11. Ricombinazione nei funghi

Analisi di linkage e mappatura in eucarioti aploidi

GLI EUMICETI

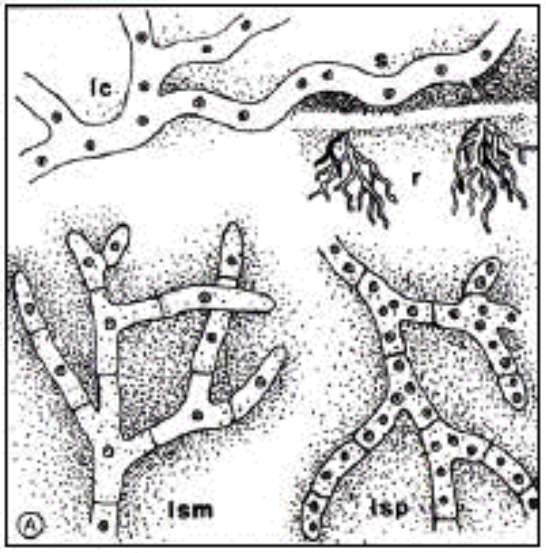
- Microrganismi eucarioti **chemi-organotrofi** (generalmente hanno richieste nutrizionali semplici)
- appartenenti al regno *Fungi*
- costituiti da tre principali gruppi (classificazione non scientifica):

A. **LIEVITI (FUNGHI UNICELLULARI)**

B. **MUFFE (FUNGHI FILAMENTOSI):** organismi eucarioti, eterotrofi, privi di clorofilla, la cui struttura somatica è costituita da elementi tubolari ramificati: **le ife.**

L'insieme delle IFE costituisce il **MICELIO**





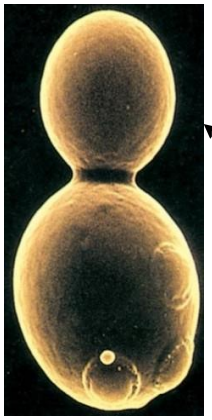
C.. **I FUNGHI FRUTTIFERI (CARPOFORI):** CONIDOSPORE, SPORANGIO-SPORE, ARTROSPORE e CLAMIDOSPORE

Riproduzione asessuale (processo di MITOSI) negli eumiceti

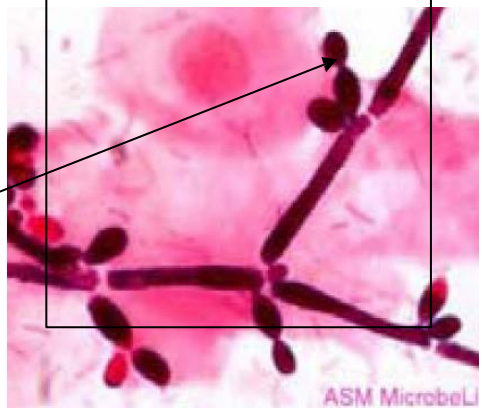
➢ **La morfologia delle spore e la struttura del corpo** fruttifero è alla base della **tassonomia dei funghi filamentosi**

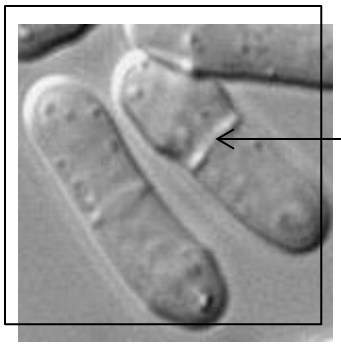
➢ I **LIEVITI** si possono riprodurre **asessualmente** per **gemmazione** o **blastogonia** (tramite BLASTOSPORE) oppure **per scissione binaria** (**schizogonia**)

- *N.B.: Candida è un lievito che può formare strutture filamentose dette PSEUDO-MICELIO, sulle quali possono formarsi le blastospore*
- **Blastogonia** **Schizogonia**



blastospore





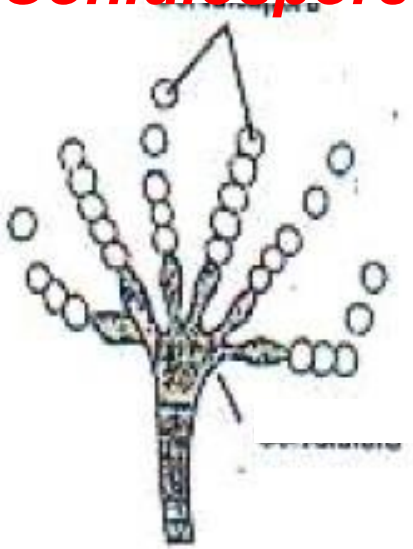
setto divisiorio

➢ Nelle **MUFFE** la riproduzione asessuata avviene attraverso la formazione di un **CORPO FRUTTIFERO** a livello del micelio aereo.

➢ **In base alla tipologia di corpo** fruttifero si distinguono: **CONIDOSPORE, SPORANGIOSPORE, ARTROSPORE e CLAMIDOSPORE**

➢ Alcune muffe (per es il genere *Monilia*) possono fare anche BLASTOGONIA (formazione di BLASTOSPORE, ovvero rigonfiamenti lungo le IFE)

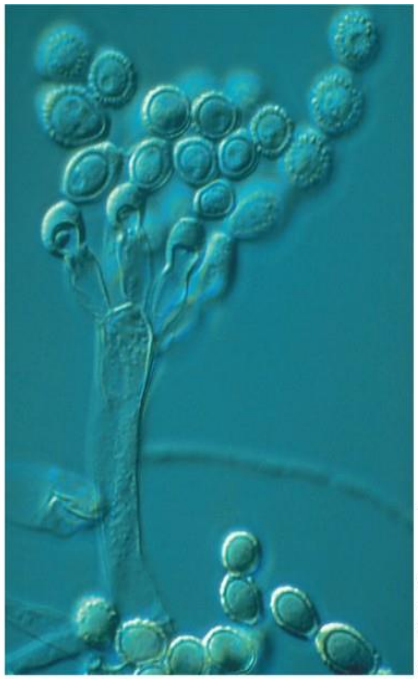
1. Conidiospore: spore portate su strutture specializzate denominate **conidiofori**

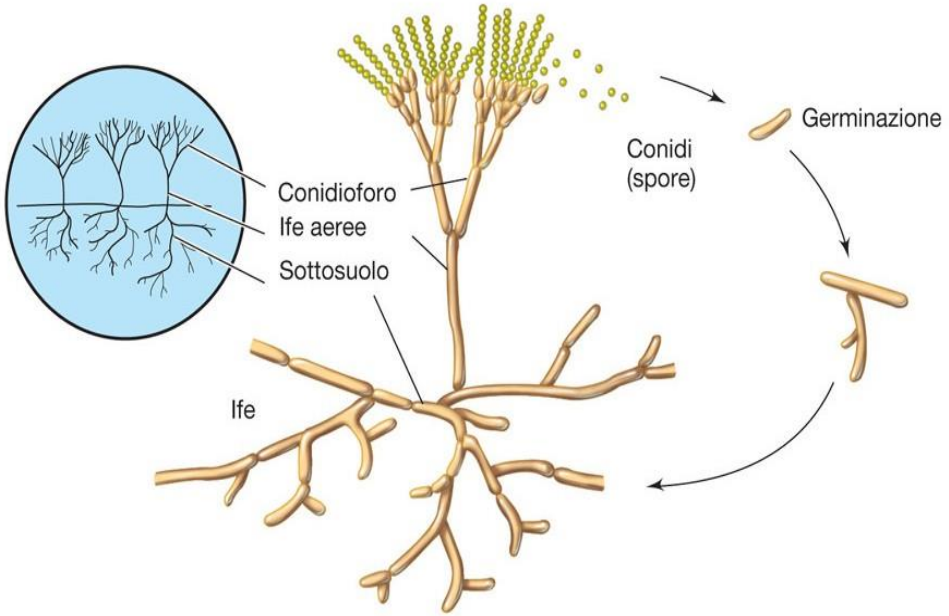


Generi: *Penicillium*
Aspergillus
Botrytis

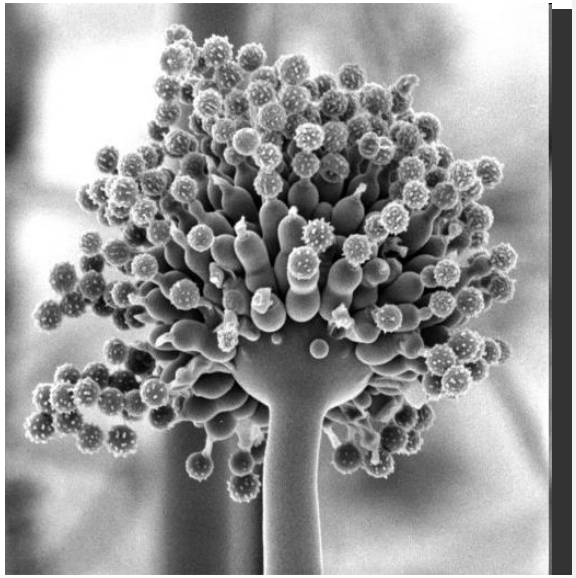


Conidioforo





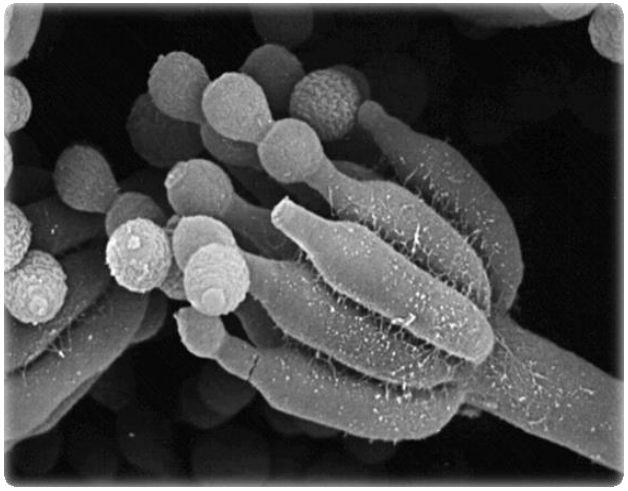
Aspergillus



- È ubiquitario. Molte specie si sviluppano a danno di cibi ricchi di amido, come i cereali e le patate, producendo spesso **AFLATOSSINE**, estremamente tossiche e cancerogene
- Alcune specie di *Aspergillus* (***A. fumigatus*** e ***A. flavus***) possono produrre infezioni nell'uomo e negli animali (aspergillosi) che colpiscono tipicamente l'apparato respiratorio (naso e polmoni)

A. niger viene usato per la **produzione di acido citrico** (oltre 99% della produzione mondiale) e di alcuni enzimi.

Penicillium





- ***P. notatum*, produttore di penicillina**
- ***P. camemberti*, nella produzione del formaggio Camembert e Brie**
- ***P. candida*, nella produzione di Camembert e Brie**
- *P. **glaucum***, utilizzato nella produzione di Gorgonzola -
- ***P. roqueforti***, nella produzione di Roquefort, Blue cheese e Gorgonzola

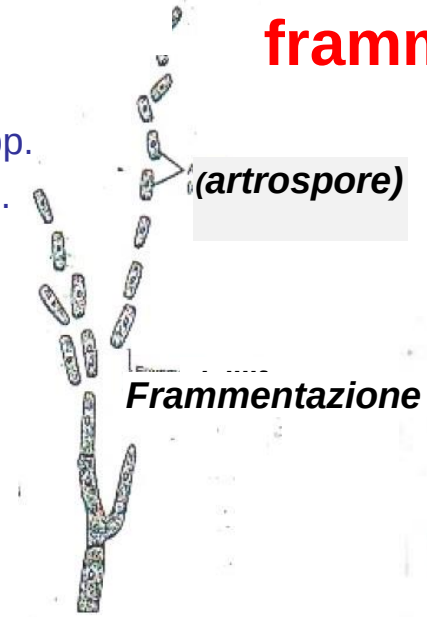
2. Spore contenute in uno sporangio

Generi:

- ***Mucor*** spp.
- ***Rhizopus*** spp.
- ***Absidia*** spp.



3.Spore prodotte dalla frammentazione delle ife.



Genere:

Geotrichum spp.

4.Spore prodotte all'interno ifa o all'estremità

Genere:

Tricoderma spp.



- Esistono anche altre tipologie di spore asessuate, come le: DIDYMOSPORE (presenza di 1 setto trasversale) PHRAGMOSPORE (più setti)



***Fusarium* spp.**



Trichothecium caseum

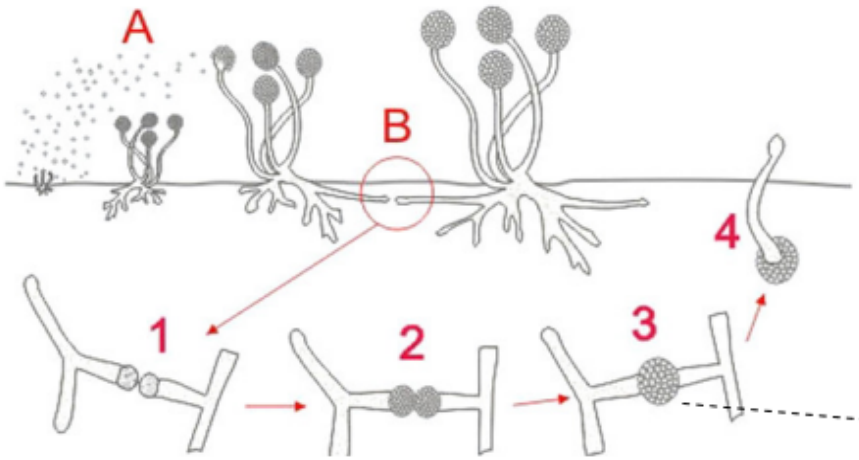
N.B.: *le spore non settate sono dette AMEROSPORE*

La riproduzione sessuale (processo di MEIOSI) negli eumiceti

Tutti gli eumiceti sono classificati principalmente per la loro riproduzione sessuale

1) Ficomiceti (Zigomiceti), 2) Ascomiceti, 3) Basidiomiceti, 4) Deuteromiceti

1) FICOMICETI (ZIGOMICETI): riproduzione sessuata con formazione della ZIGOSPORA

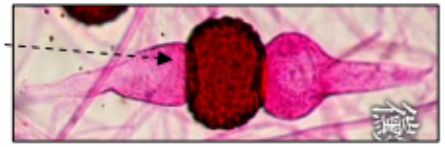


Ciclo vitale degli **ZIGOMICETI**

A)Riproduzione asessuata da spore

B) Ripr. sessuata: formazione delle zigospore

1) attrazione e fusione delle ife di sesso opposto; 2) fusione dei gametangi e inizio della formazione della zigospora; 3) zigospora; 4) germinazione; (da Rambelli 1981



NESSUNO LIEVITO APPARTIENE A QUESTO GRUPPO

Sono zigomiceti, ad es., i membri dei generi ***Rhizopus*** *e* ***Mucor***)

Alcuni possono causare infezioni negli animali (zigomicosi).

