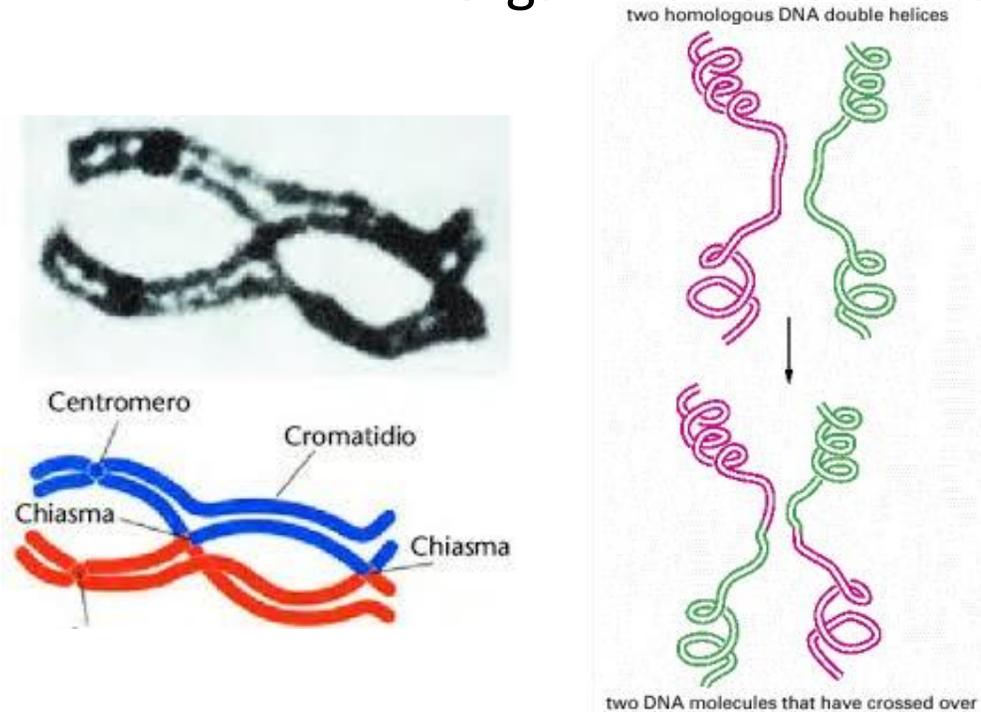


# Ricombinazione de DNA

Processi che mediante rotture e unioni di molecole di DNA ne modificano l'organizzazione strutturale e anche l'informazione genetica



*(Recombination is the production of new DNA molecule(s) from two parental DNA molecules or different segments of the same DNA molecule)*

1. Durante la prima divisione **meiotica** i **cromosomi omologhi si appaiano** e possono avvenire degli **scambi tra tratti di DNA** uguali o simili in sequenza fra cromatidi non fratelli formando dei punti di incrocio chiamati **CHIASMI**. Il meccanismo viene chiamato **CROSSING OVER**. La funzione principale è quella di creare nuove combinazioni di informazione genetica che portino ad aumentare la variabilità genetica.
2. Durante la **riparazione del DNA** che presenta rotture nel doppio filamento avvengono processi di ricombinazione.

- Genera nuove combinazioni geniche /alleleiche
- Genera nuovi geni
- Integra specifici elementi di DNA
- Meccanismo di riparazione del DNA

# Tipi di ricombinazione

- Ricombinazione omologa o generalizzata (intramolecolare e intermolecolare)

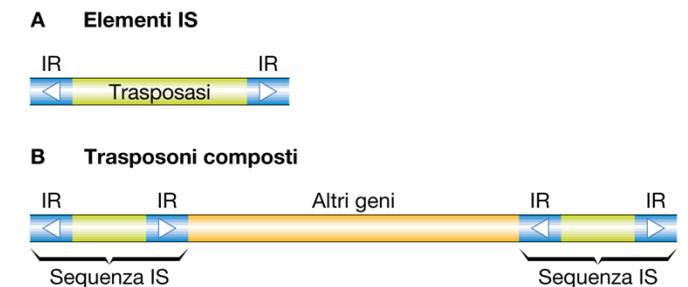
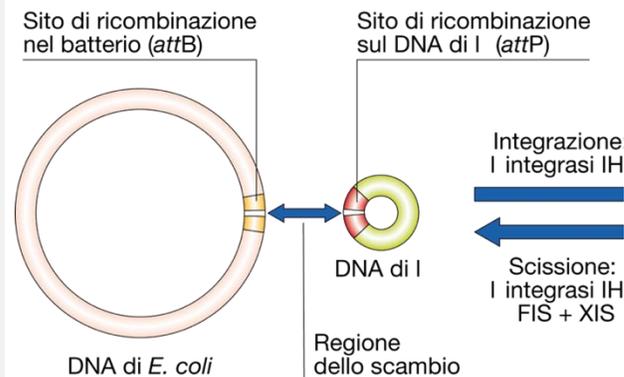
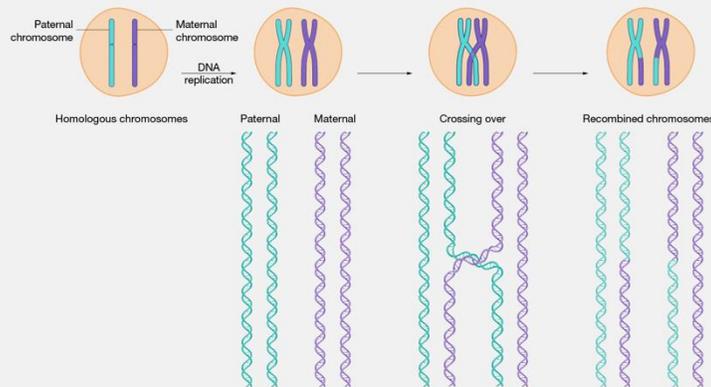
Fra molecole o regioni di DNA che possiedono ampi tratti con alta similarità di sequenza

- Ricombinazione sito-specifica

Gli scambi avvengono solo a livello di sequenze specifiche

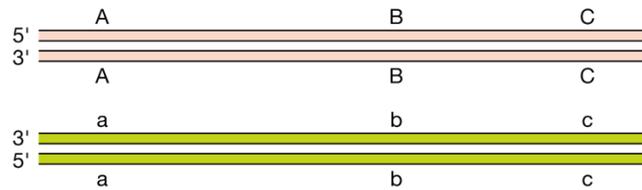
- Trasposizione DNA

Regioni di DNA non codificante con capacità di spostarsi: elementi mobili

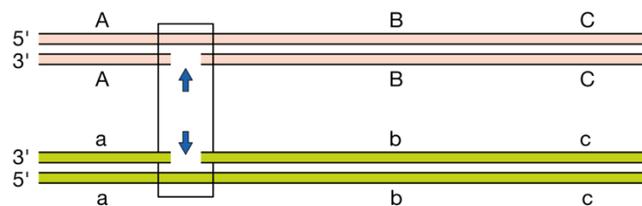


# 1. Ricombinazione omologa o generalizzata

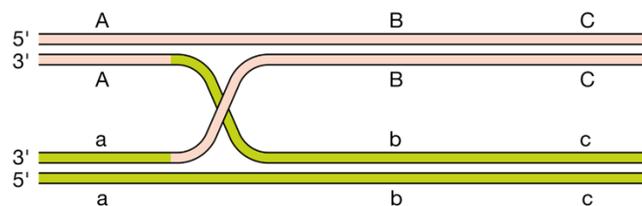
Appaiamento di due molecole di DNA omologhe



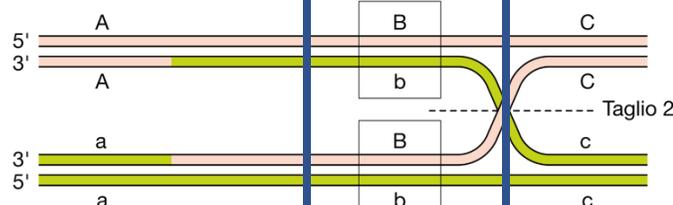
Rotture su un filamento di ciascuna molecola



Invasione dei filamenti



Migrazione della giunzione



Allineamento delle 2 sequenze omologhe che devono avere sequenze identiche o altamente simili lunghe almeno 100 nt.

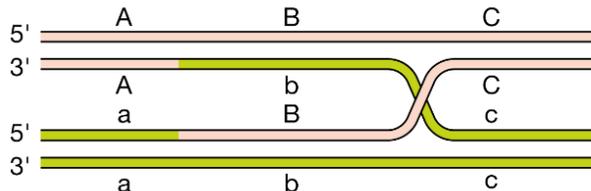
Introduzione di rottture nei singoli filamenti delle molecole

Formazione di una **Giunzione di Holliday**: l'estremità di una estremità 3'OH del filamento tagliato di una delle molecole di DNA trova la sequenza complementare sulla molecola di DNA omologa. Come risultato le due molecole sono ora congiunte.

La **Giunzione di Holliday** può scorrere lungo il DNA (ATP dependent) mettendo di fronte anche sequenze non omologhe formando delle strutture chiamate eteroduplex.

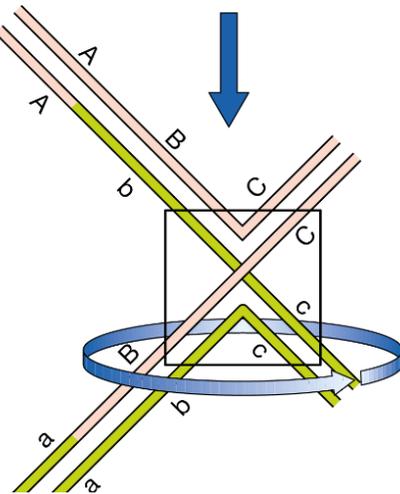
# 1. Ricombinazione omologa o generalizzata

B



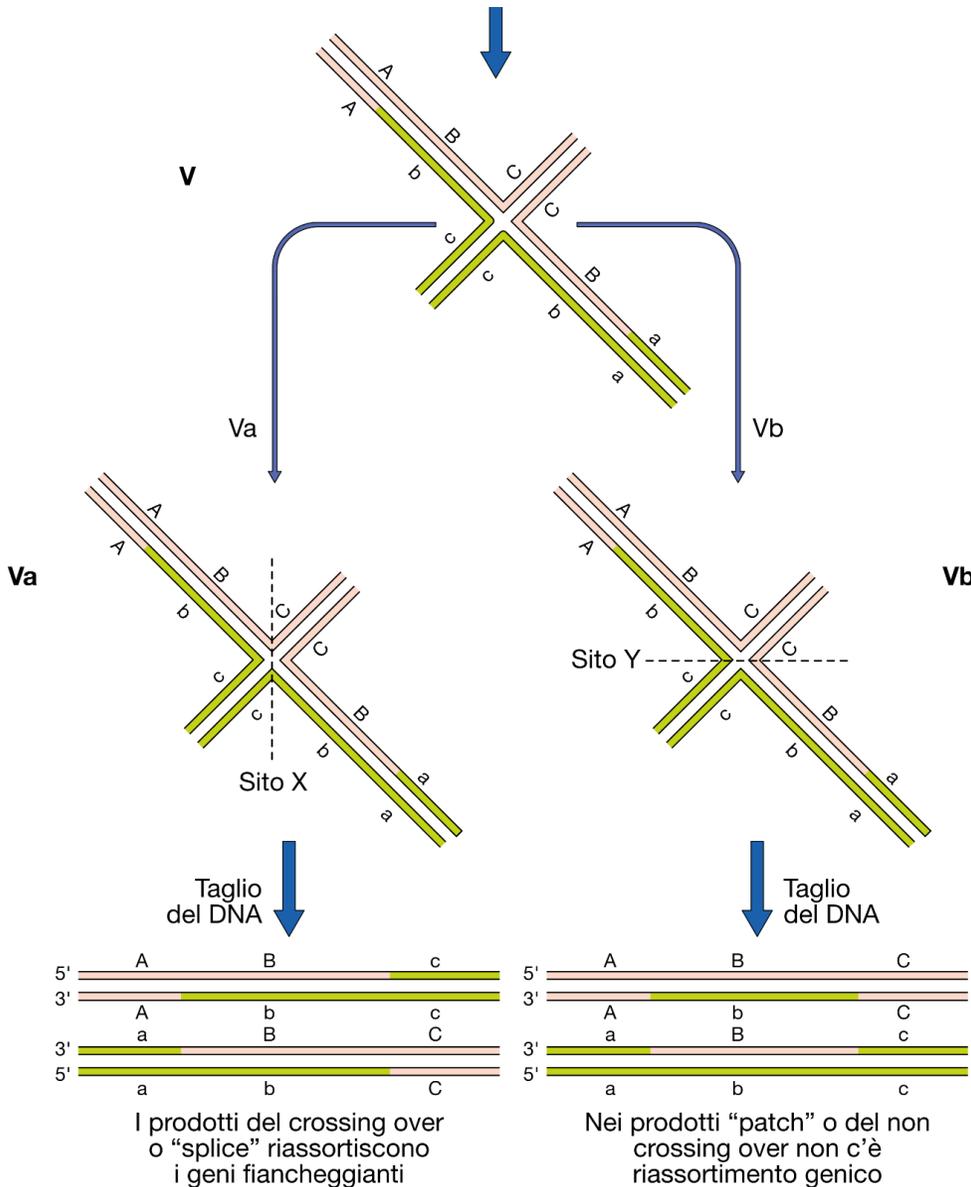
La **Giunzione di Holliday** può scorrere lungo il DNA mettendo di fronte anche sequenze non omologhe formando delle strutture chiamate eteroduplex.

