultimi anni sta prendendo quota un modello alternativo o complementare a quello del “cut and past”.

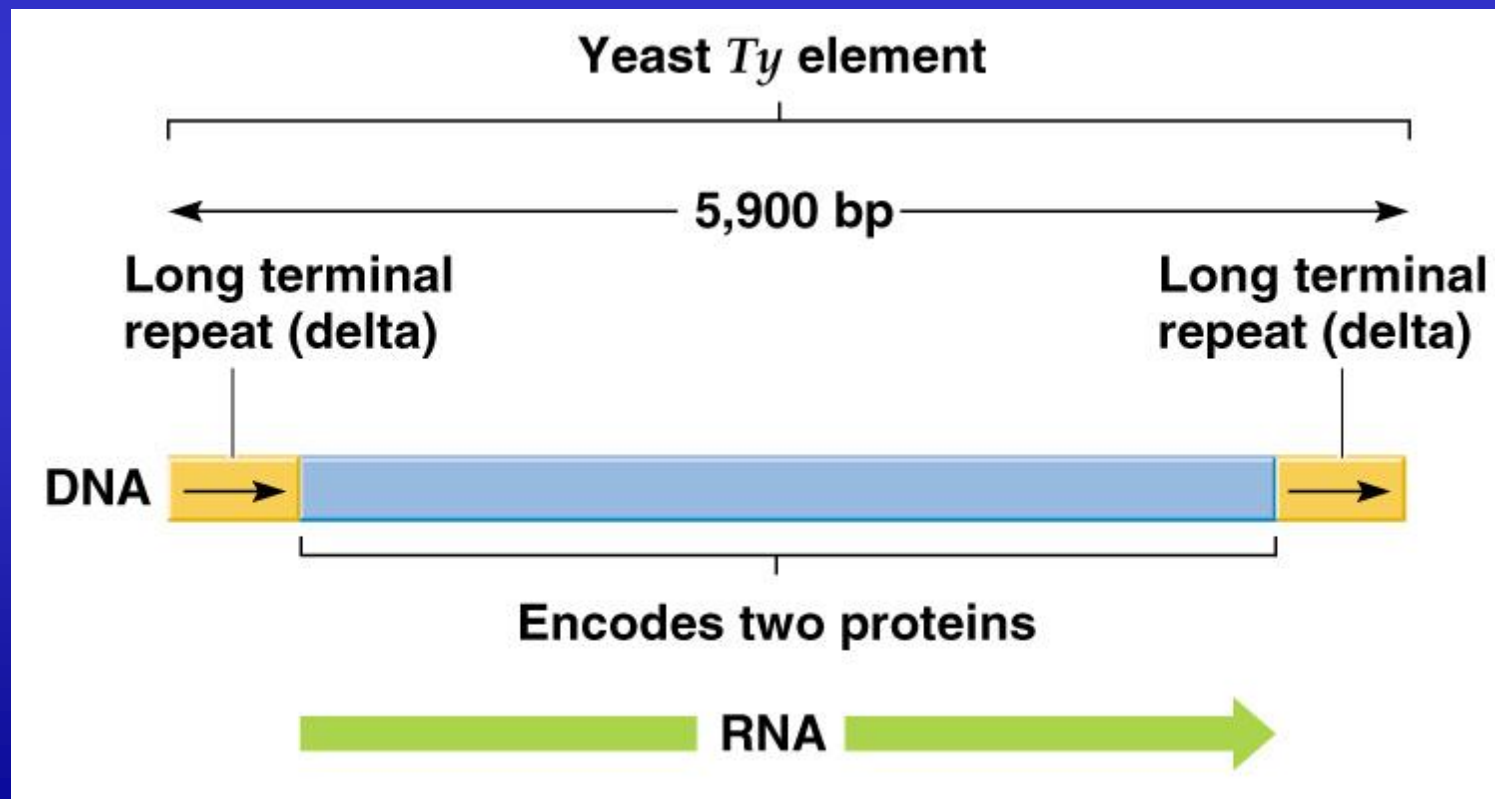
Questo nuovo modello prevede la formazione di un intermedio circolare del trasposone che si forma in seguito alla excisione dal sito dal DNA donatore. In seguito questo elemento circolare sarebbe indotto ad integrarsi, mediante un processo di tipo sito specifico dipendente dalla trasposasi, in un nuovo sito del DNA target !!!!!