Due specie di *Rhizopus* sono utili. *Rhizopus oligosporus* è usato per la produzione del tempeh, pane di soia fermentata popolare in Indonesia. *Rhizopus oryzae* invece è usato per la produzione di bevande alcoliche in Asia

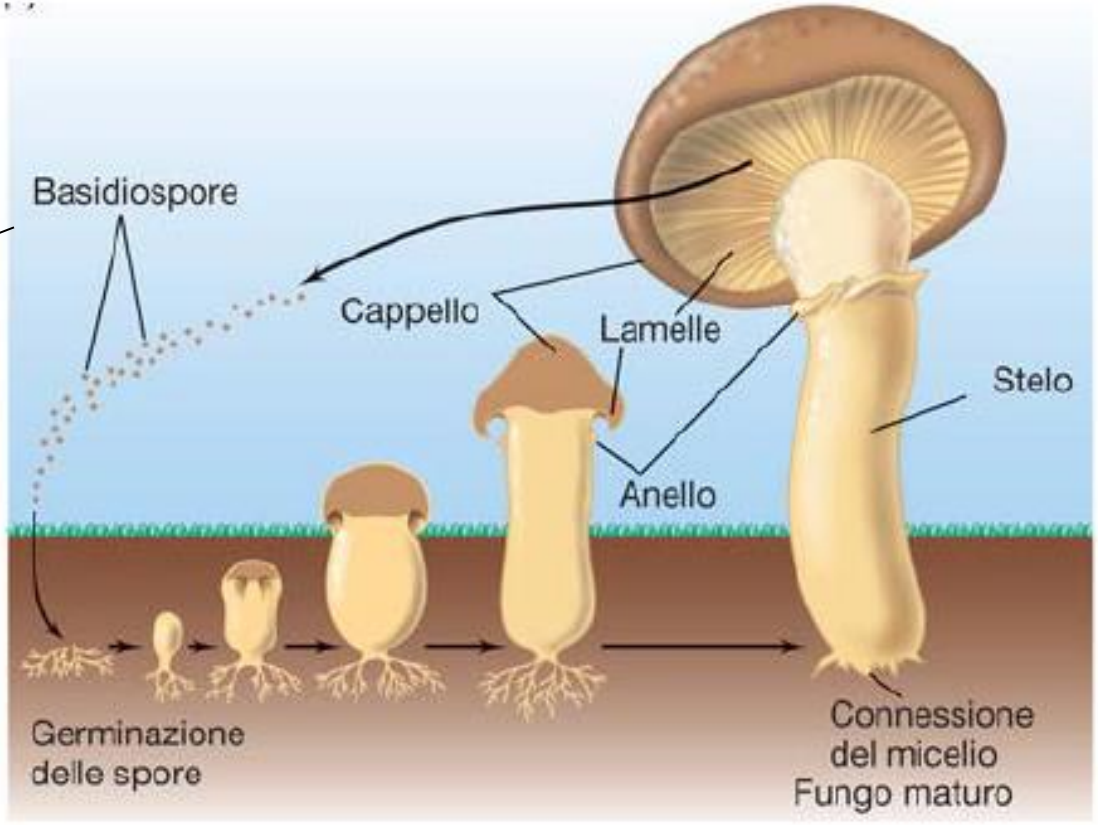
Alcune specie sono parte del microbiota fungino tipico della crosta del taleggio (*Mucor racemosus* e *M. hiemalis*)

I funghi fruttiferi

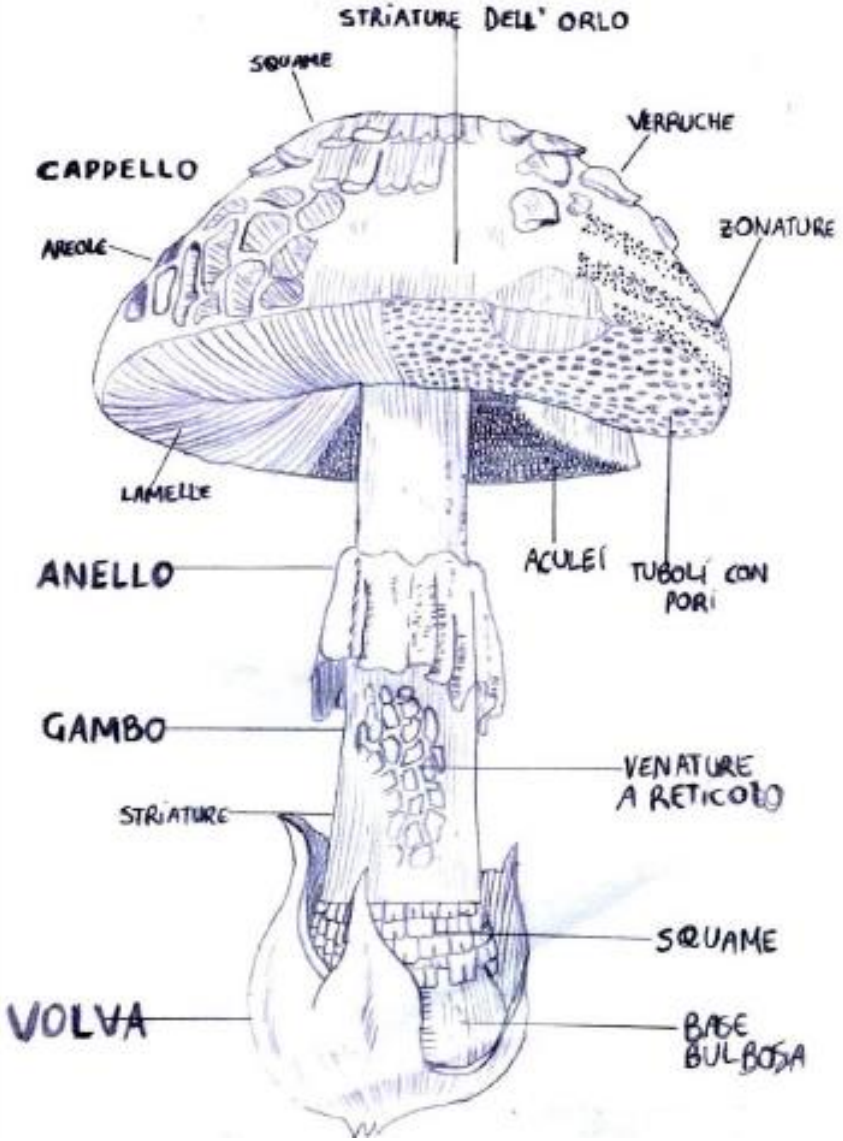
- Sono **basidiomiceti filamentosi** che formano ampie strutture dette **corpi fruttiferi (CF)** (la parte commestibile di alcuni funghi)
- Per la maggior parte della sua esistenza **vive come un semplice micelio nel suolo** o in materiale biologico in decomposizione.
- Tuttavia, quando le condizioni ambientali sono favorevoli, generalmente dopo periodi di tempo umido e fresco, si sviluppa il CF, che una volta maturo si vede chiaramente sulla superficie

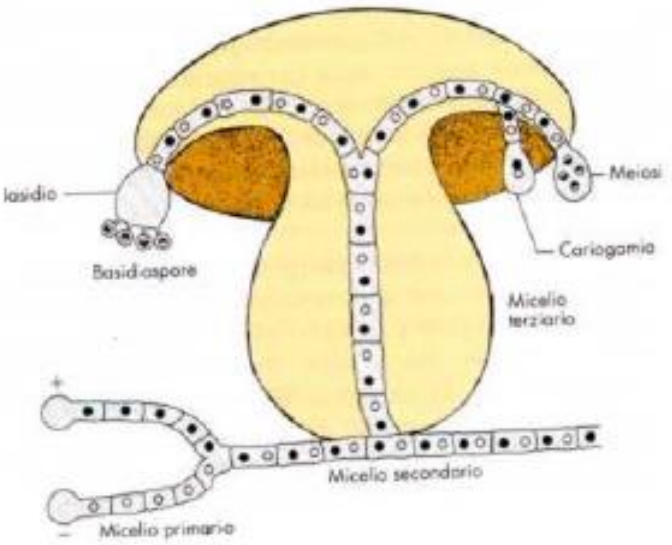
- Le basidiospore dei corpi fruttiferi **sono disperse dal vento**

- una volta giunte in terreno favorevole, generalmente umido e ricco di composti organici,
- cominciano un nuovo ciclo



- Le spore sessuali, dette **basiodiospore**, si formano sulla parte inferiore del CF su superfici piatte dette lamelle oppure in tessuti spugnosi, attaccati al cappello del fungo





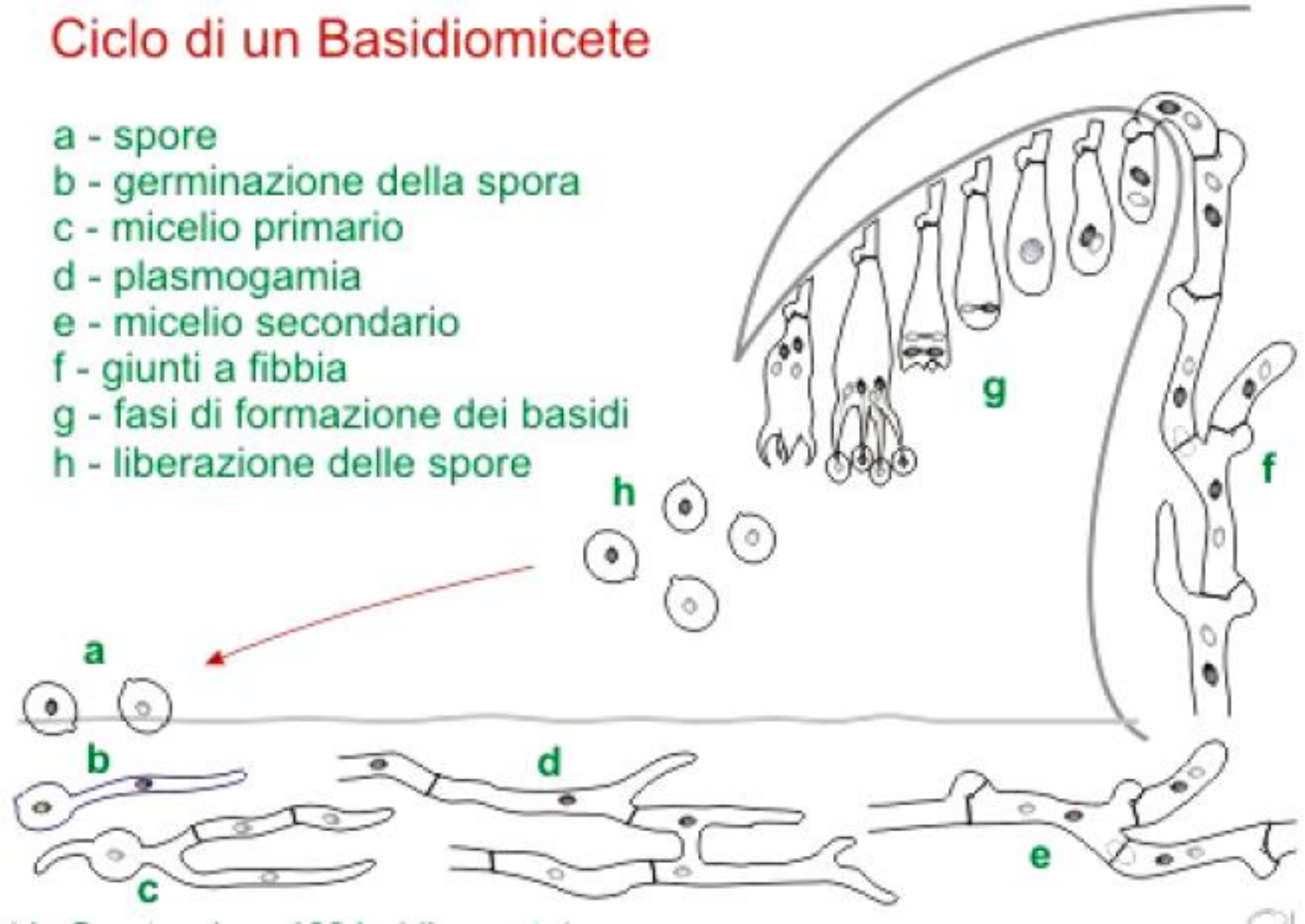
N.B.: Esistono funghi che formano carpofori maturi ipogei (cioè sottoterra), denominati comunemente come TARTUFI (genere *Tuber*)



sono ASCOMICETI

Ciclo di un Basidiomicete

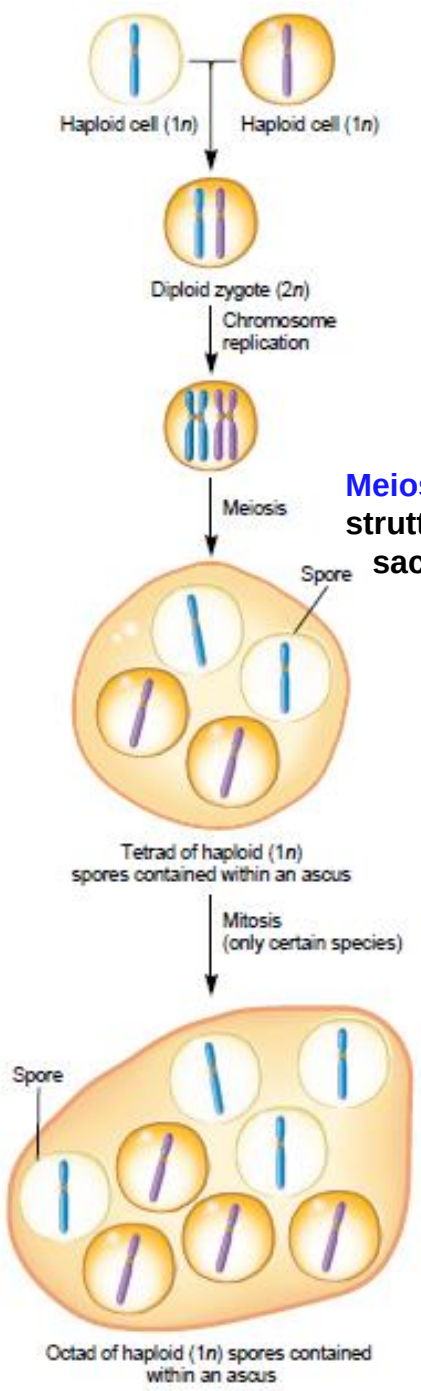
a - spore
b - germinazione della spora
c - micelio primario
d - plasmogamia
e - micelio secondario
f - giunti a fibbia
g - fasi di formazione dei basidi
h - liberazione delle spore



Riproduzione sessuale negli ascomiceti.