IV



La ricombinazione finisce con la risoluzione (Resolution process) della giunzione che avviene tramite taglio e risaldamento dei filamenti prodotti. Questo ultimo evento avviene grazie a degli enzimi chiamati **RISOLVASI**.

# 1. Ricombinazione omologa o generalizzata



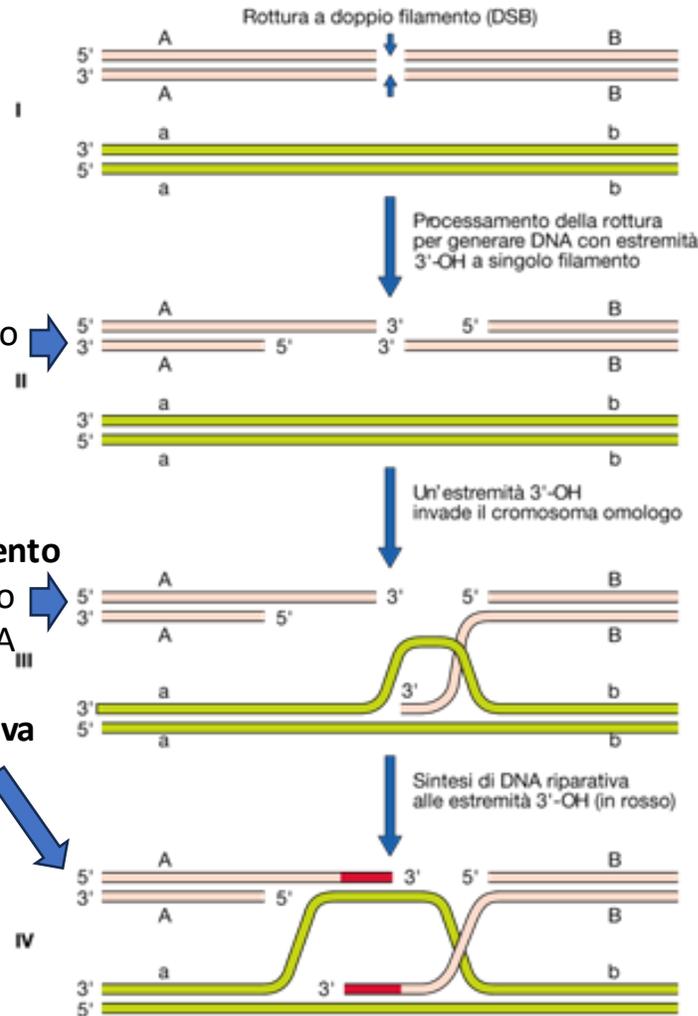
A seconda del taglio si ha 2 risultati della ricombinazione diversi:

**Sito X:** coinvolge i filamenti non rotti durante la creazione della giunzione di Holliday portando al riassortimento dei geni fiancheggianti

**Sito Y:** La ricombinazione avviene sui filamenti rotti originariamente e come risultato si ottiene l'inserimento di una breve sequenza in uno dei filamenti, denominata «patch». Questo taglio non porta al riassortimento dei geni

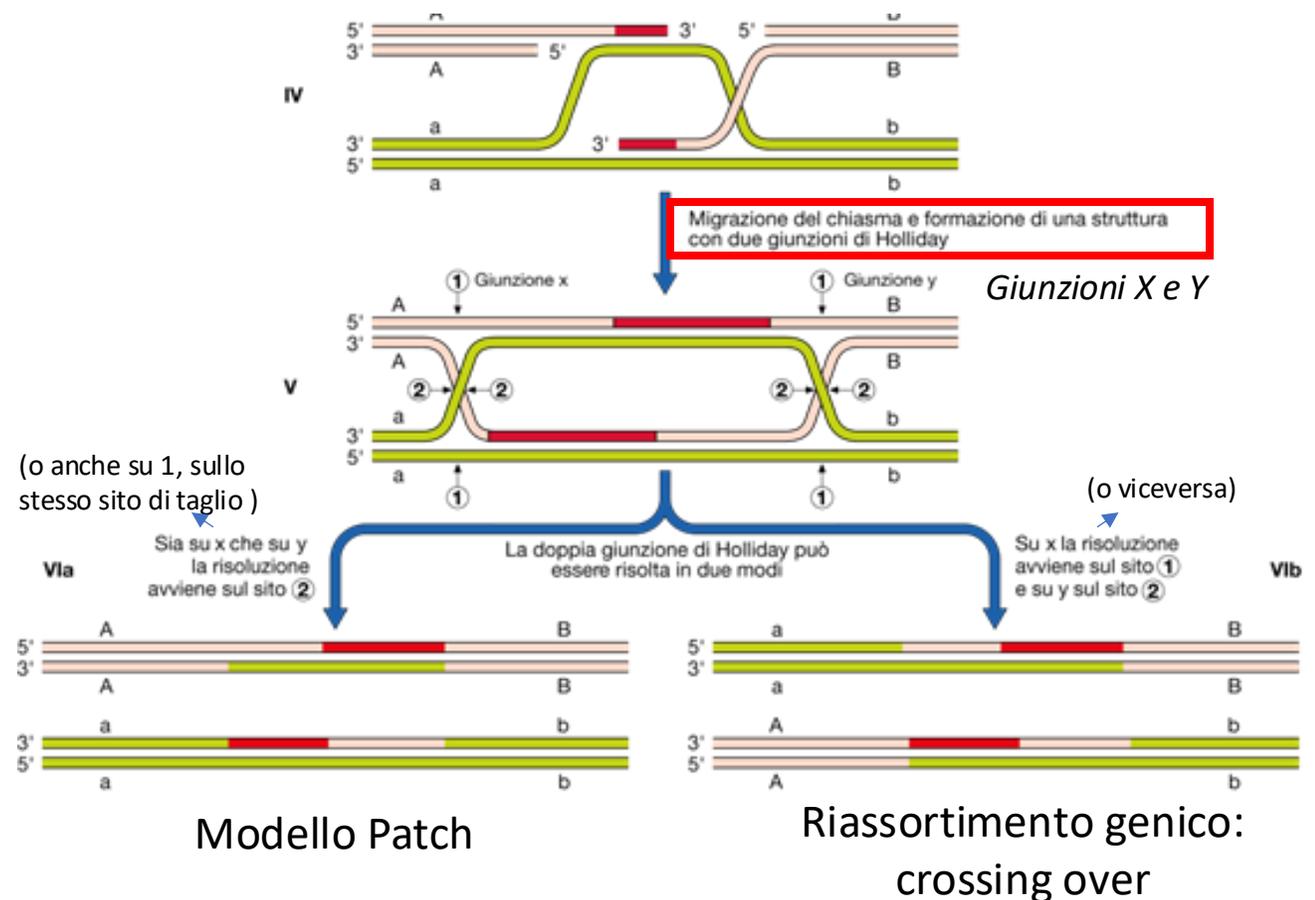
# 1. Ricombinazione omologa o generalizzata

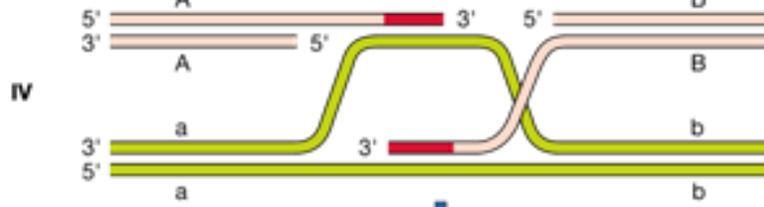
Si è visto che la maggior parte degli eventi di ricombinazione omologa comportano anche neosintesi di DNA, e vengono innescati da rottture del DNA a doppio filamento.



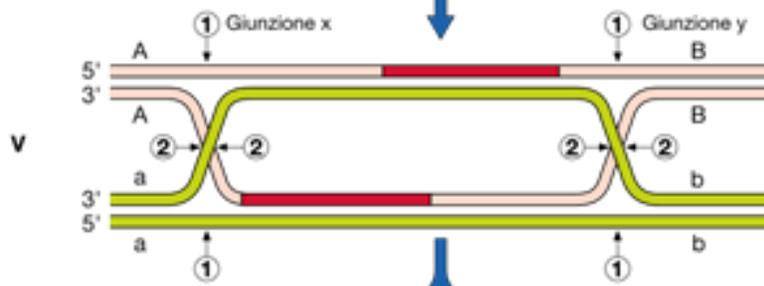
Estremità 5' sono eliminate tramite un processo chiamato "resection"

Estremità 3' a singolo filamento invade una sequenza simile o uguale nella molecola di DNA omologa non tagliata e cominciare la sintesi riparativa





Migrazione del chiasma e formazione di una struttura con due giunzioni di Holliday



HR-mediated DSB repair is associated with 1000-fold increase in mutation frequency



Per ogni giunzione x e y ci sono **due possibilità di taglio**, indicate come sito di taglio **1 o 2**.

Se entrambe le giunzioni vengono **tagliate allo stesso sito di taglio** (1 o 2) si avrà la formazione di prodotti "patch" (o del non-crossing over), come mostrato nell'esempio in VIa, dove entrambe le giunzioni sono state tagliate al sito 2. Infatti, gli alleli A/B e a/b fiancheggiati le giunzioni si ritrovano nella stessa combinazione presente nelle molecole prima della ricombinazione (lo stesso accade se entrambe le giunzioni vengono tagliate al sito 1: infatti, anche se il taglio alla giunzione x genererebbe un prodotto di crossing over, questo effetto viene, di fatto, annullato dal taglio al sito y: crossing over + crossing over = non-crossing over).