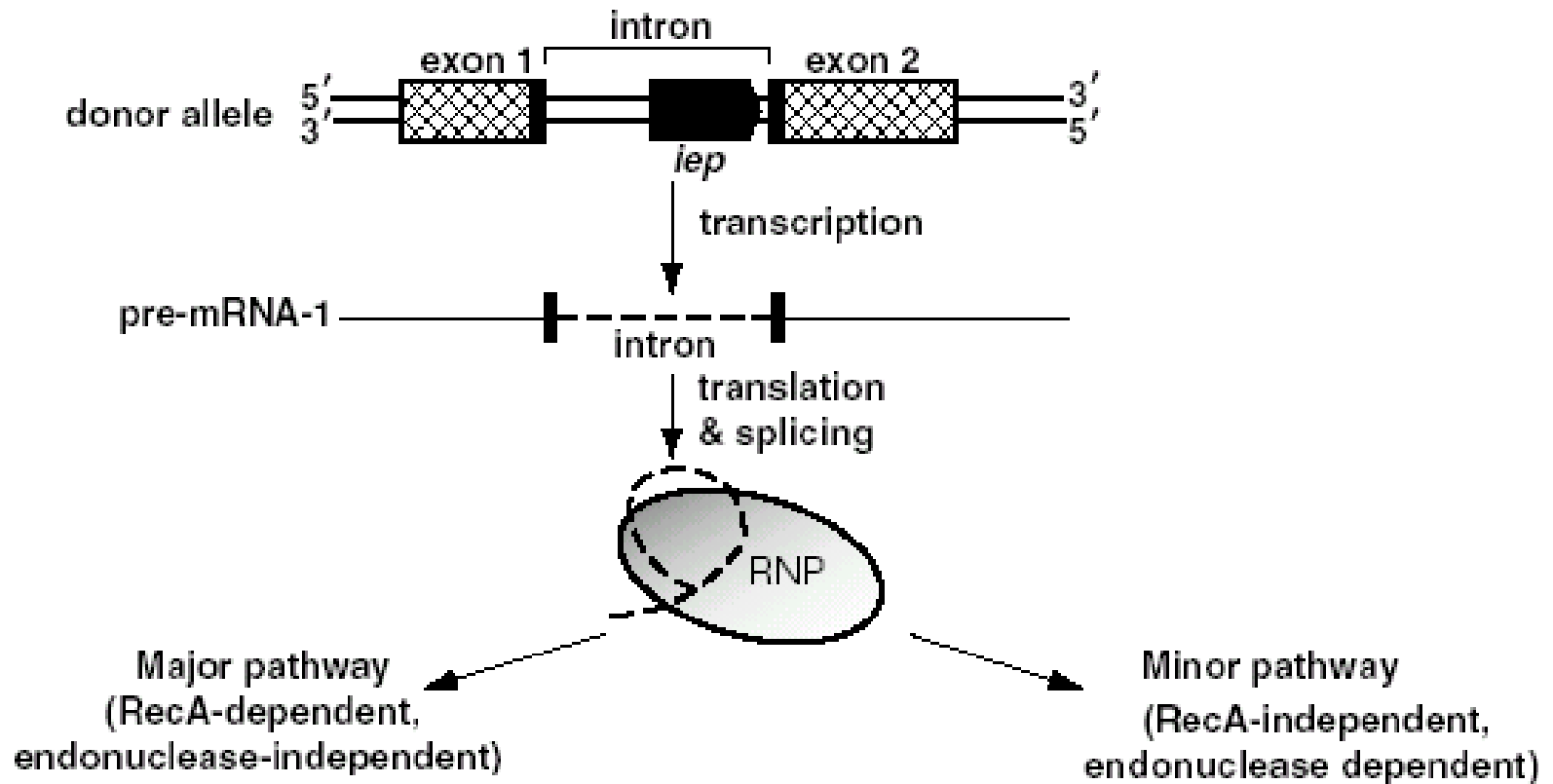
Formazione di un promotore specifico per la forma circolare

Esistono infine, in alcuni microrganismi superiori, degli elementi genetici che, strutturalmente, richiamano i trasposoni ma che sfruttano l'RNA (e il corrispettivo cDNA) per il processo di “trasposizione”. Questi elementi vengono definiti perciò “retrotrasposoni”



I RETROTRASPOSONI

Un esempio classico: il retrotrasposone L1.LtrB di *Lactococcus lactis*



La proteina Iep ha attività di retrotrascrittasi, maturasi e endonucleasi