- Per semplicità, il diagramma mostra ciascuna cellula aploide che ha solo un cromosoma per corredo aploide.

- Per altro, specie fungine correnti hanno diversi cromosomi per set aploide.



Meiosi si ha in struttura a sacco: Asco

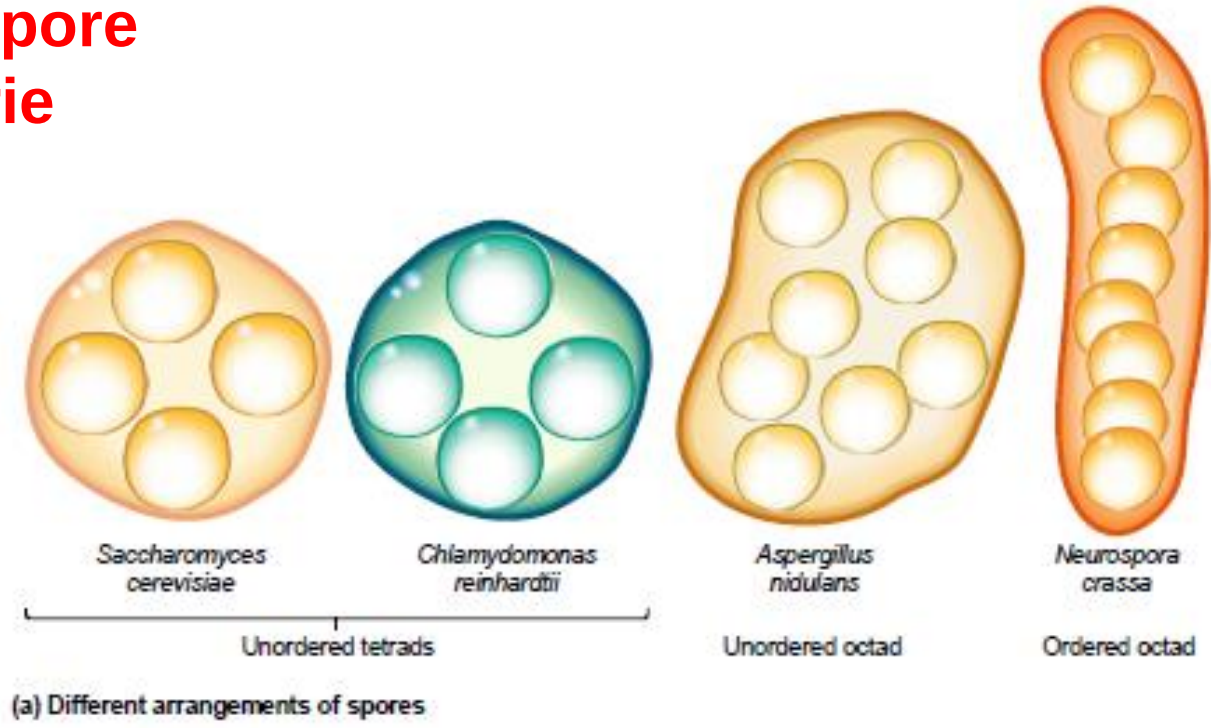
Disposizione delle spore entro aschi di varie specie

(a) *Saccharomyces cerevisiae*
Chlamydomonas reinhardtii (alga)
produce tetradi non ordinate,

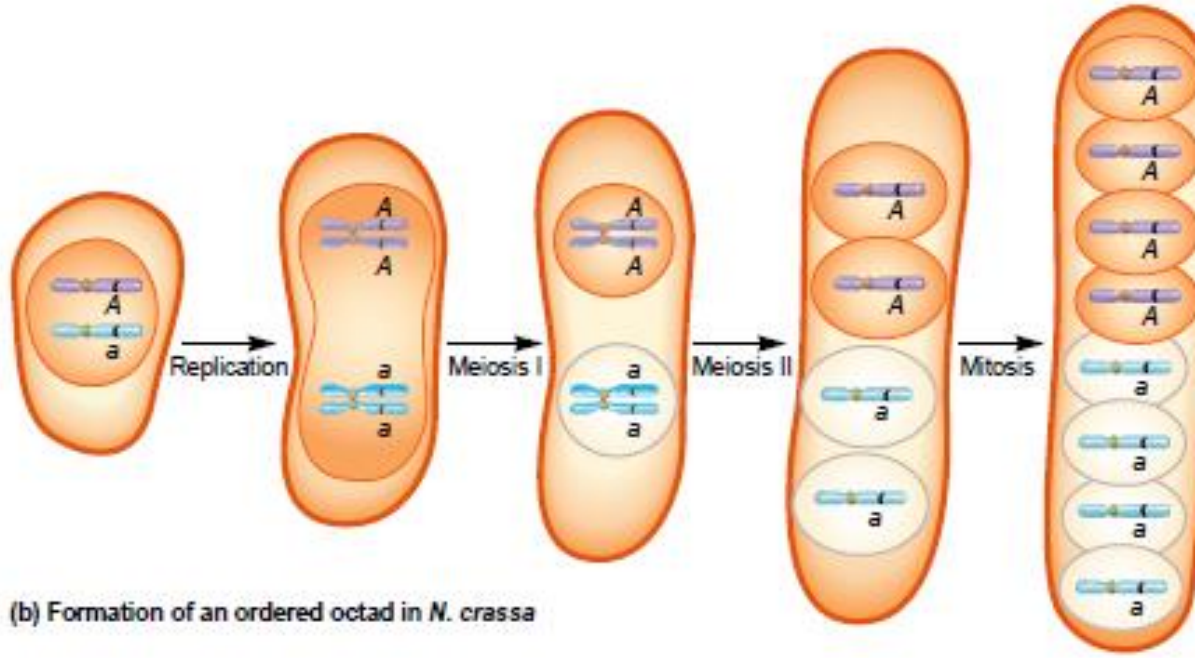
- *Aspergillus nidulans* produce ottadi non ordinate, e

- ***Neurospora crassa*** produce un'ottade ordinata.

(b) Ottadi ordinate prodotte in ***N. crassa*** da meiosi e mitosi sono disposte in modo che **le otto cellule risultanti sono disposte linearmente.**



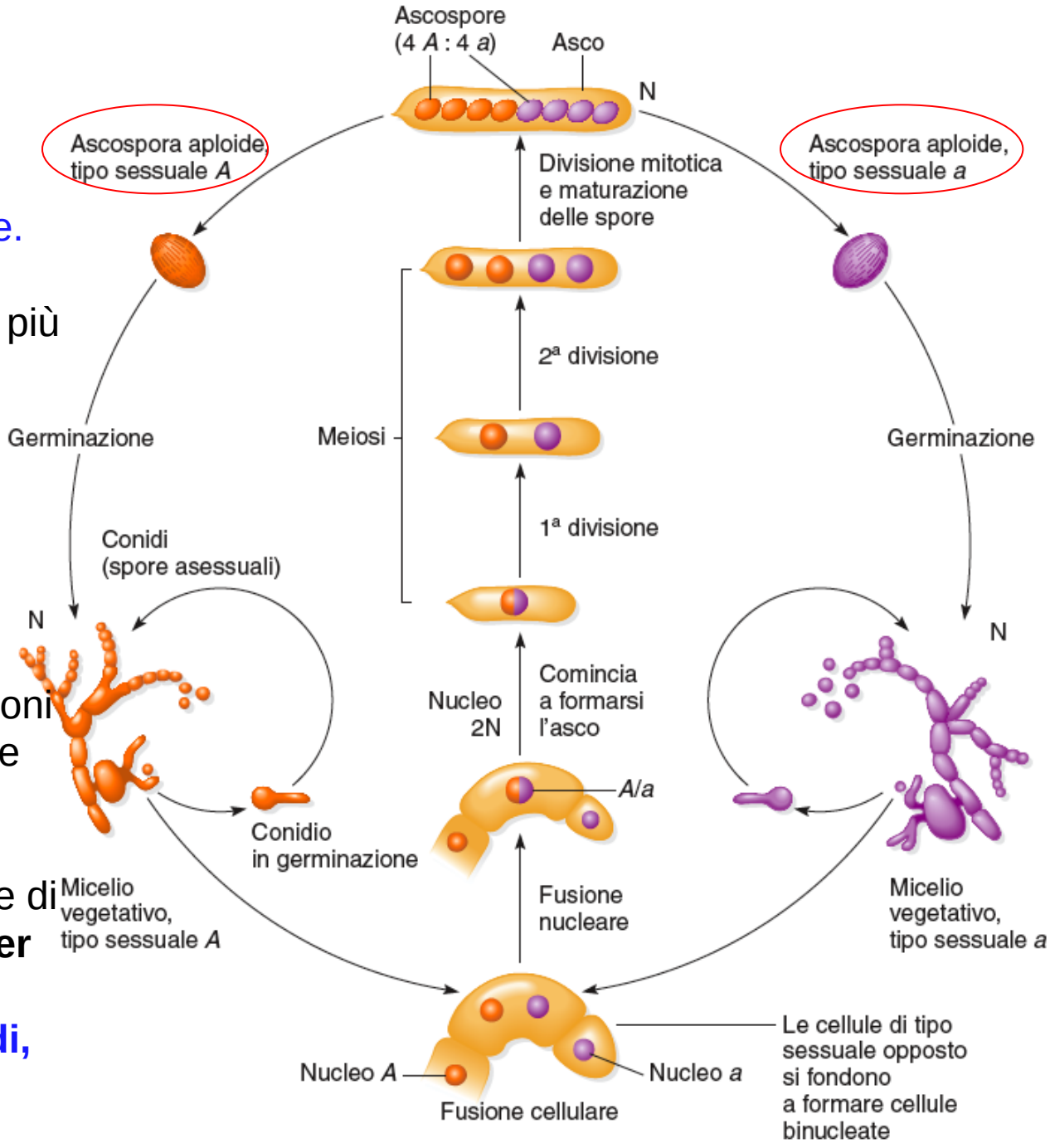
(a) Different arrangements of spores



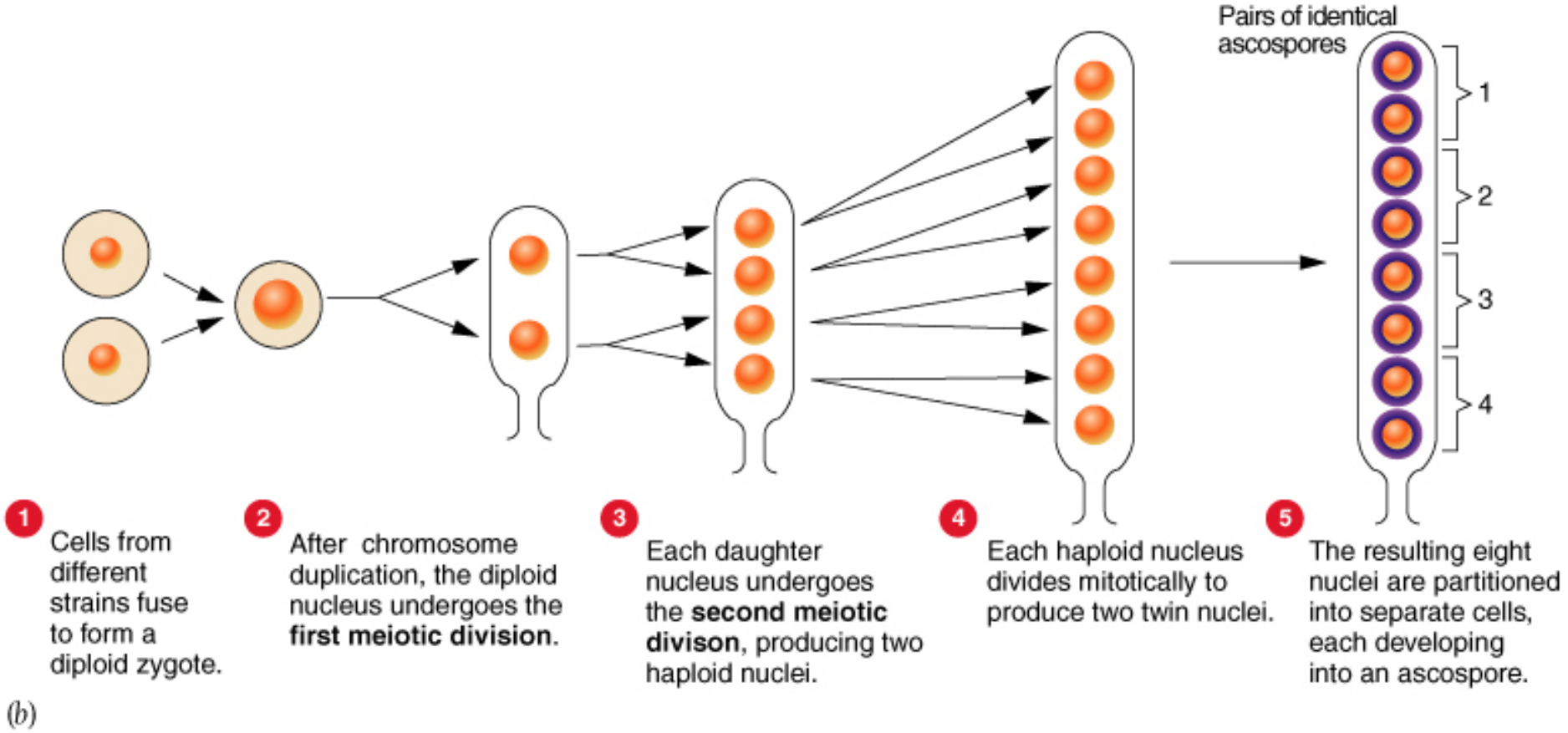
(b) Formation of an ordered octad in *N. crassa*

Ciclo vitale del fungo *Neurospora crassa*

- È la classica muffa del pane.
- Non c'è autofecondazione.
- La Neurospora vive per lo più come aploide.
- Esistono **due tipi di organismi, detti *A* e *a*,** alleli ad un locus, e la fecondazione è solo incrociata (A x a).
- Dopo la fusione dei due tipi aploidi, si hanno delle divisioni mitotiche sincrone e alla fine la produzione di meiociti.
- La sua importanza storica risiede nel fatto che permise di stabilire che il **crossing over alla meiosi avviene allo stadio di quattro cromatidi,** e per la teoria un gene un enzima