Viceversa, se le due giunzioni di Holliday sono **tagliate a siti diversi (VIb)** si ha la formazione dei prodotti di crossing over, con il riassortimento degli alleli fiancheggiati le giunzioni

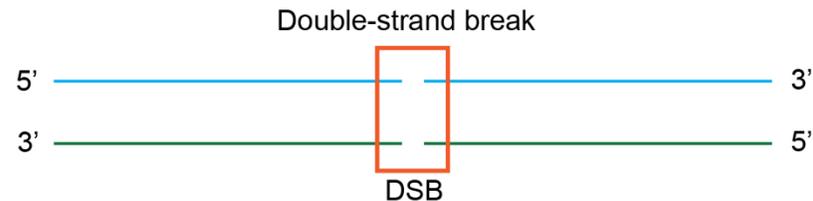
<https://www.youtube.com/watch?v=mCaFgwWH61o>  
<https://www.youtube.com/watch?v=yhZlfTr-ZEs>



## Eukaryotic DNA polymerases and their involvement in DSB repair and HR<sup>a</sup>

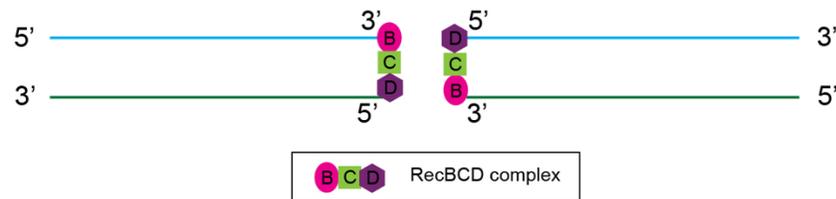
DNA polymerase	Human gene	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> gene	Basic properties	DSB repair/HR function
<b>A family</b>				
Pol $\gamma$	<i>POLG</i> <i>POLG2</i>	<i>MIP1</i>	High fidelity, 3'–5' exonuclease, processive (with POLG2 in humans), dRP lyase activity (humans)	Mitochondrial HR
Pol $\theta$	<i>POLQ</i>	NA	Low fidelity, bypass of abasic sites and thymine glycol, DNA-dependent ATPase activity	MMEJ/alt-EJ, regulation of HR efficiency in mammals
Pol $\nu$	<i>POLN</i>	NA	Low fidelity, similar to polymerase domain of Pol $\theta$	Knockdown mildly decreases HR, interacts with HR factors, high testis expression
<b>B family</b>				
Pol $\alpha$	<i>POLA</i> <i>POLA2</i> <i>PRIM1</i> <i>PRIM2A</i>	<i>POL1</i> <i>POL12</i> <i>PRI1</i> <i>PRI2</i>	Relatively high fidelity, no proofreading, nonprocessive, no PCNA interaction	Unsettled role in DSB-induced gene conversion, BIR
Pol $\delta$	<i>POLD1</i> <i>POLD2</i> <i>POLD3</i> <i>POLD4</i>	<i>POL3</i> <i>POL31</i> <i>POL32</i>	High fidelity, 3'–5' exonuclease, low DNA affinity, processivity increased by PCNA interaction, high PCNA affinity	Primary role in HR first-end synthesis, possible role in second-end synthesis, BIR
Pol $\epsilon$	<i>POLE</i> <i>POLE2</i> <i>POLE3</i> <i>POLE4</i>	<i>POL2</i> <i>DPB2</i> <i>DPB3</i> <i>DPB4</i>	High fidelity, 3'–5' exonuclease, high DNA affinity, highly processive, PCNA dependent at high salt, low PCNA affinity, PCNA stimulates processivity	Role in HR, second-end synthesis?, BIR?
Pol $\zeta$	<i>POLZ</i> <i>bREV7</i> <i>POLD3</i> <i>POLD4</i>	<i>REV3</i> <i>REV7</i> <i>POL31</i> <i>POL32</i>	Lower fidelity than other family members, lacks a 3'–5' exonuclease activity, powerful mismatch extender, interacts with REV1, functionally interacts with PCNA	Facilitate HR repair, ssDNA mutagenesis during HR repair, meiotic mutagenesis, ICL repair
<b>X family</b>				
Pol $\lambda$	<i>POLL</i>	<i>POL4</i>	Low fidelity for single base deletions, moderate fidelity for base substitutions, high affinity for dNTPs, Pol $\beta$ -like domain dRP lyase activity	Increased expression during meiosis, NHEJ, MMEJ/alt-EJ
Pol $\beta$	<i>POLB</i>	NA	Moderate fidelity, prefers substrates with short gaps, dRP lyase activity	Suggested role in meiosis
Pol $\mu$	<i>POLM</i>	NA	Low frameshift fidelity, can use primer and template that are on separate DNA molecules, sequence-independent nucleotidyl transferase, Pol $\beta$ -like domain and dRP lyase activity	Immunoglobulin gene rearrangement, NHEJ
Terminal deoxynucleotidyl transferase	<i>DNTT</i>	NA	Template-independent, possesses Pol $\beta$ -like domain dRP lyase activity	Immunoglobulin gene rearrangement, NHEJ
<b>Y family</b>				
Pol $\eta$	<i>POLH</i>	<i>RAD30</i>	Low fidelity, bypass of <i>cis-syn</i> thymine-thymine dimers, extends D-loop	Knockdown decreases HR efficiency in DT40 cells
Pol $\kappa$	<i>POLK</i>	NA	Low fidelity, profound mismatch-extending capacity, predominant T to G transversion	Possible role in HR
Pol $\iota$	<i>POLI</i>	NA	Fidelity varying from extremely low to high depending on the type of error, weak dRP lyase activity, preferentially incorporates a G opposite a template T	No evidence for role in HR
Rev1	<i>REV1L</i>	<i>REV1</i>	Deoxycytidyl transferase/G-template-specific polymerase, interacts with other specialized polymerases	Possible role in HR
PrimPol	<i>PRIMPOL</i>	NA	De novo synthesis of DNA, bypasses the most common oxidative lesions in DNA, both nuclear and mitochondrial	Lesion skipping, downstream priming after fork stalling

# Ricombinazione omologa in E. Coli



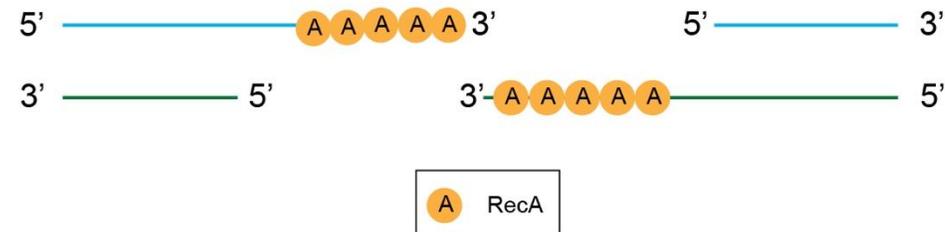
the complex of three **proteins RecBCD** assembles at each double-strand break.

RecBCD complex loaded at each double-strand break



**RecB** and **RecD** have **helicase activity**. They unwind the DNA duplex (double-strand). Additionally, the **RecBCD complex has nuclease activity** – the 5' ends of the double-strand breaks are trimmed, **producing 3' overhangs**. Technically, this is called **strand resection**.

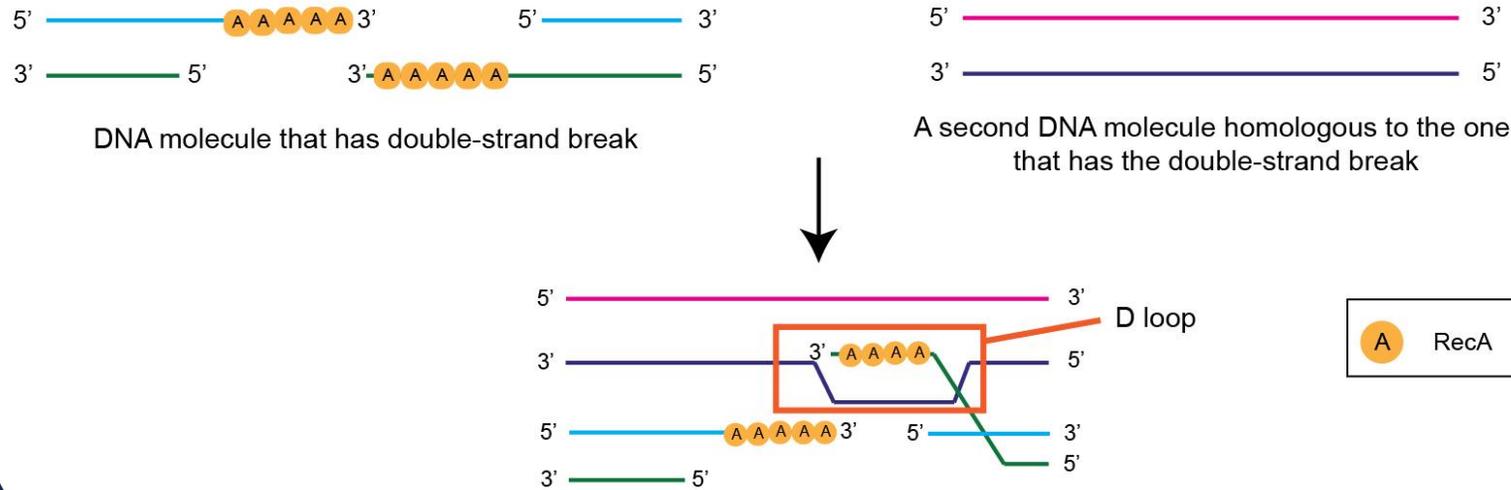
Strand resection and RecA loading



The 3' overhangs are now loaded with the protein **RecA**, forming a nucleoprotein complex.

This **RecA-coated single-stranded nucleoprotein** searches for **homologous DNA sequences within the cell**. It Promotes the formation of a stable three stranded complex. This is a very critical step in this entire process. Because of this, RecA mutant strains are not capable of homologous recombination.

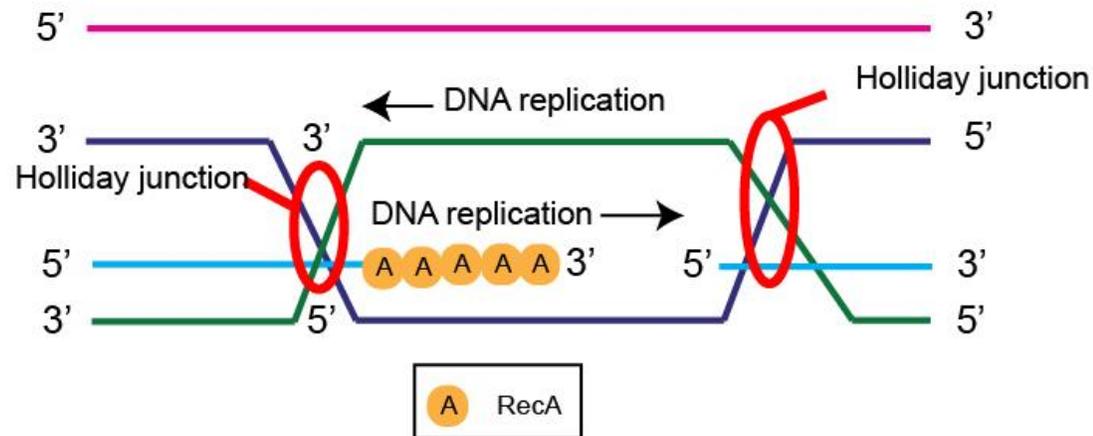
### Strand invasion and displacement



Once another DNA molecule is found that contains a homologous sequence, the **RecA -covered nucleoprotein invades that intact DNA duplex**. Using its sequence complementarity (because of the homology between the two strands), it forms a **triplex by binding in the major groove of the homologous duplex DNA**. As shown below, this triplex, with the displaced strand, looks somewhat like the letter D – and is called the **D-loop**.

After this, the 3' end of the invading strand is extended by **DNA Polymerase I**. This makes the **D-loop** larger and larger. Ultimately, the D-loop becomes large enough that the displaced strand anneals to the other 3' overhang (also coated with RecA) of the double-strand break.