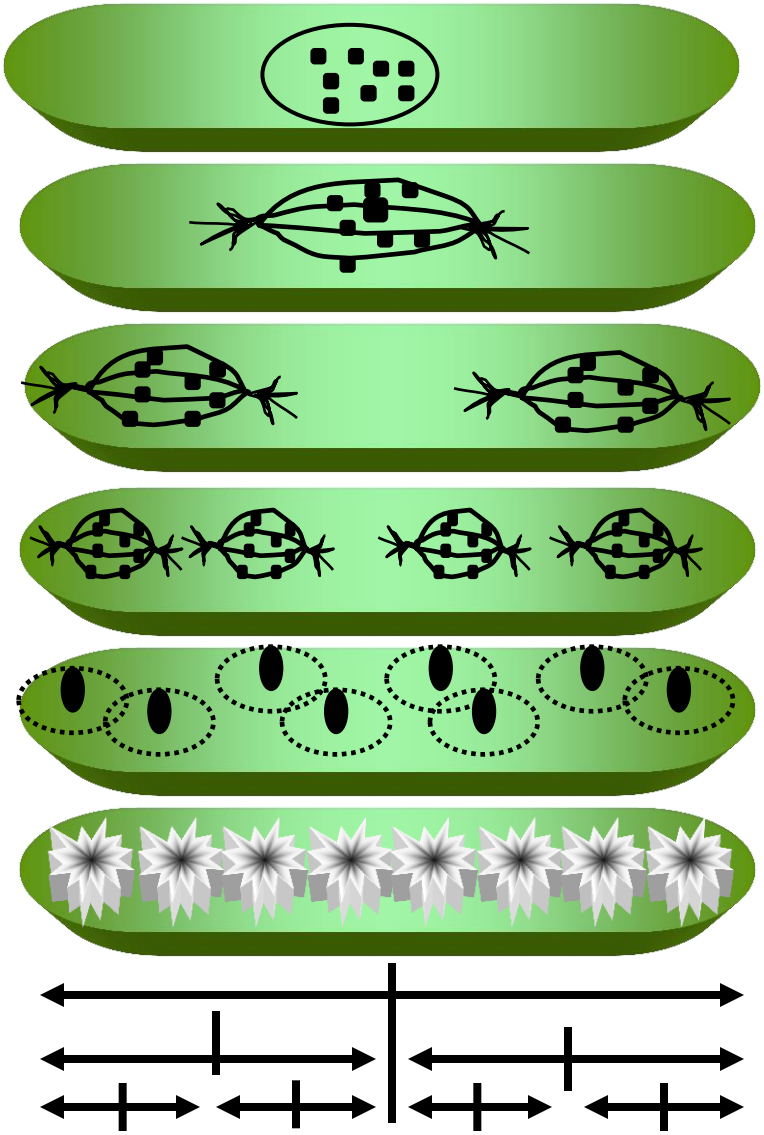
Le tetradi (ottadi) ordinate



(*b*)

- Contrariamente a quanto accade per molti altri funghi, i **prodotti meiotici della *Neurospora crassa*** risultano **ordinati** all'interno dell'asco sacciforme.
- **Questo ordinamento non è casuale:**
  riflette con precisione quanto avviene durante la meiosi.

Meiosi e formazione delle ascospore



Zigote diploide

Anafase prima divisione meiotica

Anafase seconda divisione meiotica

Anafase divisione mitotica

Inizio formazione di otto spore aploidi per asco

Asco con otto spore aploidi mature

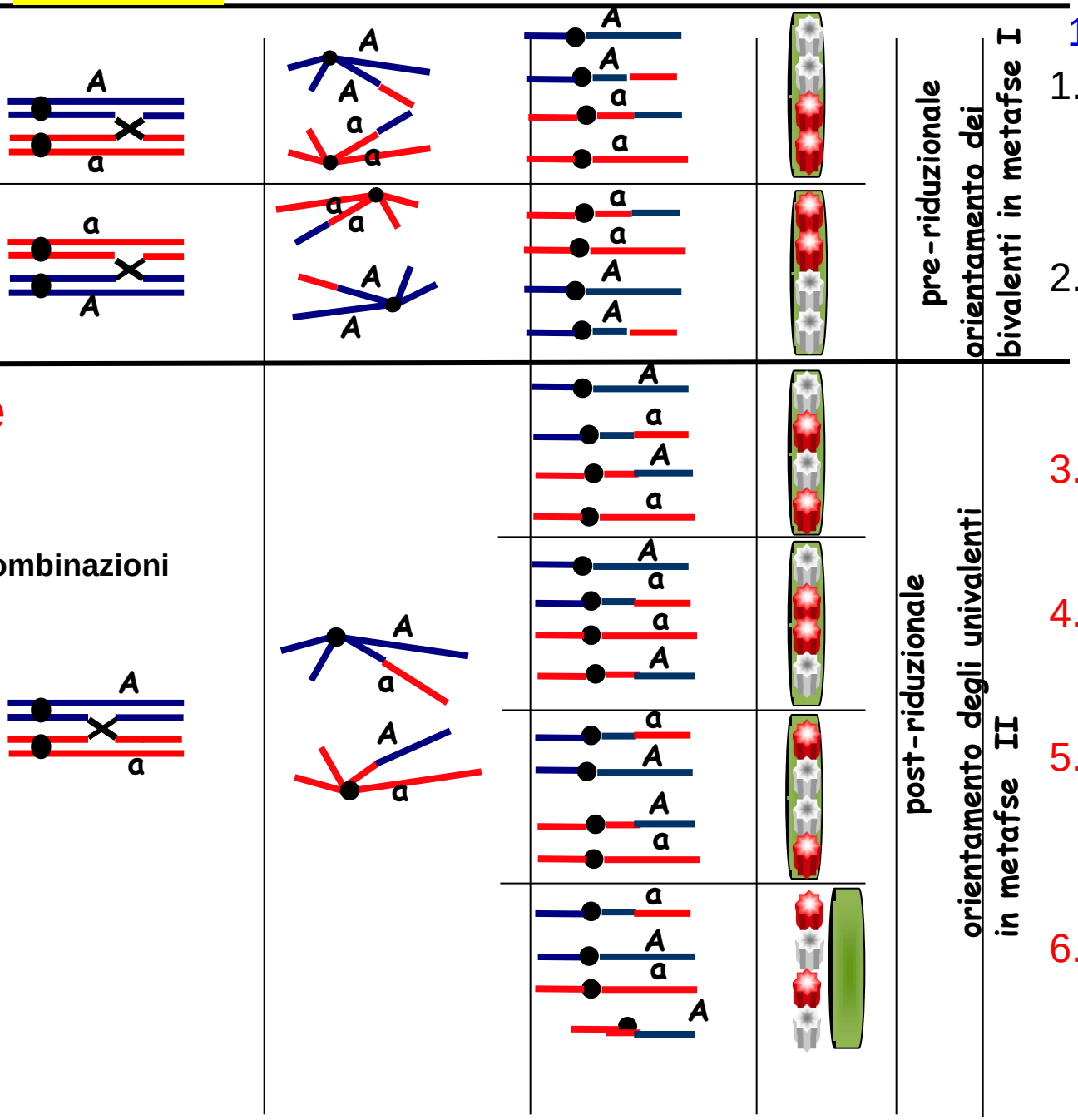
Prodotti prima divisione meiotica

Prodotti seconda divisione meiotica

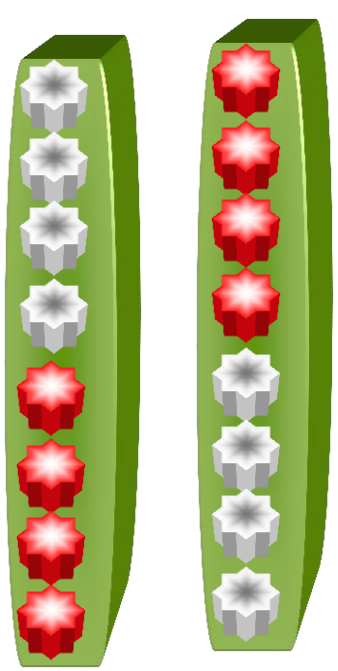
Prodotti divisione mitotica

Posizione dei X-over e segregazione degli alleli

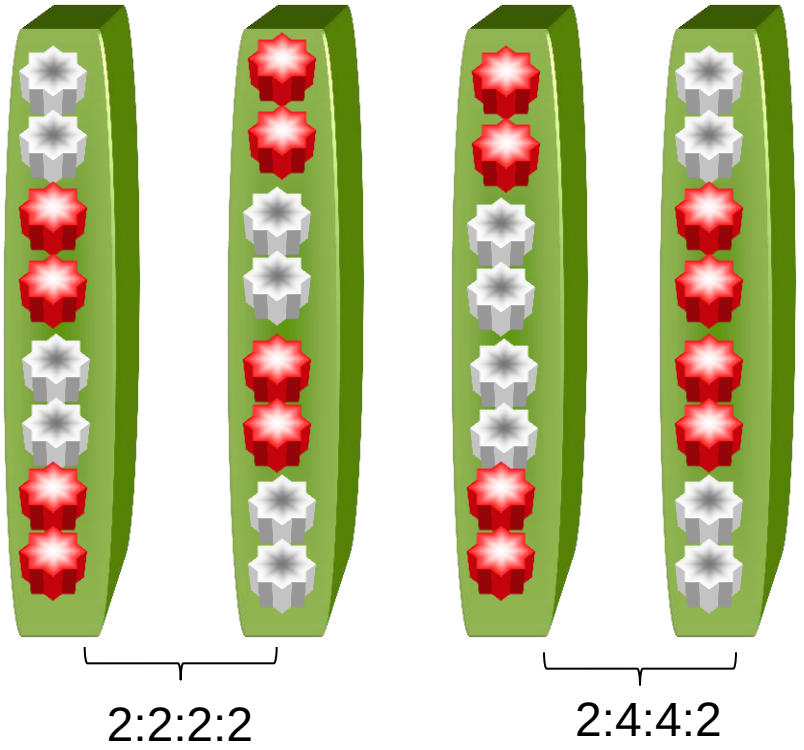
Possibili 6 possibili combinazioni



Aschi non ricombinanti *vs.* ricombinanti



Segregazione in I divisione meiotica

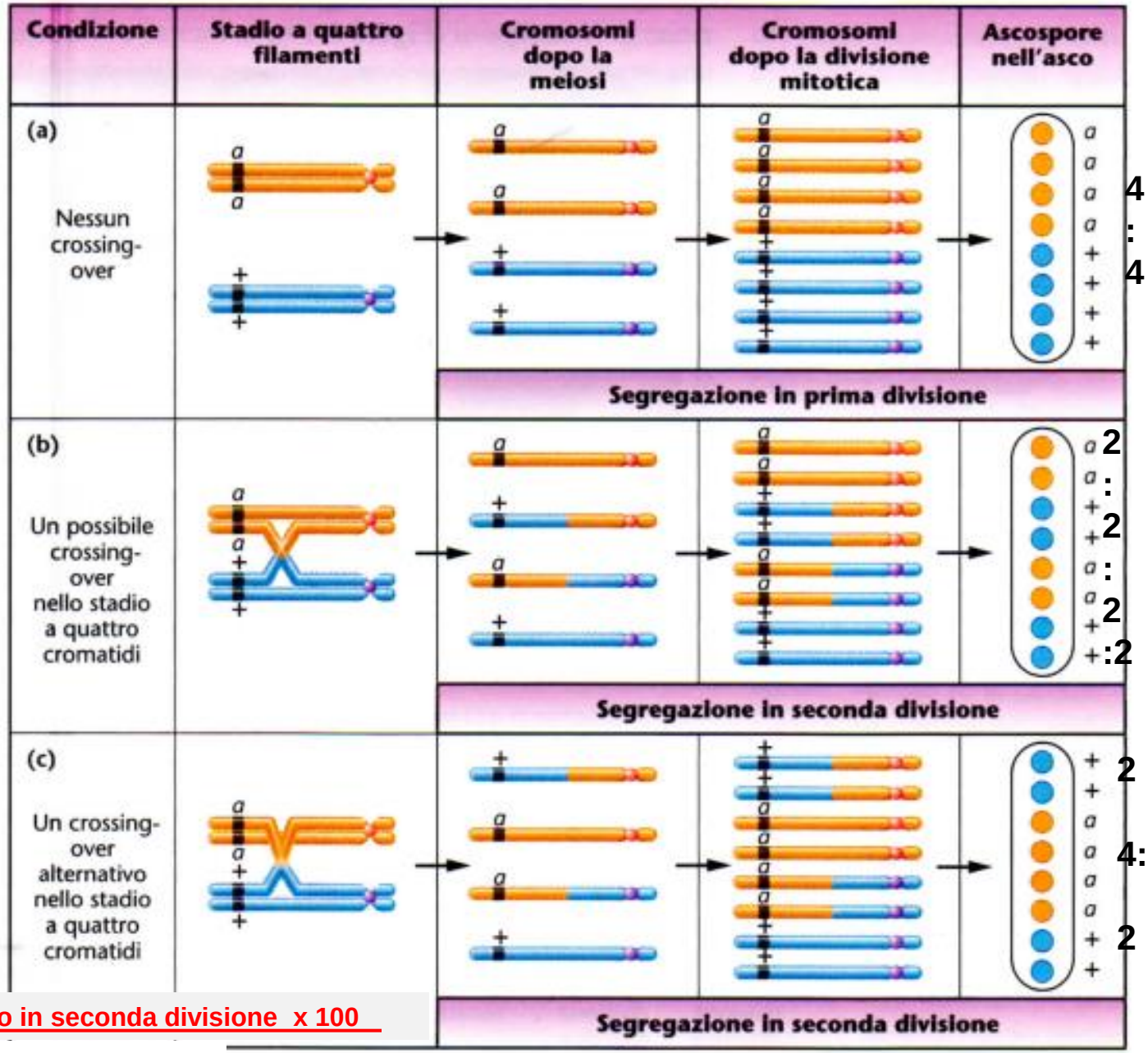


Segregazione in II divisione meiotica

Base per la mappatura di geni rispetto al centromero.

- Tre modi in cui diverse disposizioni di ascospore possono essere generate in *Neurospora.*

- L'analisi di questi pattern può fornire la base per la mappatura di geni rispetto al centromero.



$$d = \frac{\text{(1/2) aschi che segregano in seconda divisione} \times 100}{\text{Totale degli aschi analizzati}}$$

Mappare un gene rispetto al centromero

Thi: thiamin **Cho: cholin**

1.Cross: thi⁻ **2.Cross: *chol*⁻**

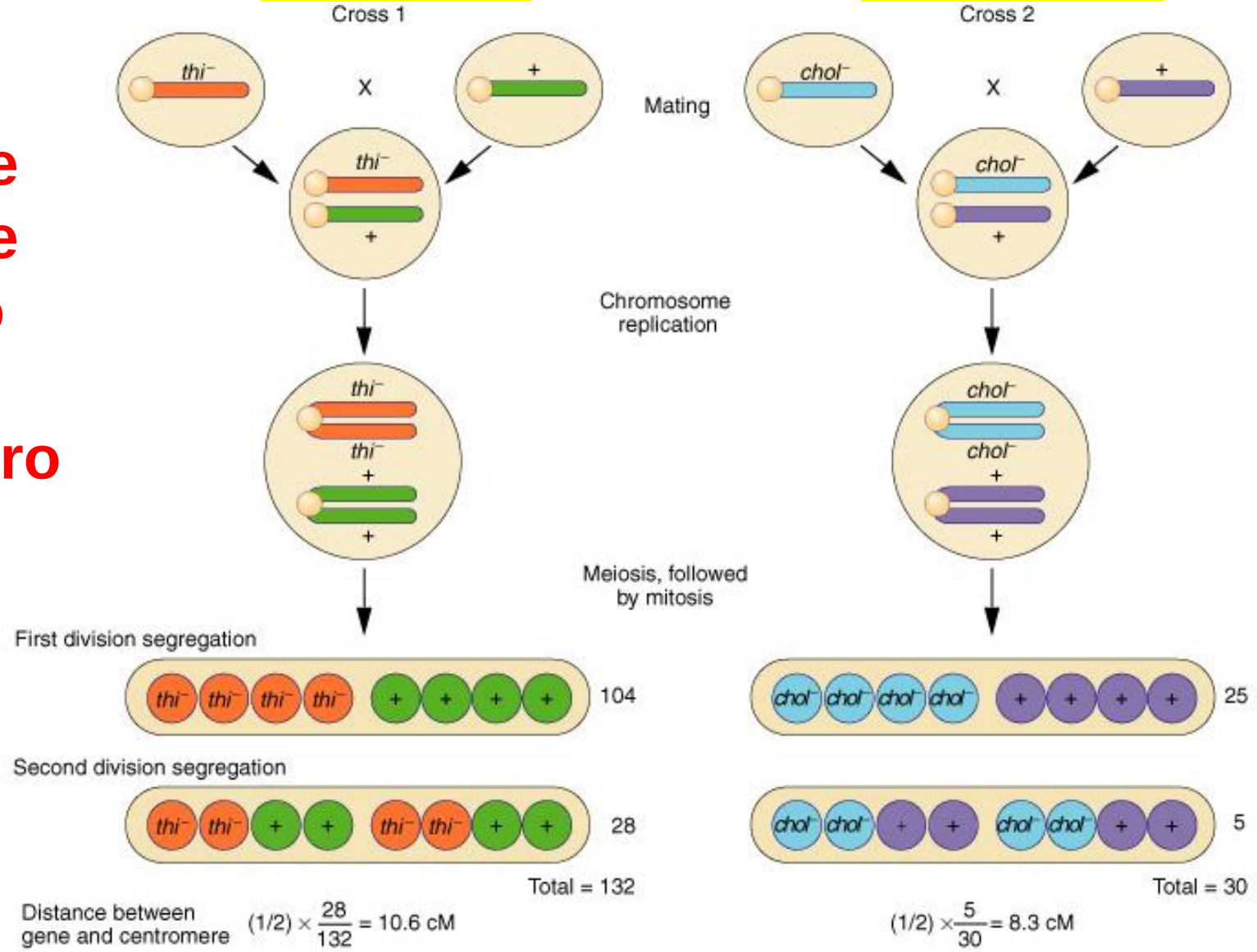


Figure 9.9 Centromere mapping in *Neurospora*. In Cross 1, the mutant strain, *thi*⁻, requires thiamin; in Cross 2, the mutant strain, *chol*⁻, requires choline.

Copyright 2000 John Wiley and Sons, Inc.

Come mappare i geni in Neurospora

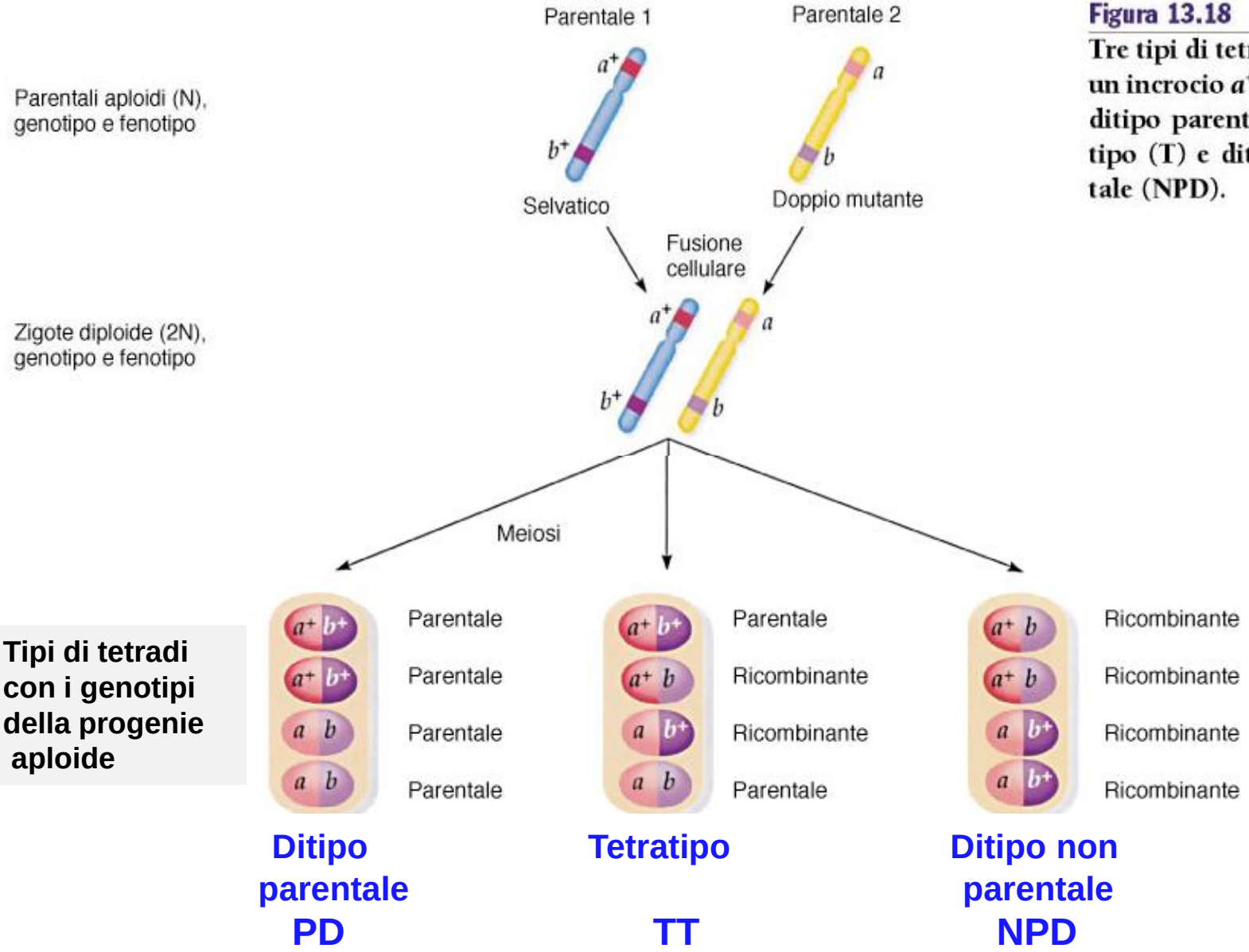


Figura 13.18
Tre tipi di tetradi prodotti da un incrocio $a^+ b^+ \times a\ b$: tetradi ditipo parentale (PD), tetratipo (T) e ditipo non parentale (NPD).

Tipi di tetradi con i genotipi della progenie aploide

Ditipo parentale PD

Tetratipo TT

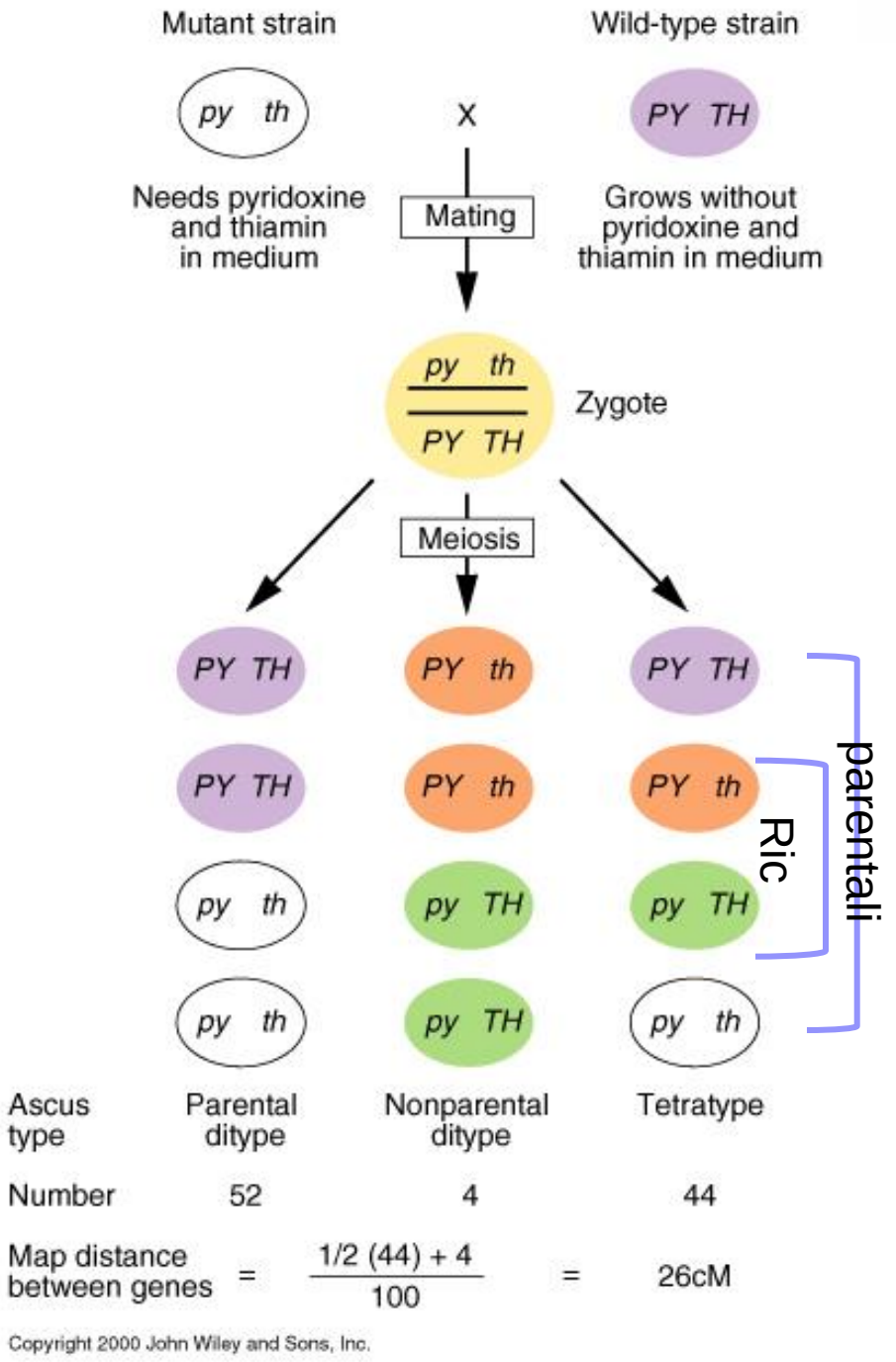
Ditipo non parentale NPD

Mappare due geni tra loro

- Ricordare che:

❑ se due geni **non sono** associati,
allora DP=DNP (DNP non è ricombinante per crossing over, ma
per assortimento indipendente!);

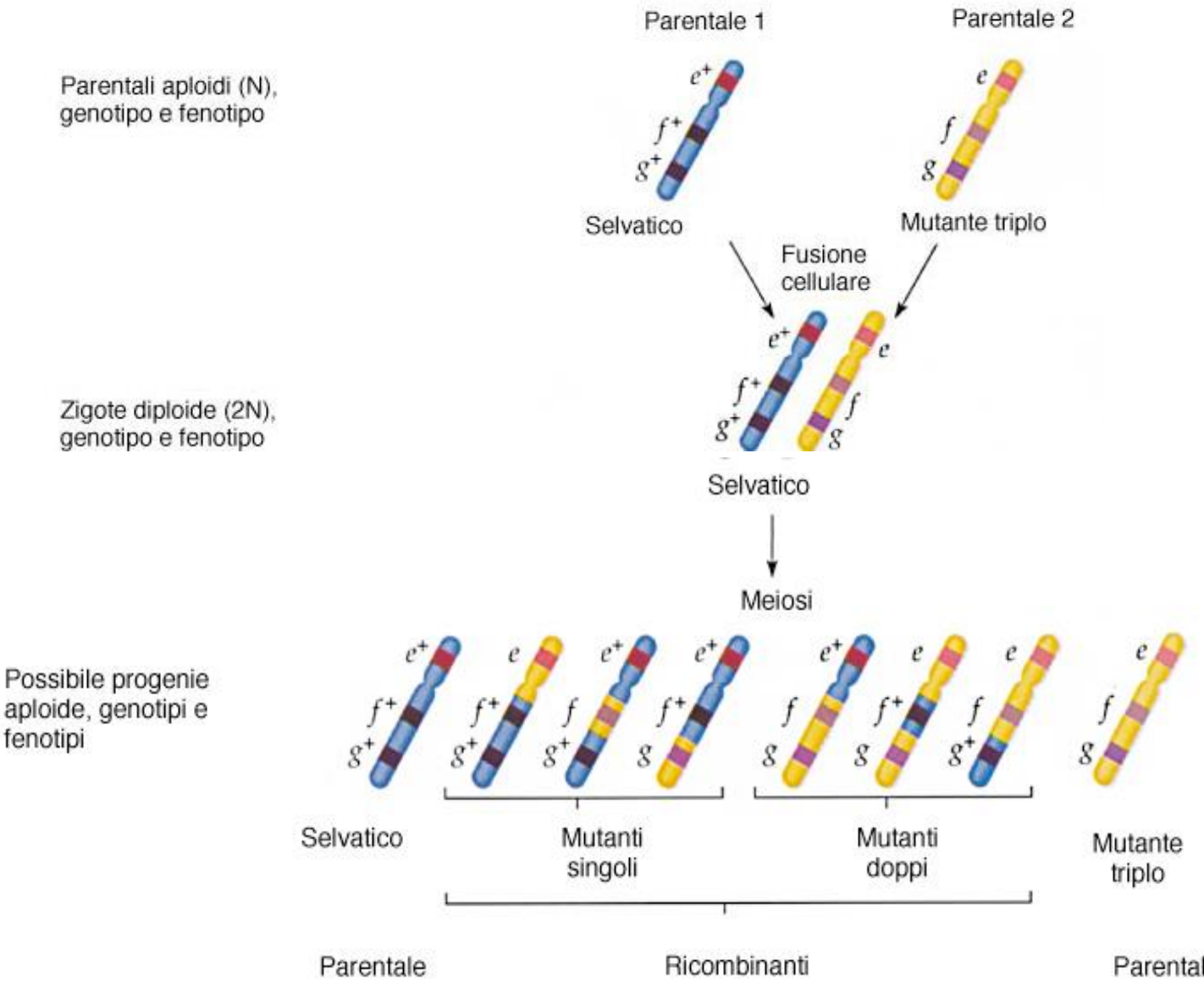
❑ se due geni **sono** associati,
- i DNP sono tutti ricombinanti (e sono i più rari),
- mentre i TT sono ricombinanti solo per metà.