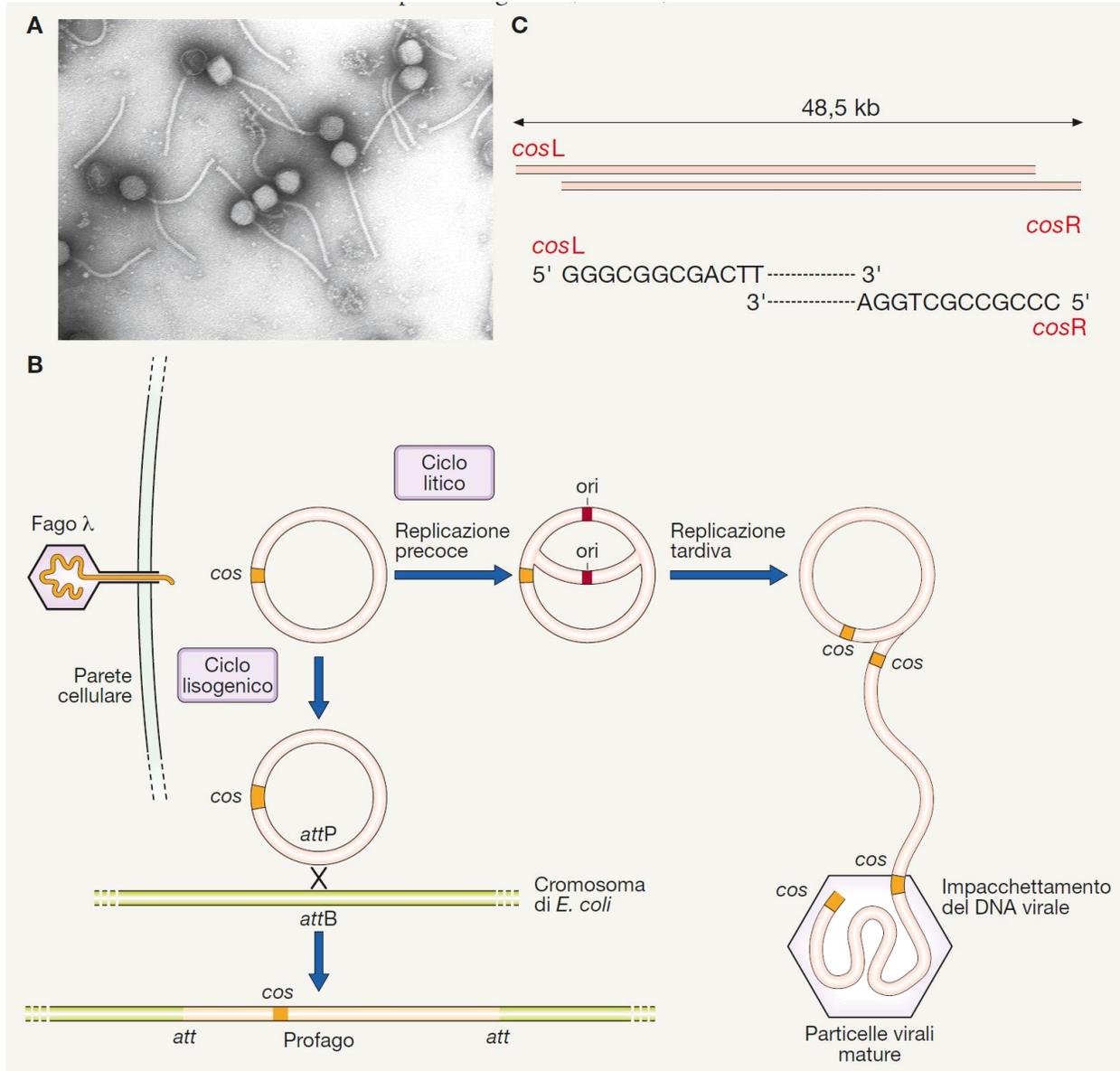
### Second cross-over and formation of double Holliday junction



This 3' overhang is also replicated and extended by DNA Polymerase I. Ultimately, this span of recombination between the two homologous DNA molecules keeps extending. This is technically called *branch migration*. Branch migration is facilitated by two proteins, **RuvA and RuvB** that leads to a **second crossover between the two homologous DNA molecules, forming two heteroduplexes (Holliday junctions)**.

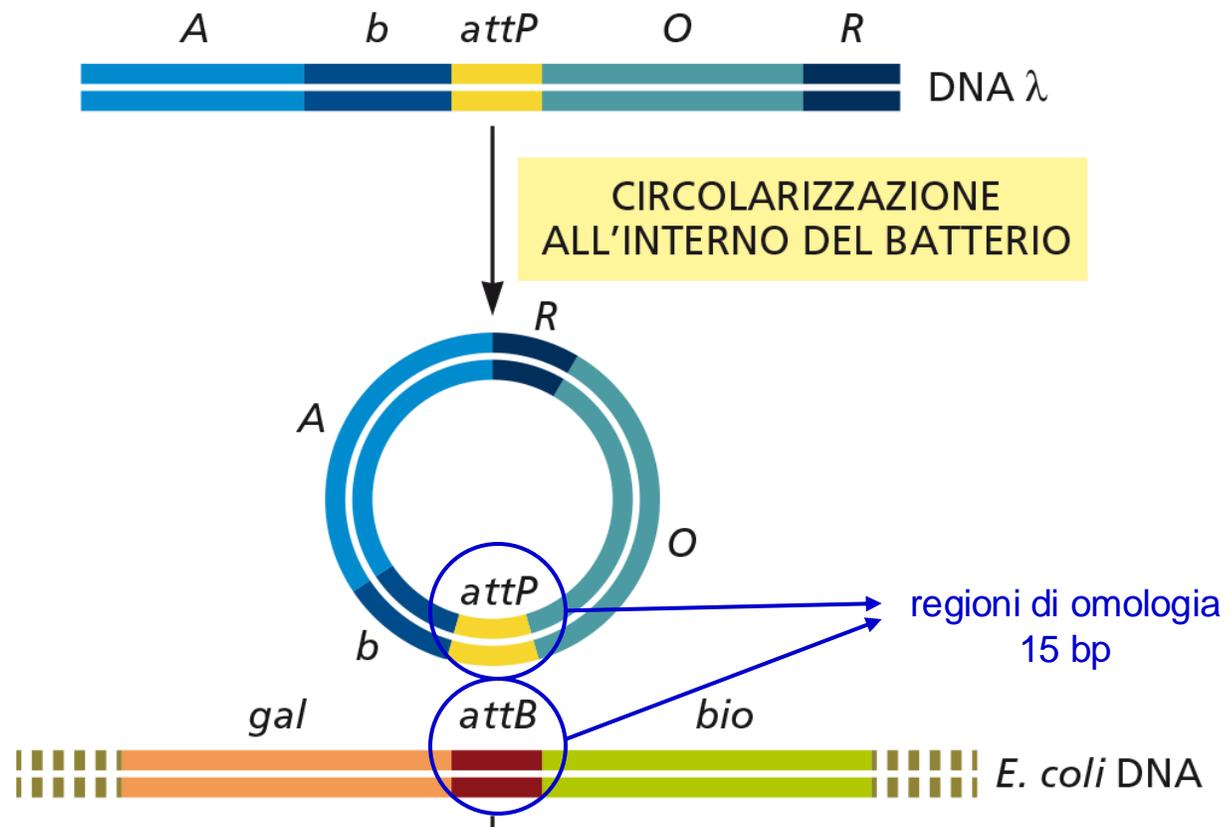
These **Holliday junctions are resolved by the RuvC (RISOLVASI) protein that has endonuclease activity and a DNA ligase**, separated back into two different double-stranded DNA molecules. In brief, this is how homologous recombination takes place in *E. coli*, using its own proteins (RecA, RecBCD, RuvABC etc.).

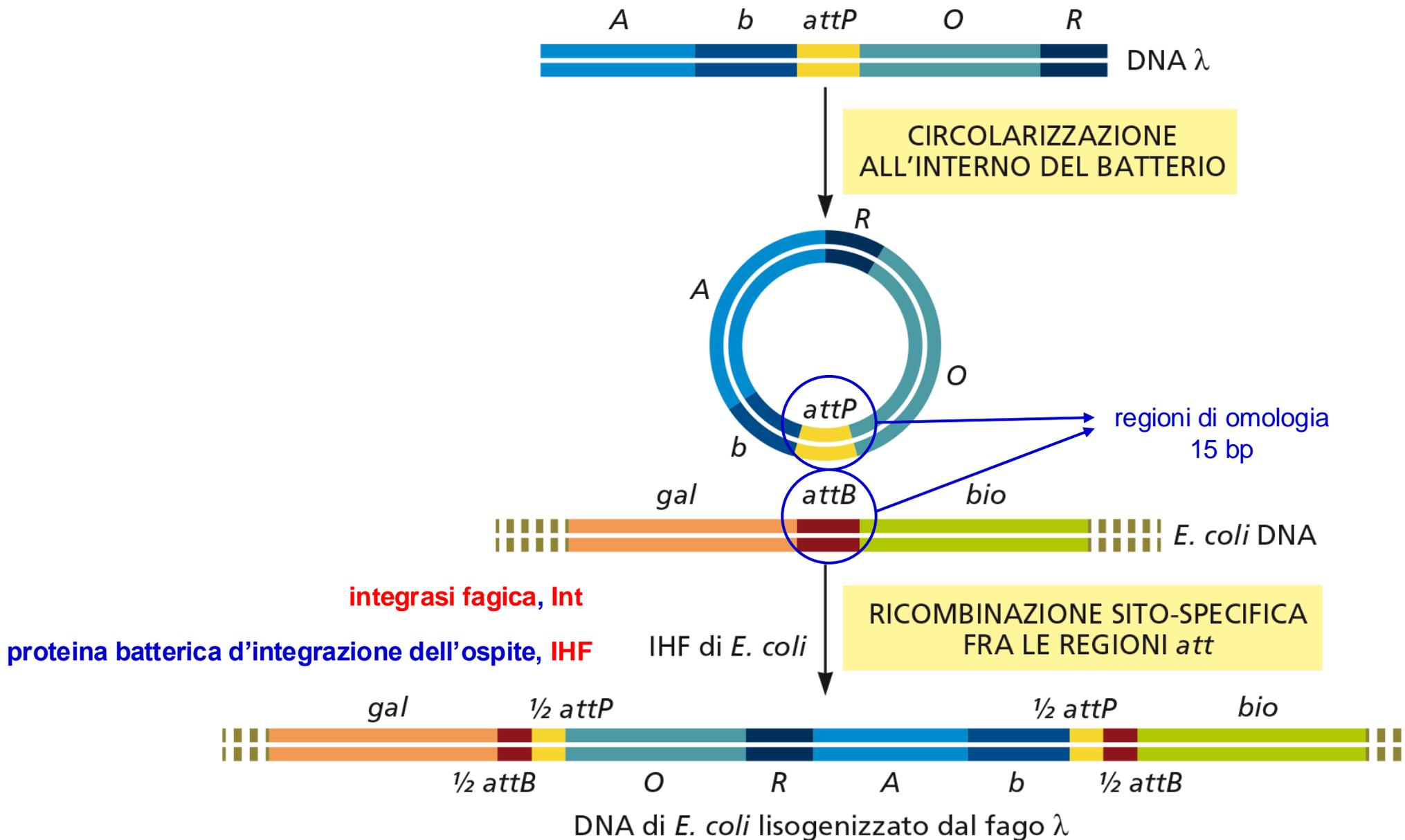
## 2. Ricombinazione sito-specifica



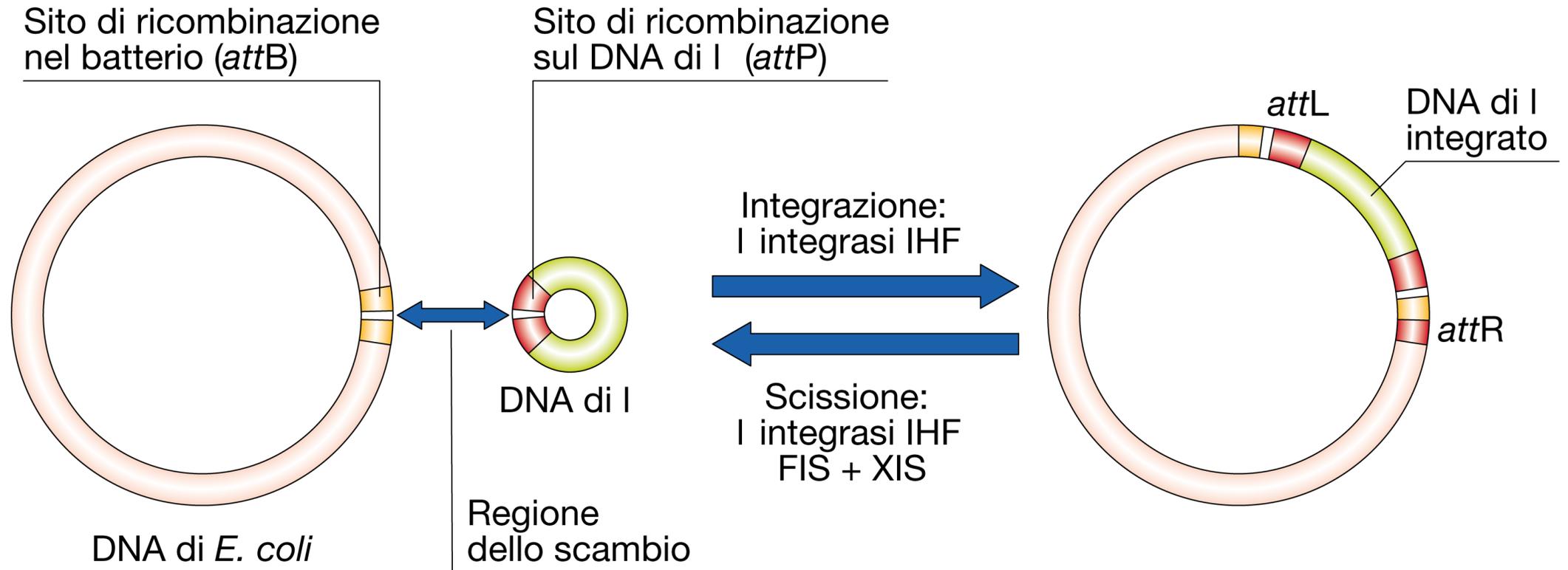
1. Limitata a specifiche sequenze di DNA che possono essere anche molto corte ( 20-200 nt)
2. Richiede l'attività di proteine specifiche chiamate **RICOMBINASI (SSRs\_site specific recombinases)** che catalizzano il taglio e unione delle molecole di DNA coinvolte
3. Comune in batteri

Un esempio avviene durante l'integrazione del DNA del fago Lambda nel genoma batterico, e che richiede l'attività di proteine specifiche del Fago: Integrasi





## 2. Ricombinazione sito-specifica

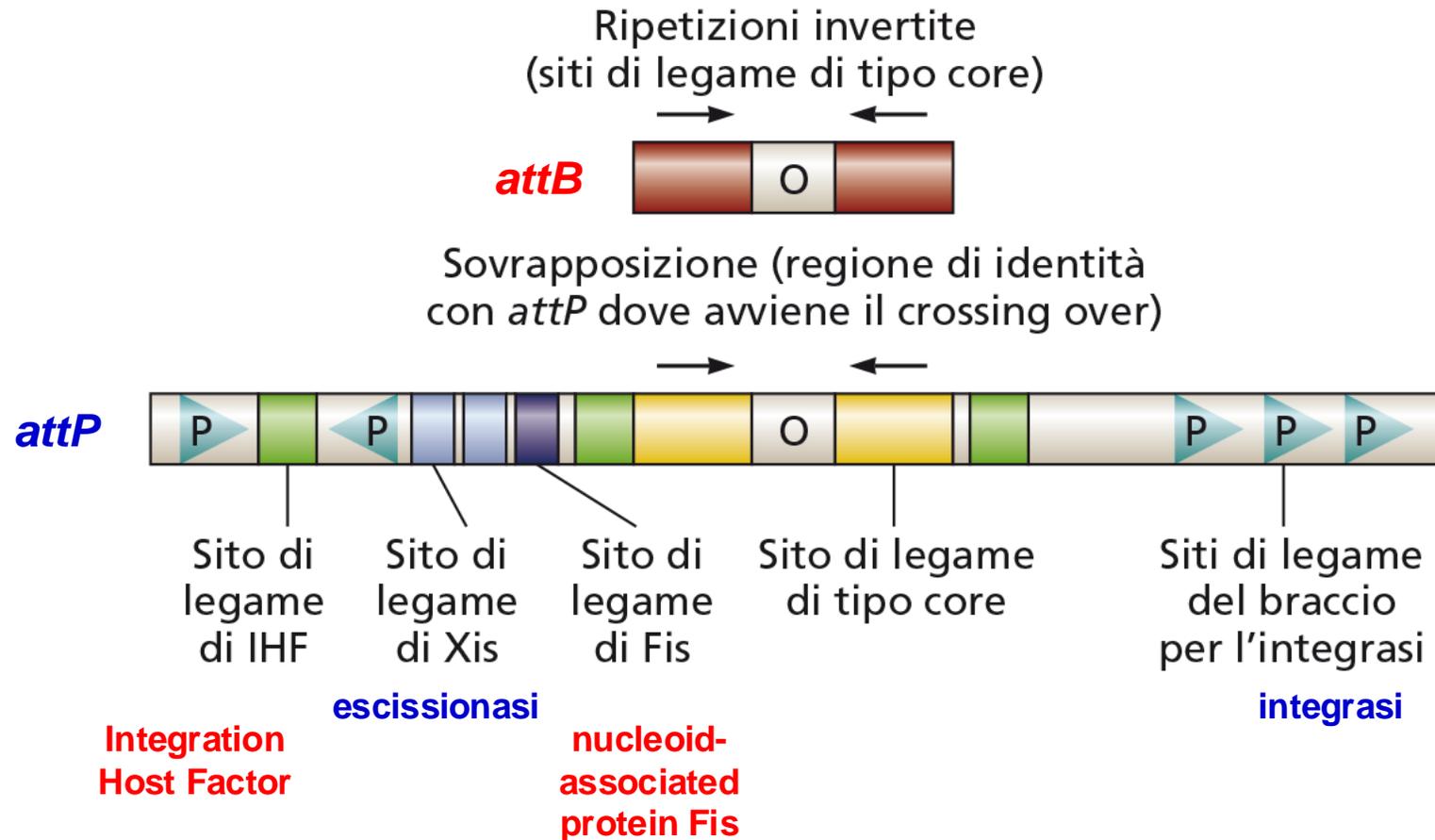


Overlap region

`attB...tccacatcCTTAGTGCGTATTATGTatgttatgt`  
`attP...aggetgtttCTTACTTCGCATTATGTcggettattg`  
`attL...tccacatcCTTAGTGCGTATTATGTcggettattg`  
`attR...aggetgtttCTTACTTCGCATTATGTatgttatgt`

Altre proteine batteriche si legano ad *attP*.

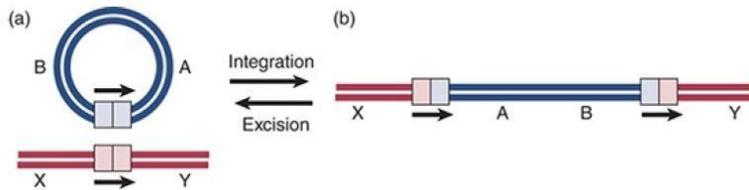
Le due regioni omologhe sono riconosciute dall'integrasi, che crea una giunzione di Holliday, struttura intermedia nel processo d'integrazione.



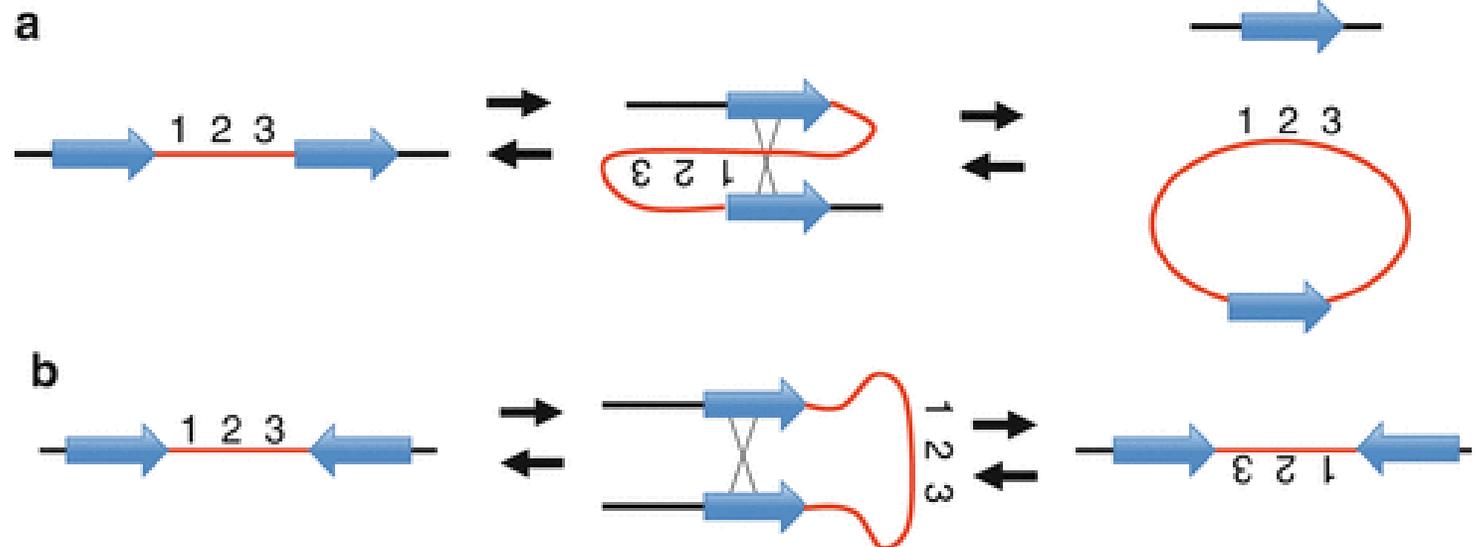
# 2. Ricombinazione sito-specifica

Può dare luogo a tre tipi di riarrangiamenti sul DNA

**A.** Siti di ricombinazione hanno lo **stesso orientamento ma su 2 molecole diverse**. Si ha l'**integrazione** di una molecola nell'altra



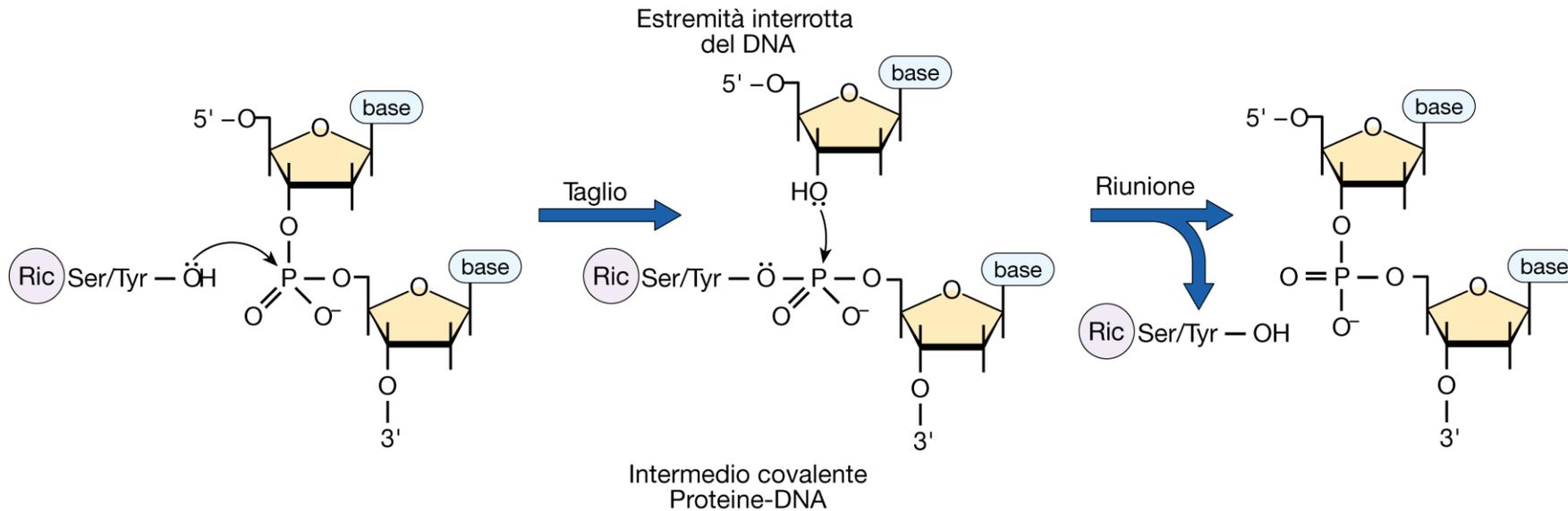
**B.** I siti di ricombinazione hanno lo **stesso orientamento sulla stessa molecola di DNA**. Può dare luogo ad una **delezione o inserzione**