Copyright 2000 John Wiley and Sons, Inc.

Mappe genetiche in Neurospora

Figura 13.17
Tipico incrocio genetico per mappare tre geni in un organismo aploide come il lievito o la *Neurospora*.



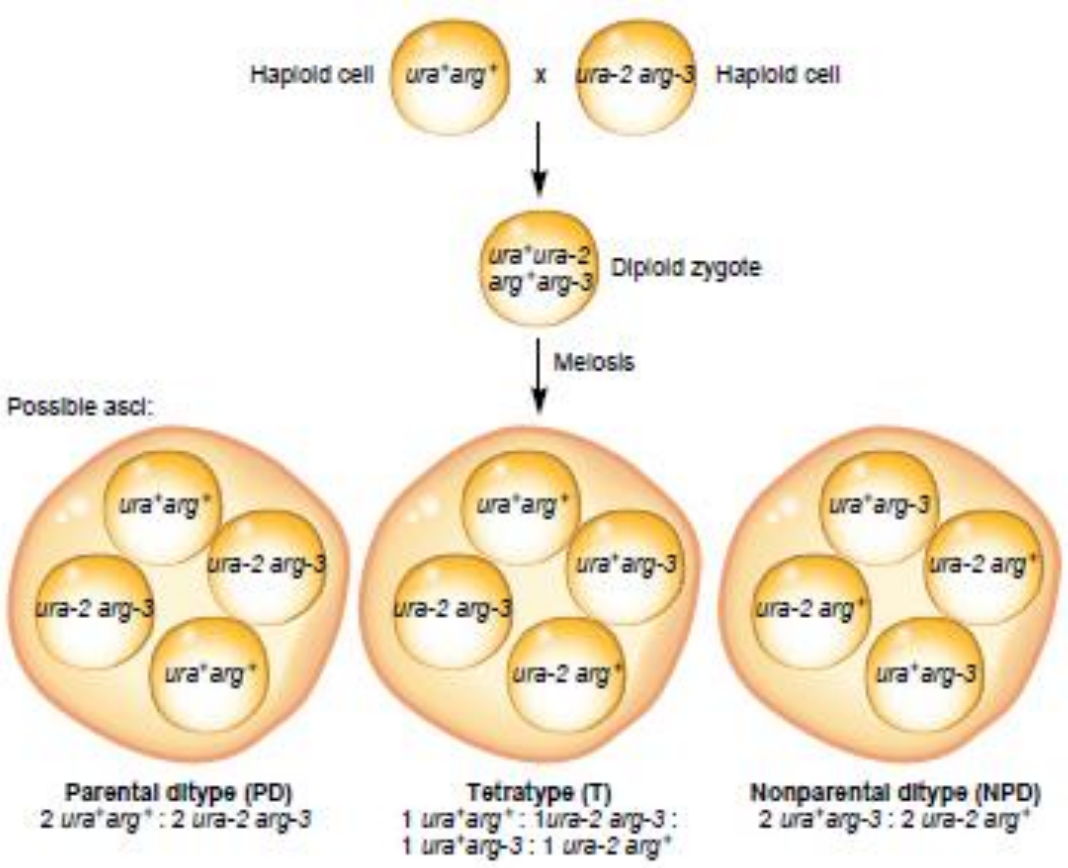
Analisi delle tetradi non ordinate può essere impiegata per mappare geni in incroci di-ibridi

❑ **L'assortimento di due geni in una tetrade non ordinata .**

➢ Se la tetrade contiene il 100% di cellule parentali, questo asco ha il **di-tipo parentale (PD).**

➢ Se contiene il 50% di cellule parentali e il 50% di ricombinanti, esso è **un tetratipo (TT).**

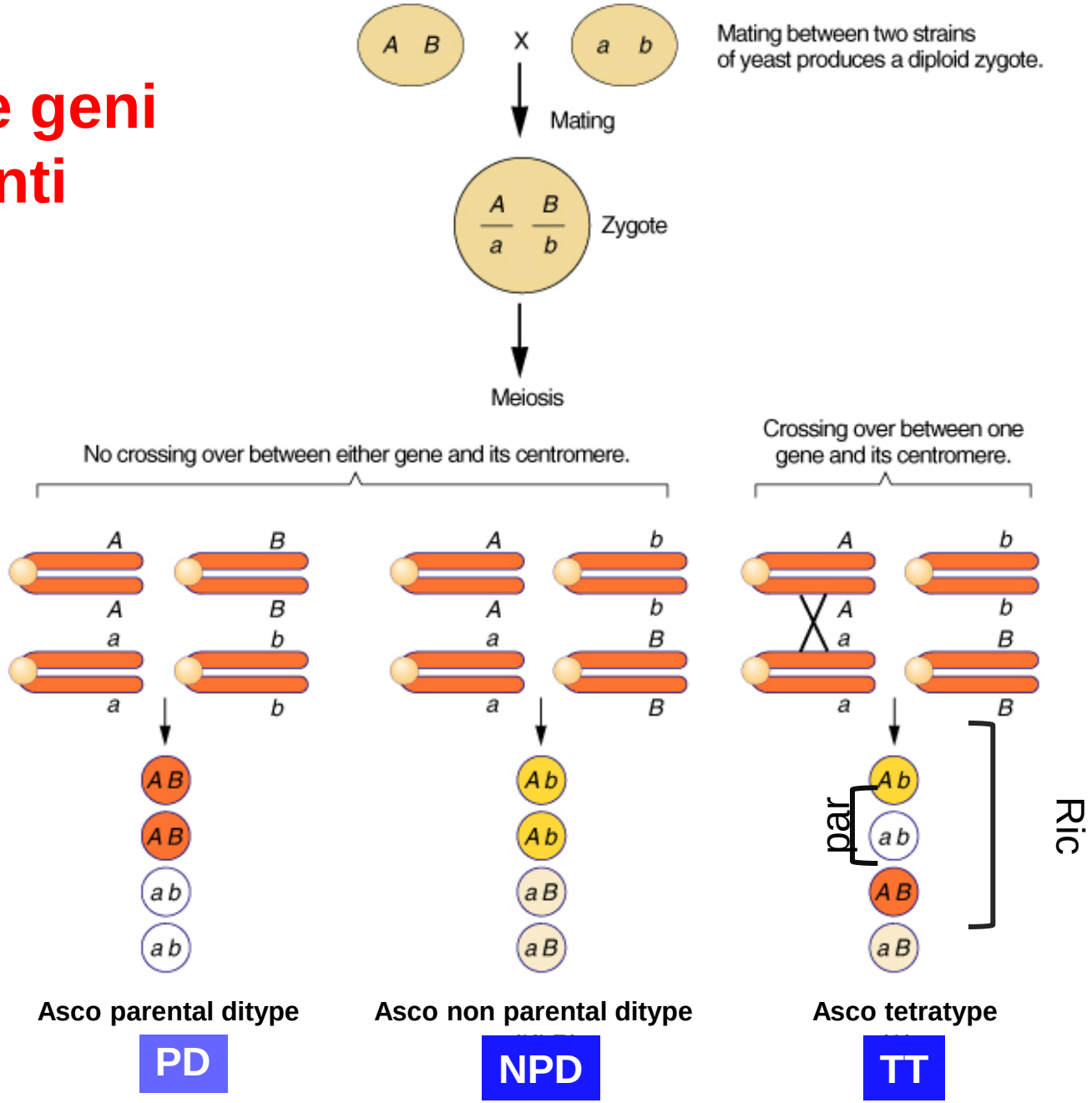
➢ Per ultimo, se un asco contiene il 100% di cellule recombinanti è chiamato un **ditipo non parentale (NPD).**



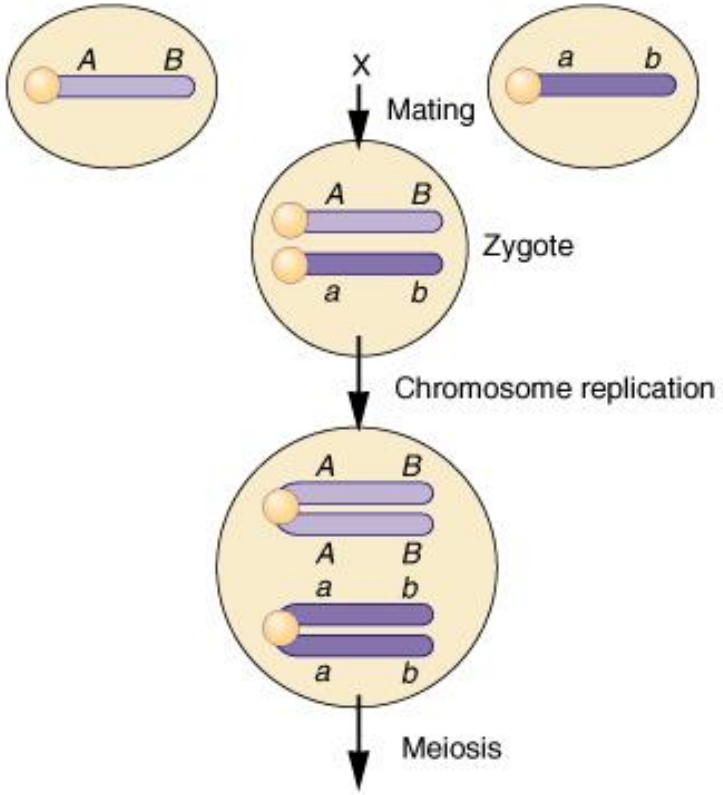
- La figura non illustra la localizzazione cromosomica degli alleli.
- In questo tipo di esperimento, l'obiettivo è diretto a determinare se i due geni sono concatenati.sullo stesso cromosoma.

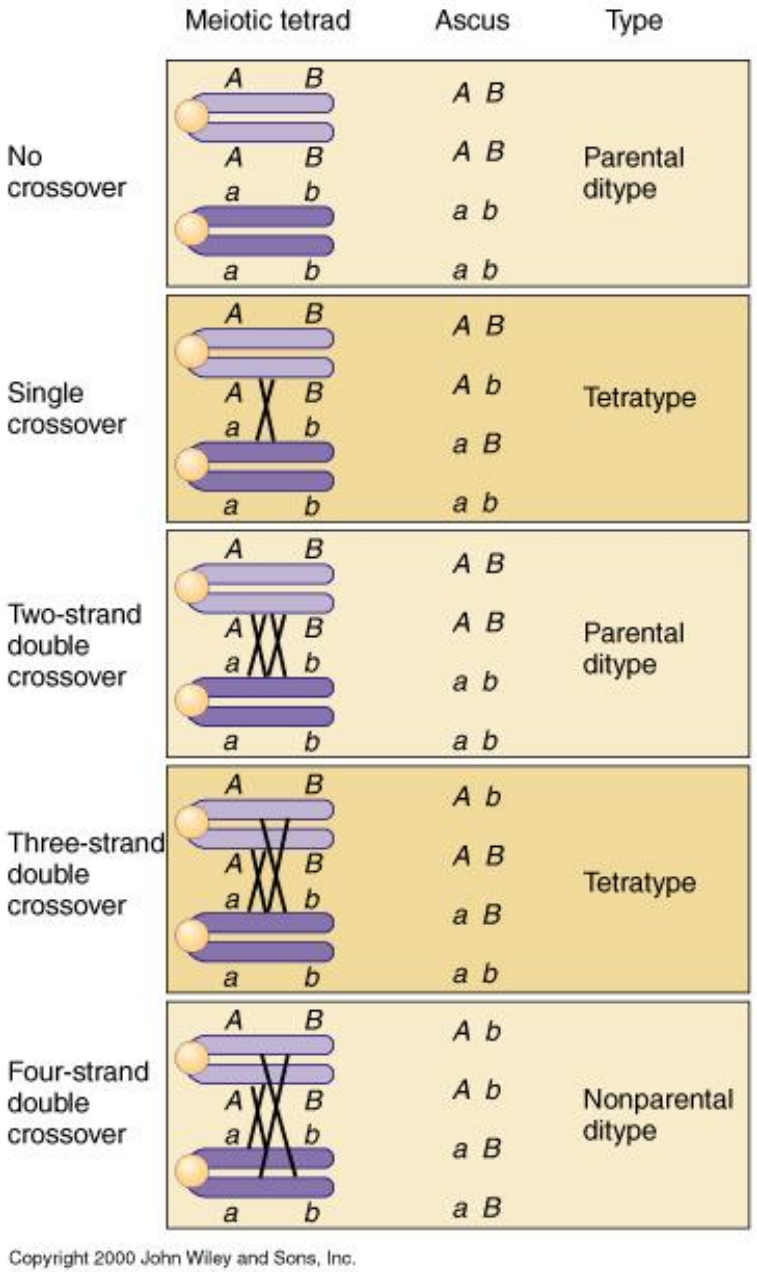
Analisi di due geni indipendenti

- se due geni **non sono** associati, allora DP=DNP (DNP non è ricombinante per crossing over, ma per assortimento indipendente!);



Analisi di due geni concatenati





Copyright 2000 John Wiley and Sons, Inc.

- **se due geni sono associati,**
  - DNP sono tutti ricombinanti (e sono i più rari),
  - mentre i TT sono ricombinanti solo per metà.