**C.** I siti di ricombinazione hanno un **orientamento opposto sulla stessa molecola di DNA**. Da luogo ad una **inversione**

# 2. Ricombinazione sito-specifica

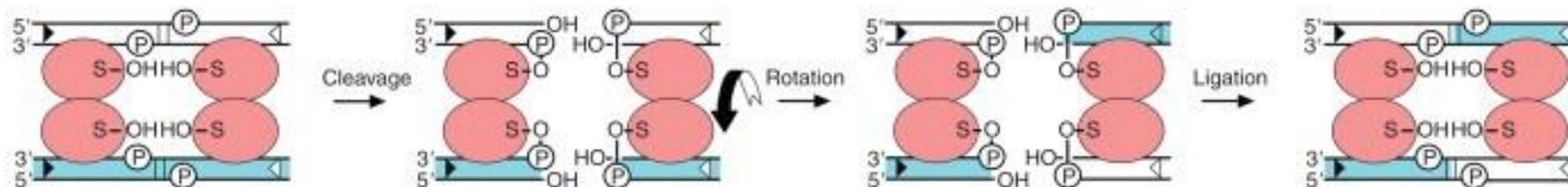
Coinvolgimento di 2 tipi di ricombinasi: **1) in Serina** e **2) in Tirosina**



Il meccanismo d'azione è simile:

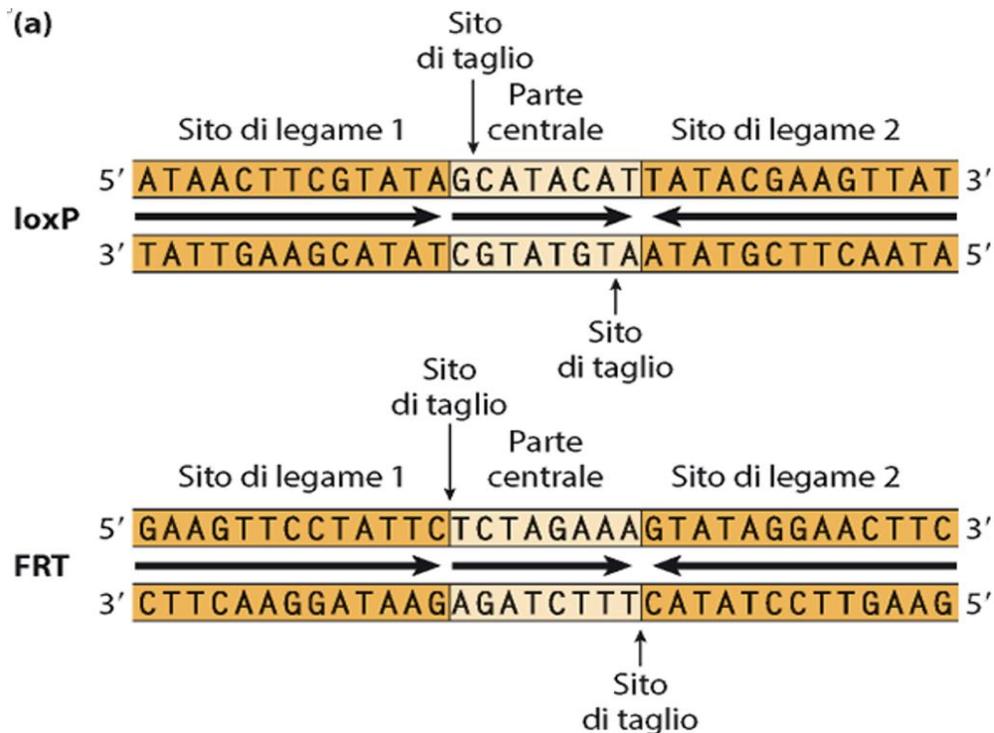
**Gruppo OH di una Ser o Tyr nel sito attivo dell'enzima attacca uno specifico legame fosfodiesterico nel sito di ricombinazione, creando un taglio a singolo filamento dove il legame covalente enzima-DNA conserva l'energia del legame fosfodiesterico idrolizzato per poi fare avvenire la reazione inversa.** (simile al meccanismo di taglio descritto per le Topoisomerasi Tipo I)

Serine recombinases



- Le **ricombinasi sito-specifiche** sono state molto studiate e sono oggi sempre più comprese.
- Il fatto che catalizzino la riorganizzazione precisa di frammenti di DNA, necessitando solo dell'enzima e di **brevi sequenze specifiche opportunamente posizionate e orientate**, le ha rese uno strumento d'elezione per varie applicazioni biotecnologiche → funzionano in cellule di qualsiasi organismo

Two of the most exciting and versatile genetic tools designed in the last 30 years are the *Cre-lox* and FLP-FRT technologies.



- Sistema **Cre-lox** del batteriofago P1: ricombinasi Cre = *cyclization recombination* e siti loxP = *locus of cross-over (x) phage*

- Sistema **Flp-FRT** del plasmide 2 $\mu$  di *Saccharomyces cerevisiae*: *flippase* e *Flippase Recognition Target*

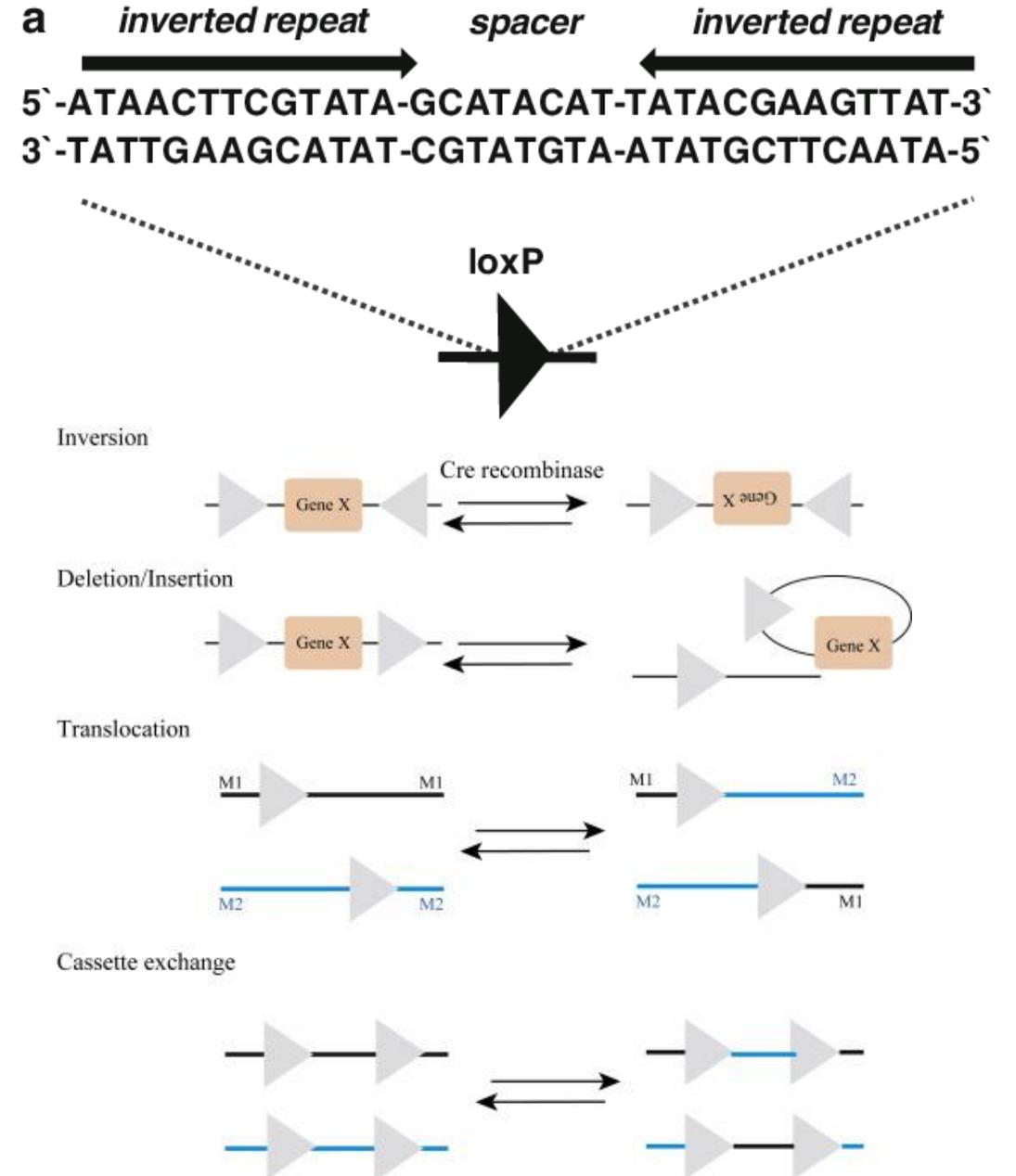
# Cre-LoxP system

Cre, [cyclization recombinase](#), is a 38-kDa site-specific DNA recombinase that specifically recognizes the 34-bp sites of [LoxP](#) (locus of X-over of P1) enabling [site-specific recombination](#).

Cre-lox reactions are affected by the **orientation and location of *loxP* sites**.

Paired *loxP* sites (triangles) have directionality and may be placed in a *cis* (same DNA strand) or *trans* (different DNA strands) arrangement.

- (A) If the *loxP* sites flank a DNA segment (rectangle) in a *cis* arrangement and are oriented in the same direction, Cre recombinase mediates excision or circularization of the segment.
- (B) If the *loxP* sites flank the DNA segment in a *cis* arrangement and are oriented in opposite directions, Cre recombinase mediates the inversion of the segment.
- (C) If the *loxP* sites are located on different strands of DNA and are oriented in the same direction, Cre recombinase mediates a translocation of the segment.

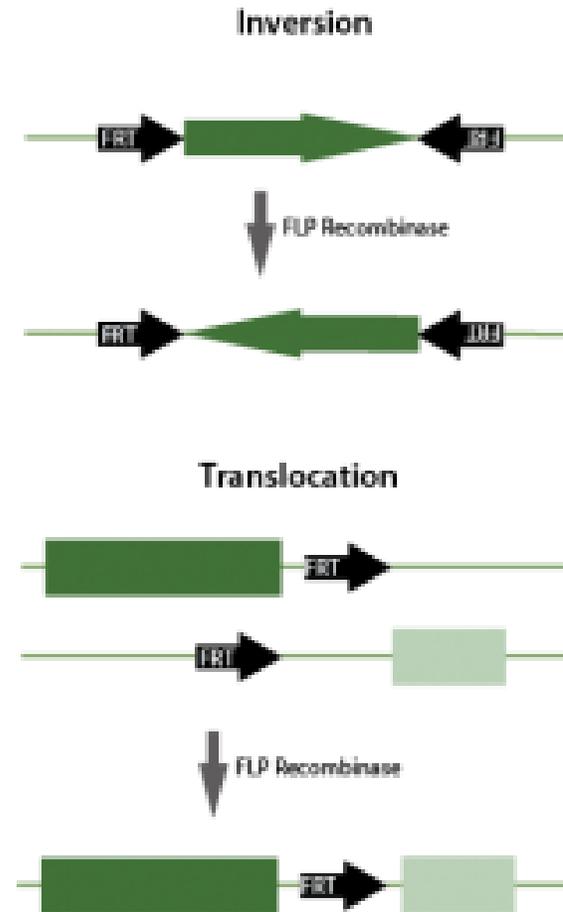
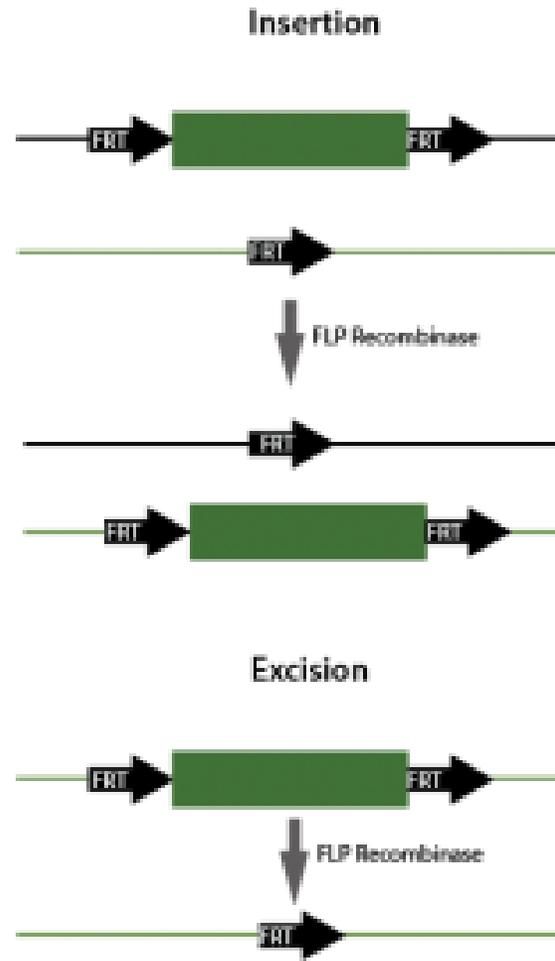


# The FLP-FRT system

The FLP-FRT system is similar to the *Cre-lox* system and is becoming more frequently used in mouse-based research.

It involves using **flippase (FLP) recombinase**, derived from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Sadowski 1995).

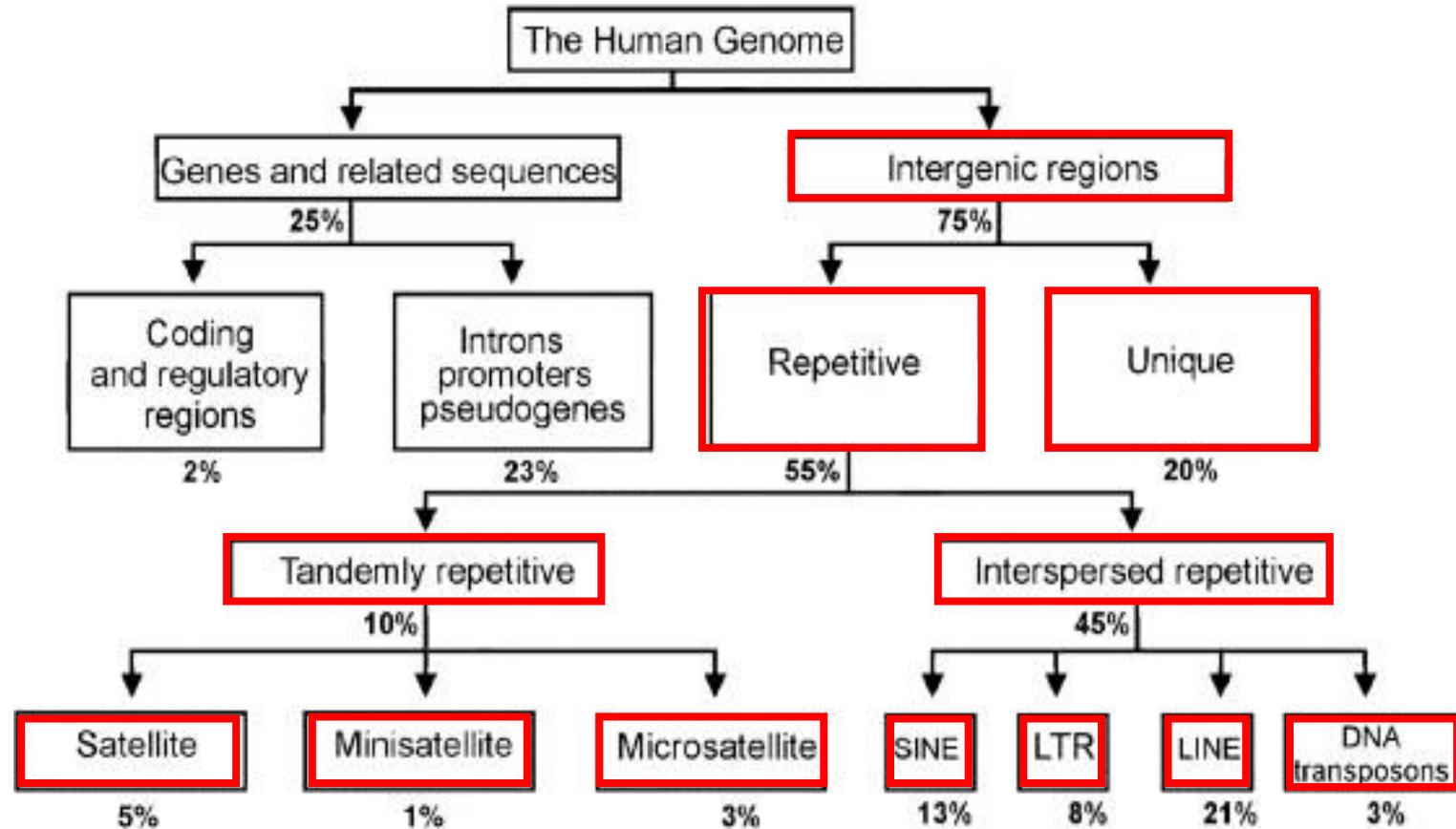
FLP recognizes a pair of **FLP recombinase target (FRT) sequences** that flank a genomic region of interest.



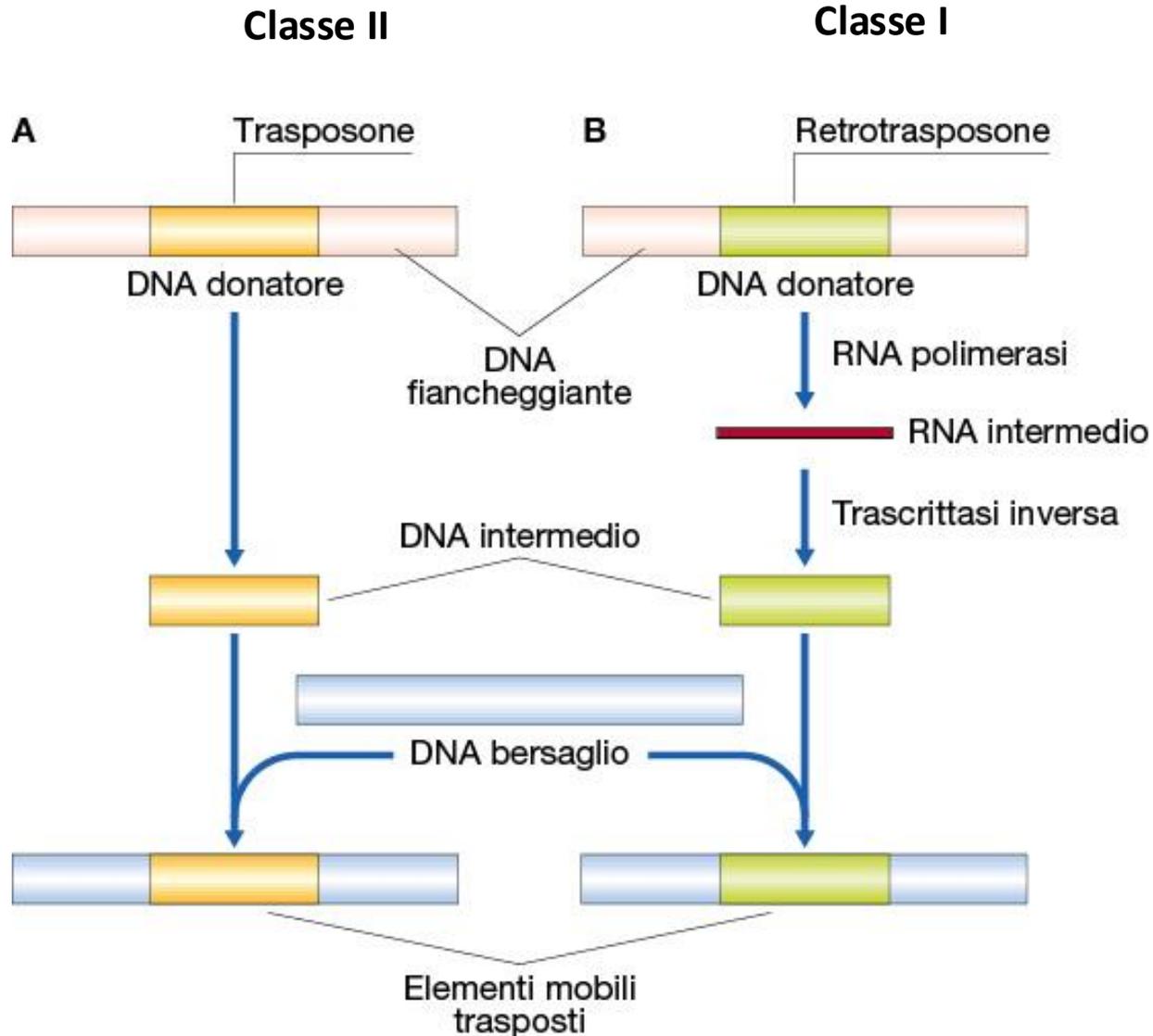
# 3. Trasposizione del DNA

Elementi mobili o trasponibili a DNA= **TRASPOSONI**

- Sono **regioni del DNA non codificanti**, in grado di **spostarsi sullo stesso cromosoma o anche cromosomi diversi**, distribuite in modo apparentemente casuale distanti fra di loro.
- Possono influenzare la espressione genica, provocare delle mutazioni e modificano la struttura del genoma influenzando la sua evoluzione.



# 3. Trasposizione del DNA



## DNA ripetitivo intersparso

- ✓ Sono ubiquitari
- ✓ Contribuiscono alla plasticità del genoma (in modo attivo e passivo)