Mappare due geni tra loro

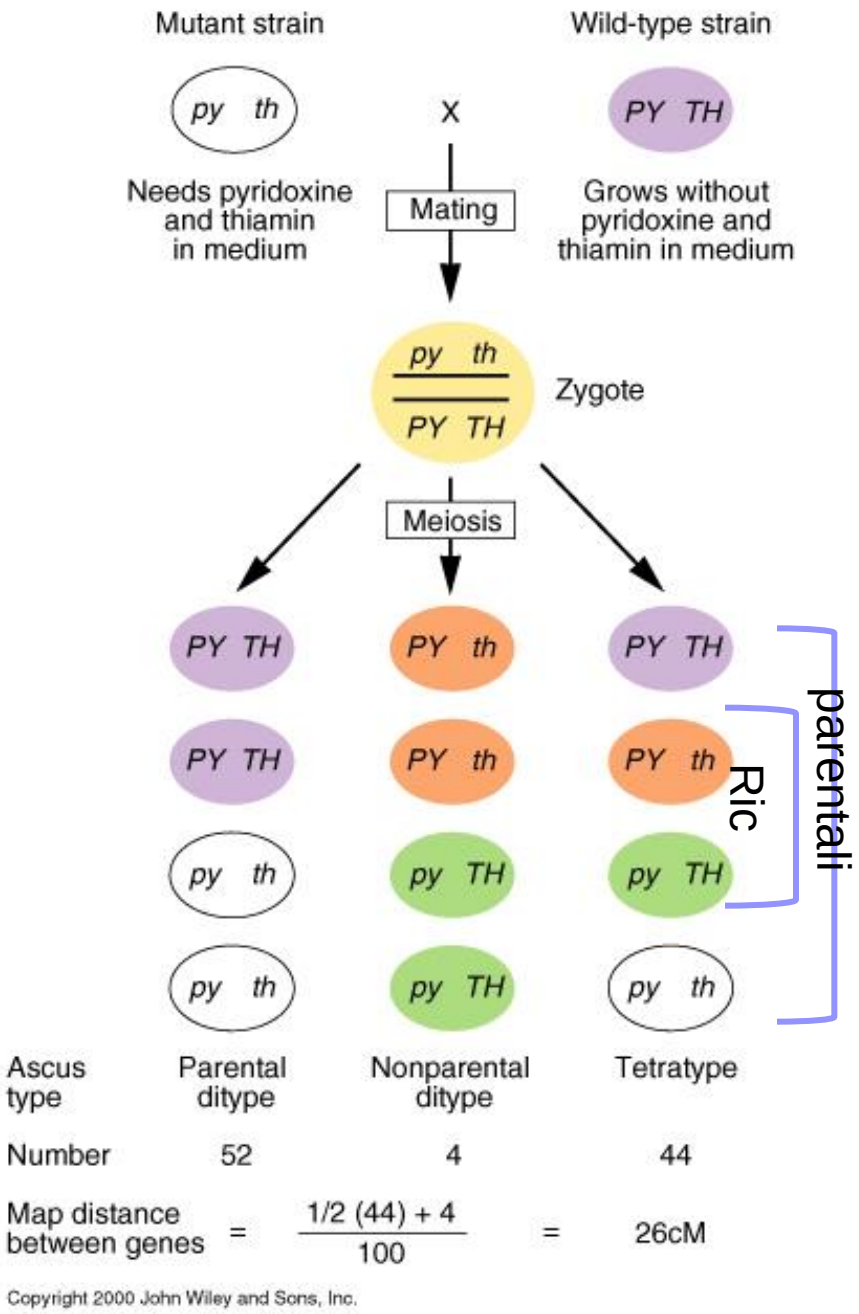
- Ricordare che:

❑ se due geni **non sono** associati, allora DP=DNP (DNP non è ricombinante per crossing over, ma per assortimento indipendente!);

❑ se due geni **sono associati**, i DNP sono tutti ricombinanti (e sono i più rari), mentre i TT sono ricombinanti solo per metà.

$$\text{Map distance} = \frac{\text{NPD} + (1/2)(\text{T})}{\text{total number of asci}} \times 100$$

• Formula valida quando i geni sono abbastanza vicini al centromero e non ci sono X-over multipli



Conversione Genica

- La maggior parte degli aschi da diploidi eterozigoti *Aa* mostrano normale segregazione mendeliana con rapporti di segregazione di

  2A : 2a in spore a quattro aschi, o **4A : 4a in spore ad otto aschi**

- Occasionalmente, si trovano anche rapporti aberranti, p.e.

  3A : 1a o 1A : 3a e 5A : 3a o 3A : 5a.

- Gli aschi aberranti sono il risultato di gene conversion**:**

  un allele ha "convertito" l'altro allele in una forma simile alla sua

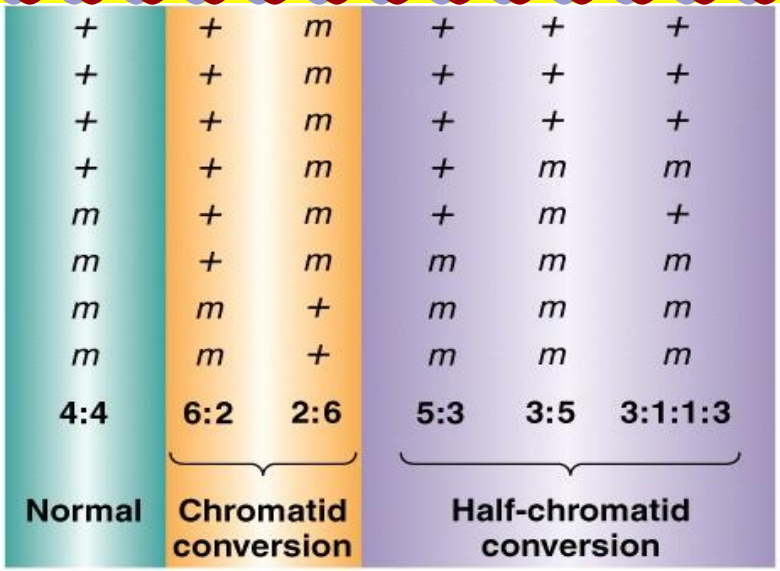
  ovvero

  quando un allele di un gene viene perso e sostituito con un allele diverso

- E' un **evento di ricombinazione genica del DNA,** frequentemente accompagnato da ricombinazione genica tra marcatori genetici su entrambi i lati dell'evento di ricombinazione, anche quando i due marcatori fiancheggianti sono strettamente associati
- **Risulta da un normale processo** di riparazione del DNA nella cellula **noto come mismatch repair**
- Suggerisce un meccanismo molecolare di ricombinazione

La ricombinazione converte una versione allelica di un gene nella versione allelica della sequenza presente sull'omologo

Gene Conversion during Meiosis



(*Note*: 3:1:1:3 = aberrant 4:4.)

Departures from predicted Mendelian 4:4 segregation

0.1-1.0% in filamentous fungi, up to 4% in yeast

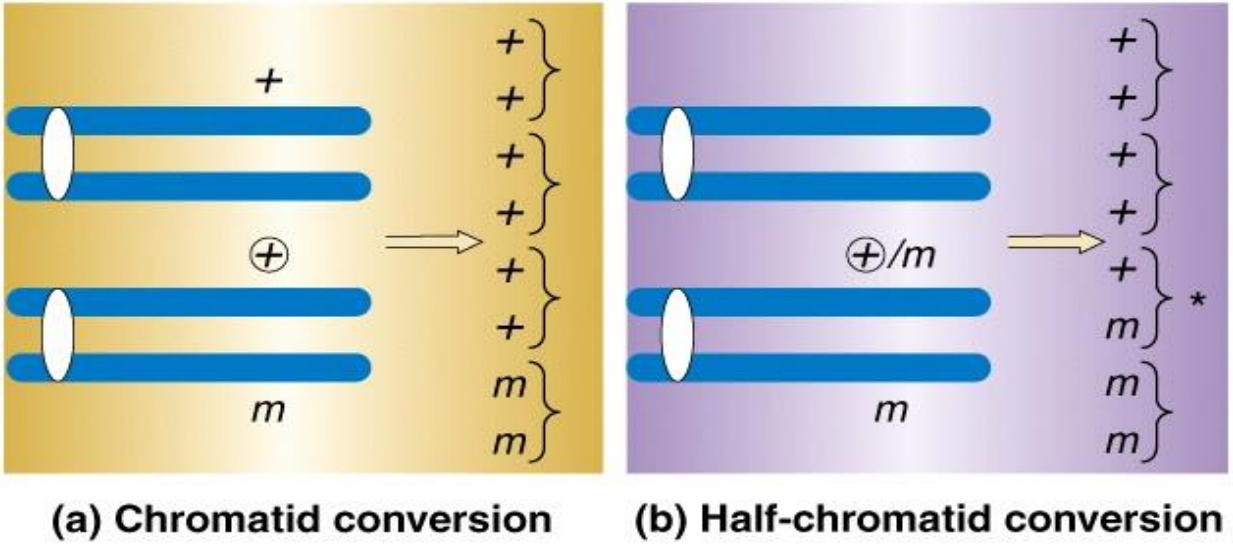
Gene conversion

5:3 or 3:5 ratios ;

- **two different strand of double helix carrying information for two different alleles at the conclusion of meiosis**

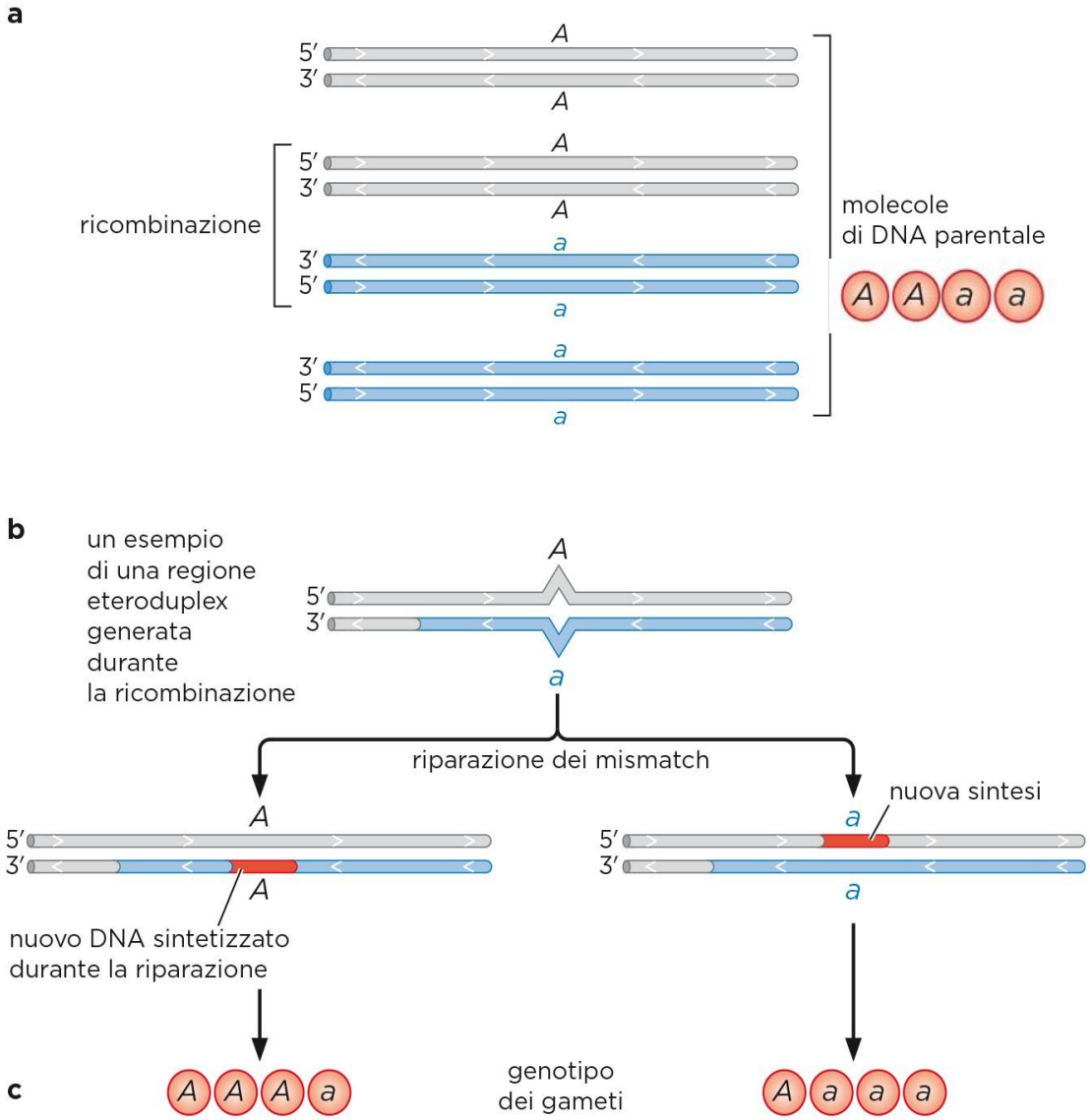
  ≠ Mutation

- **The allele that is converted always changes into the other specific allele taking part in the cross**



(a) Chromatid conversion (b) Half-chromatid conversion

Negli appaiamenti di ricombinazione uno scorretto appaiamento può dare origine a un evento di CONVERSIONE GENICA.