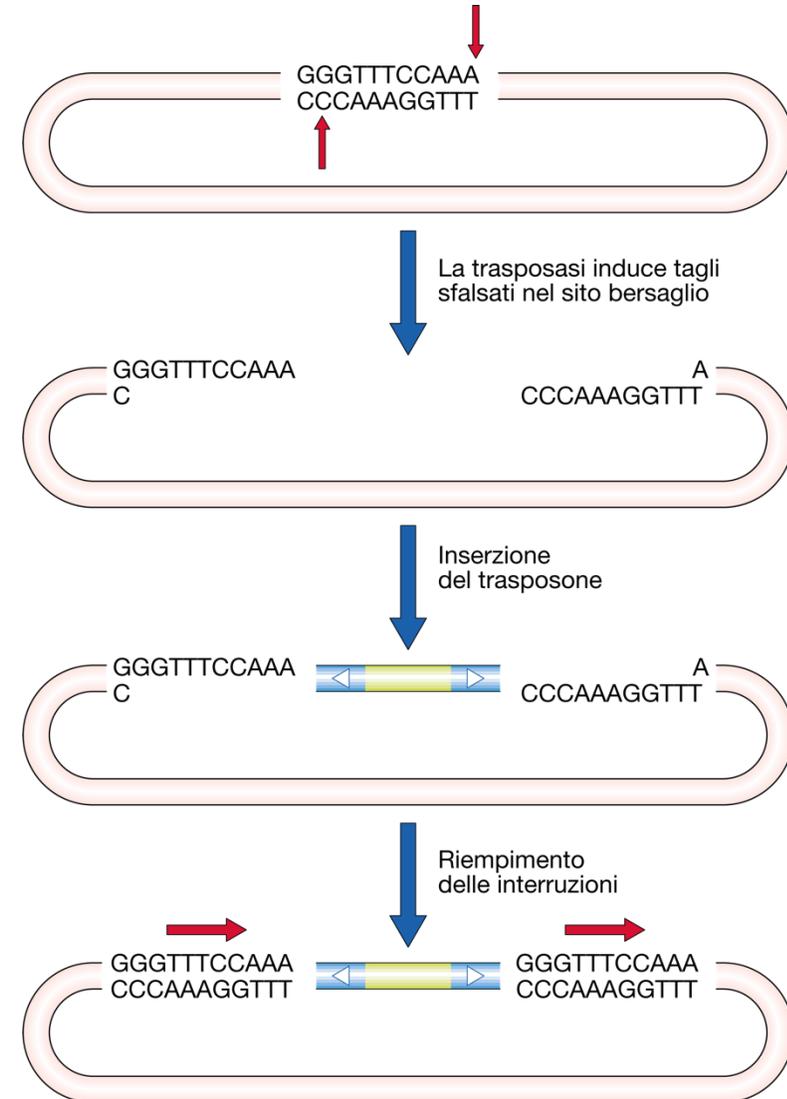
# 3. Trasposizione del DNA

## Classe II o trasposoni a DNA

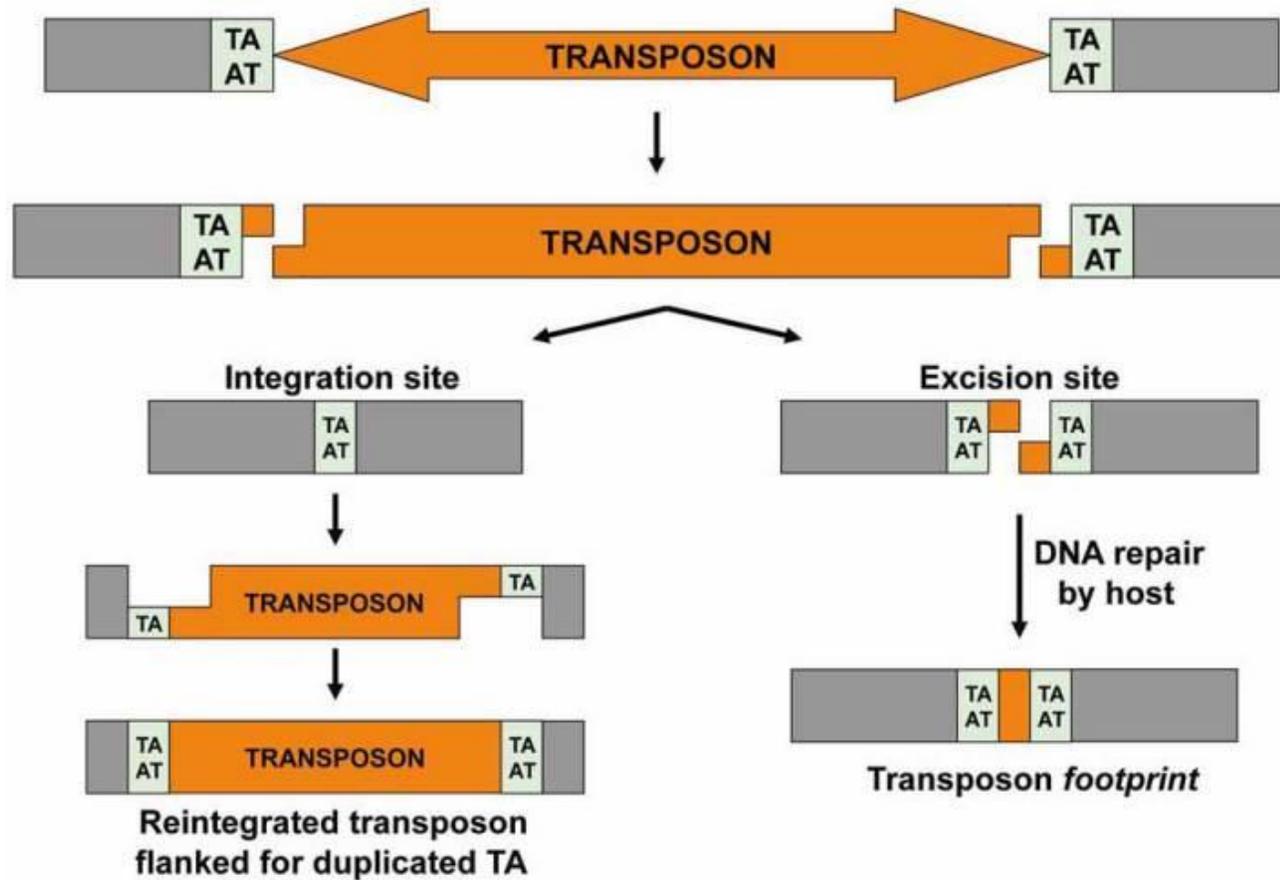
➔ Non usano un intermediario di RNA



- Consistono in sequenze di DNA che contengono l'informazione per un enzima **transposasi** (che taglia e sposta il DNA) con delle sequenze fiancheggianti chiamate **Terminal Inverted Repeats (TIRs)**.
- La transposasi riconosce le TIRs portando alla escissione del DNA trasposone e permettendo l'inserzione in un'altra posizione del genoma
- Conseguenza della azione della transposasi si genera la **duplicazione di una breve sequenza del DNA bersaglio a livello del sito d'integrazione**



# 3. Trasposizione del DNA



# 3. Trasposizione del DNA

## Classe II o trasposoni a DNA

► Non usano un intermediario di RNA



Meccanismo di propagazione

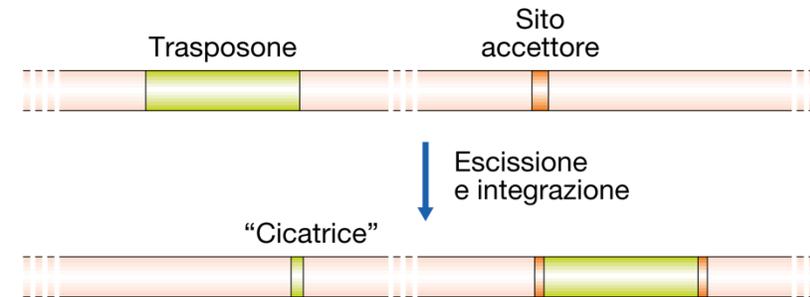
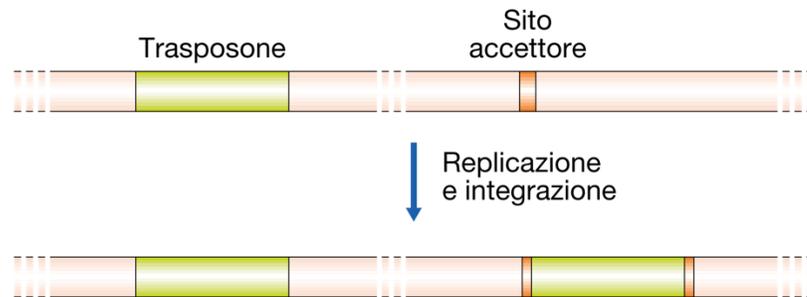
### REPLICATIVO

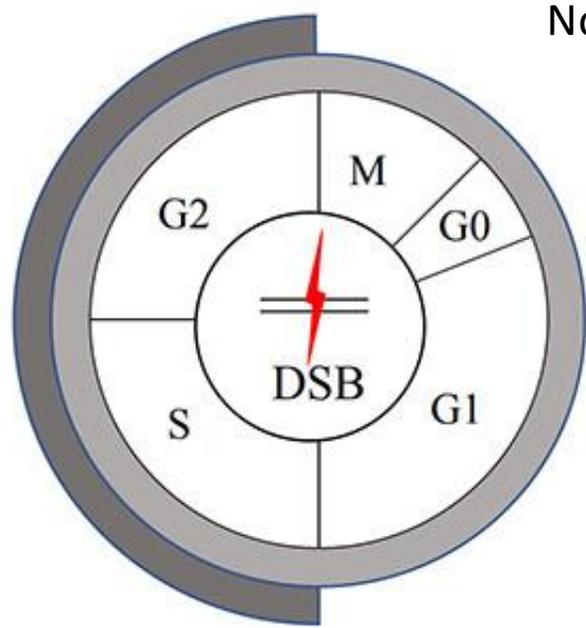
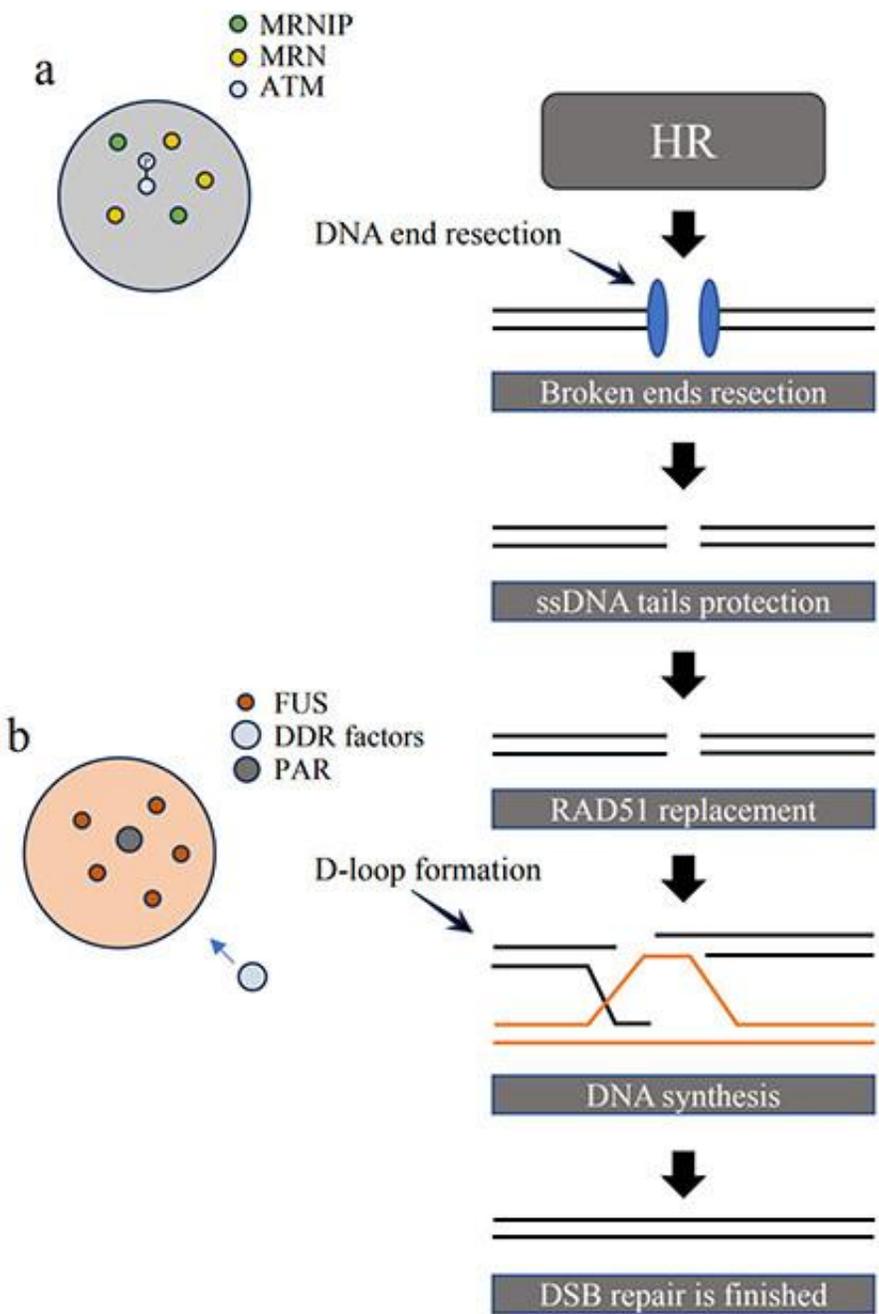
una nuova copia del trasposone si integra nel genoma in un'altra posizione. Il numero di elementi trasposti raddoppia.

Meccanismo di propagazione

### CONSERVATIVO

La trasposasi codificata dal trasposone taglia il trasposone permettendo la trasposizione ad un'altra regione del genoma (taglia e cuci). Il numero di copie rimane costante





**Non-homologous end joining**