Classic problem in meiosis

- Damage produces 3' overhang
- Start of homologous recombination
- formation of Holiday junction
- strand exchange during recombination

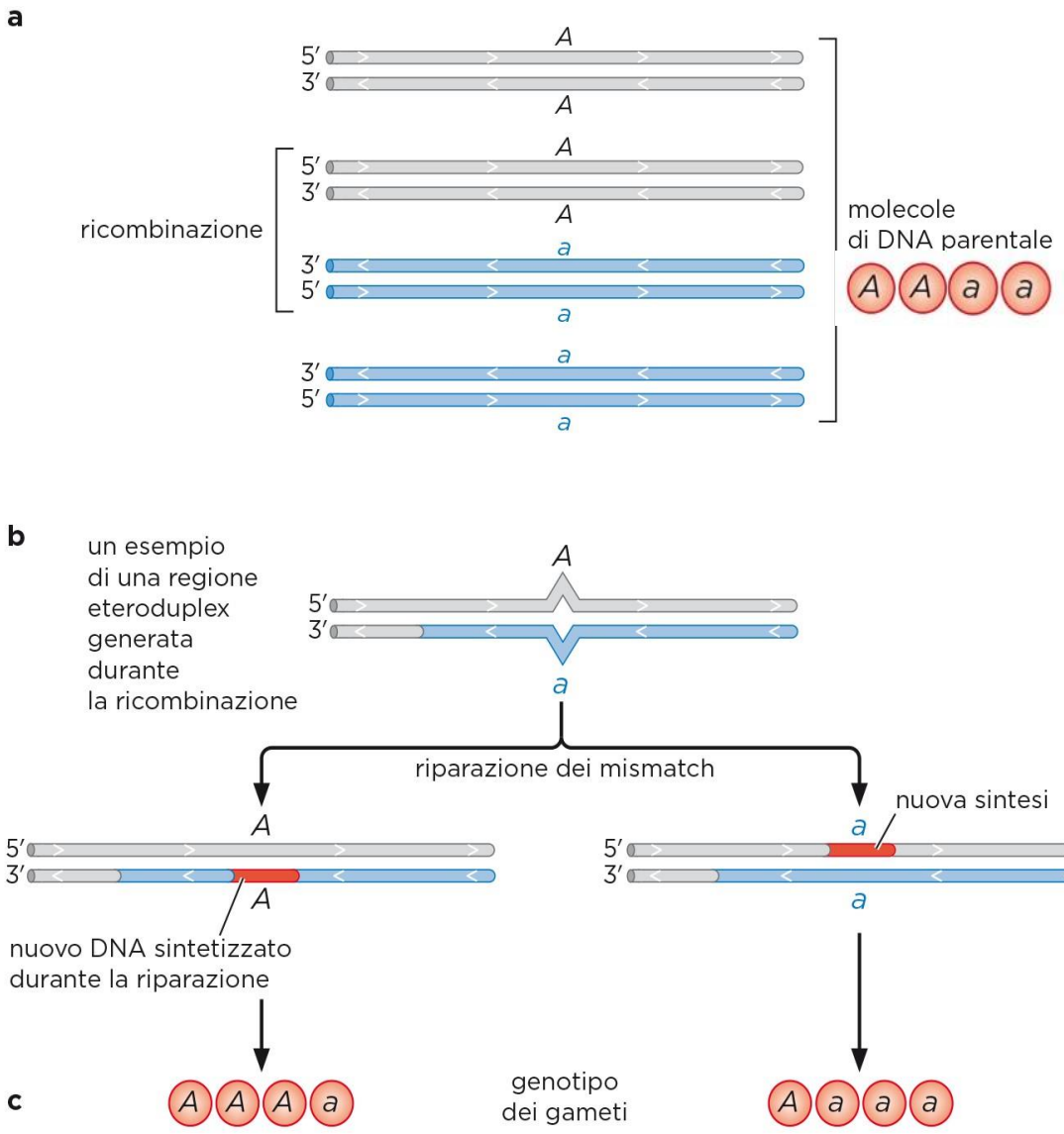
-Between 2 homologous sequences

-NOTE: sequences are not 100% identical

→HETERODUPLEX FORMS DURING RECOMBINATION = MISMATCHES!!!

SOLUTION:
DNA MISSMATCH REPAIR

Negli appaiamenti di ricombinazione uno scorretto appaiamento può dare origine a un evento di CONVERSIONE GENICA.



Classico problema in meiosi

- Il danno produce una sporgenza in 3’
- Inizio della ricombinazione omologa
- formazione di Holiday Junction
- scambio di filamenti durante la ricombinazione tra 2 sequenze omologhe

-NOTA: le sequenze non lo sono al 100% identiche

 Si FORMA ETERODUPLEX DURANTE LA RICOMBINAZIONE = MISMATCHING!!!

SOLUZIONE:
RIPARAZIONE DEL MISSMATCH DEL DNA

10b. Meccanismi di ricombinazione omologa

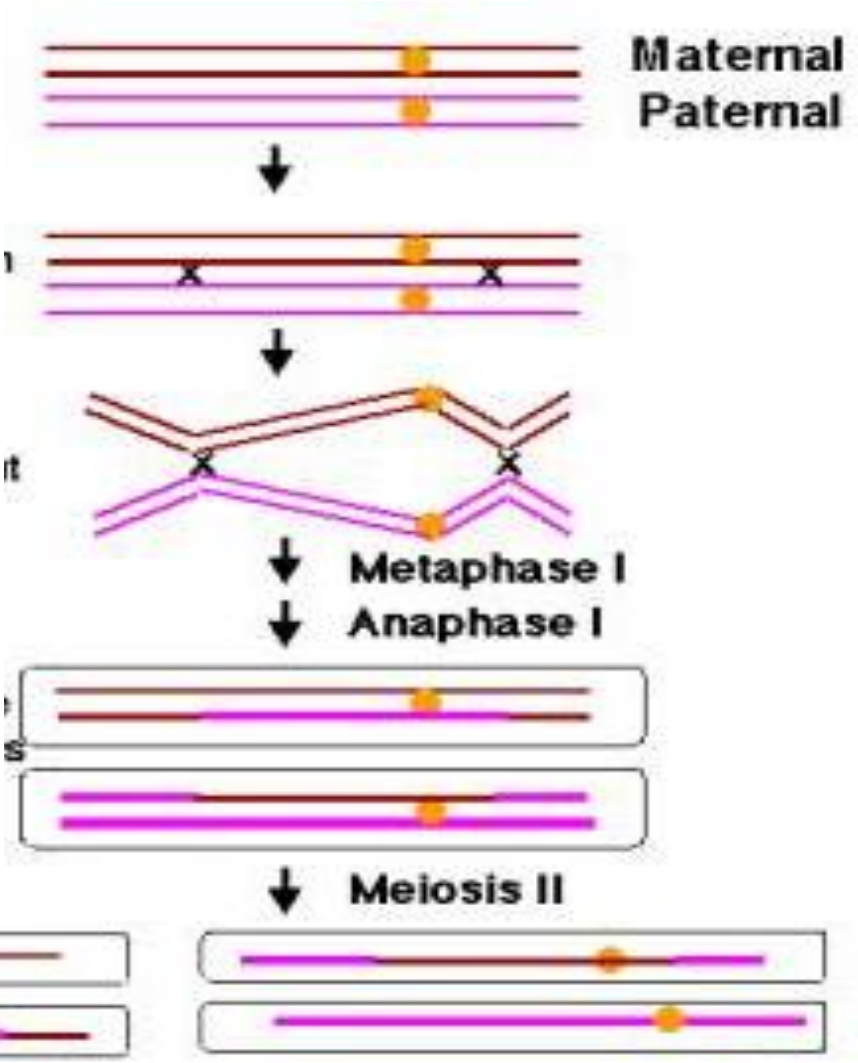
I) RICOMBINAZIONE GENETICA OMOLOGA

- Nei **batteri è** principalmente un **processo di riparazione del DNA**.
  - In quel contesto viene definita come riparazione ricombinativa del DNA.
  - E' comunemente diretta alla ricostruzione della forcella replicativa quando questa si blocca nei pressi di un danneggiamento del DNA.

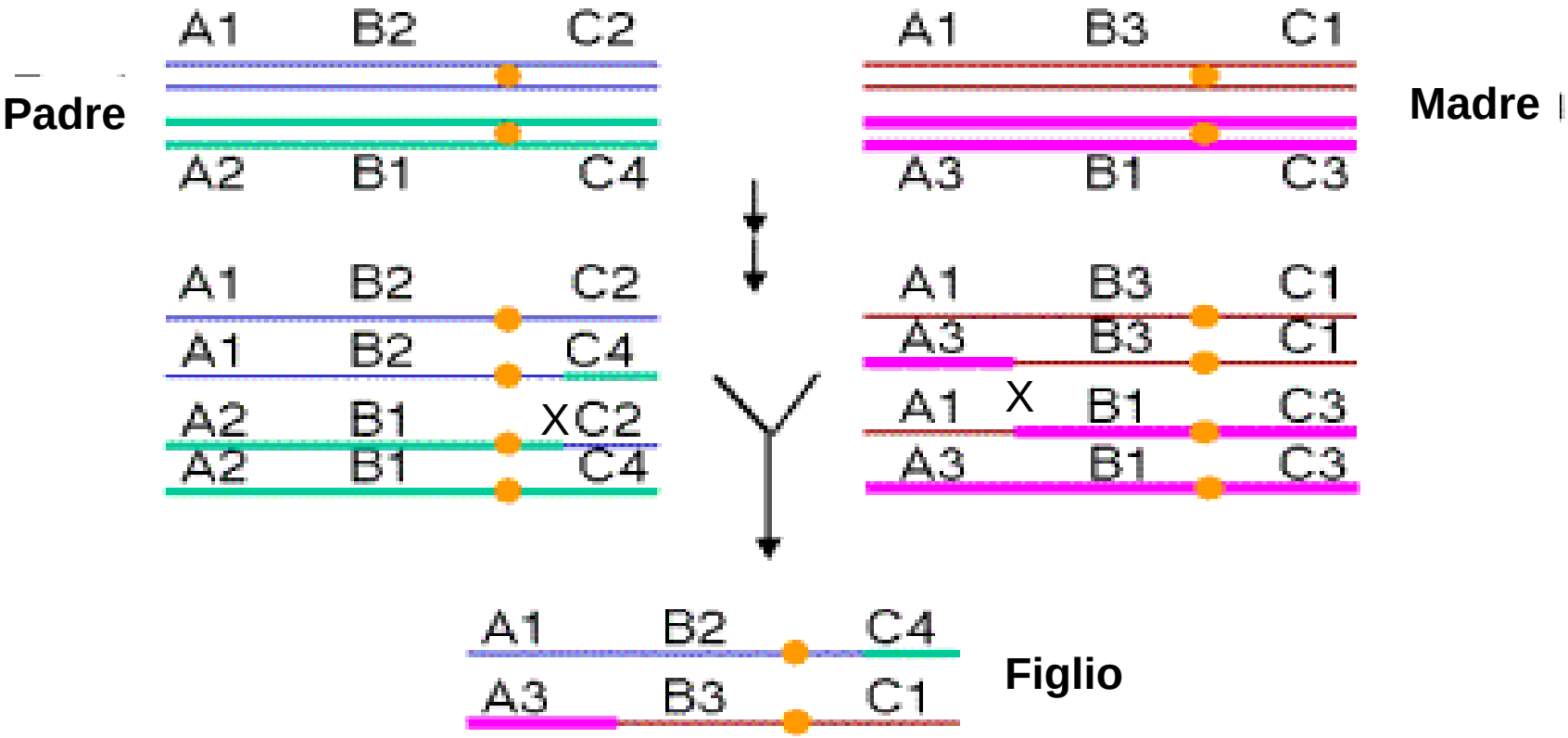
- Negli **eucarioti**, invece, la ricombinazione omologa è strettamente legata a:
  - **divisione cellulare:** assicura l'ordinata segregazione del DNA
  - **meccanismo di riparazione del DNA**.
  - Il fenomeno si **verifica** con maggiore frequenza **durante la meiosi**, processo durante il quale una cellula della linea germinale con due serie identiche di cromosomi (cellula diploide) dà origine a un insieme di gameti aploidi (spermatozoi o uova) aventi ciascuno un solo tipo di cromosoma per ogni coppia (cellule aploidi).

Appaiamento degli omologhi e ricombinazione durante il primo stadio della meiosi (meiosi I)

- **Zigotene:** cromosomi omologhi, ciascuno con i due cromatidi fratelli, si appaiano per formare i bivalenti (linea = DNA duplex).
- **Pachitene:** crossing-over tra cromosomi omologhi
- **Diplotene:** cromosomi omologhi si separano parzialmente, ma sono tenuti assieme ai crossing over
- **Anafase I**: i crossing over si **risolvono per permettere** ai **cromosomi la separarazione** in cellule separate



Recombinazione nel corso della meiosi genera nuove combinazioni di alleli nella progenie



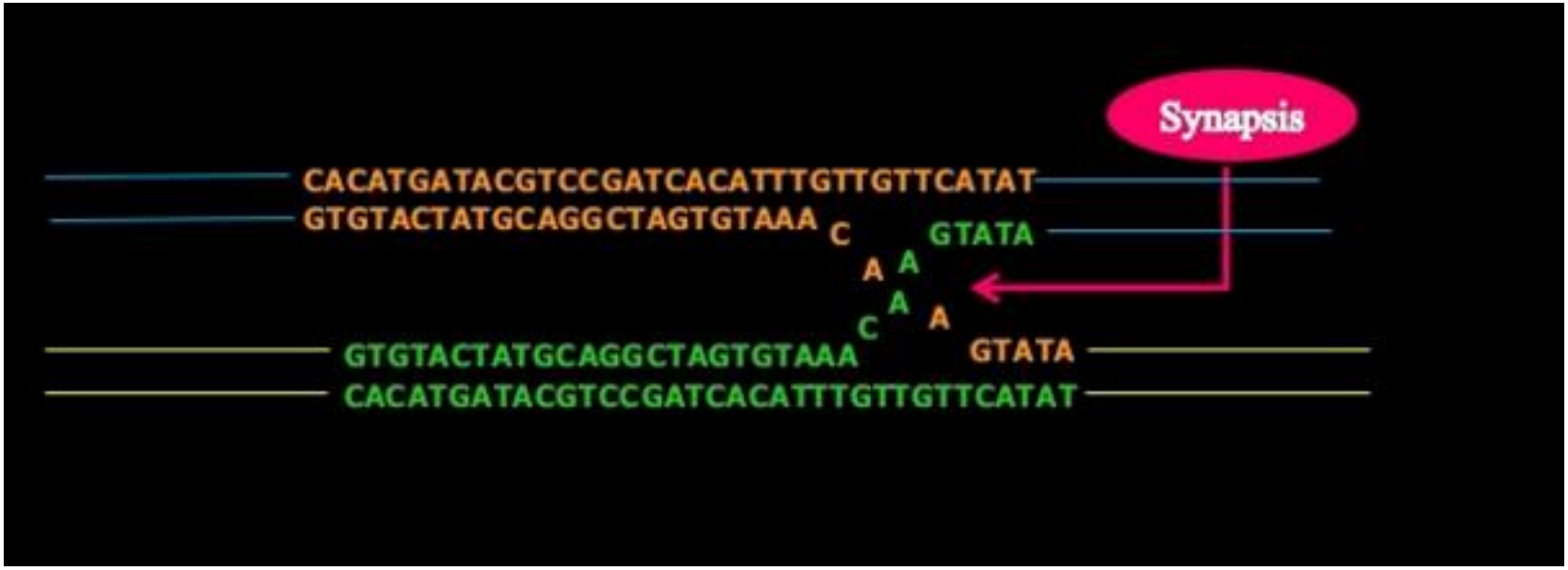
- **La frequenza di ricombinazione** in una regione che separa due punti di un cromosoma è **proporzionale alla distanza tra i due punti,**

Questo permette la determinazione della posizione relativa e della distanza tra differenti geni.

Ricombinazione omologa

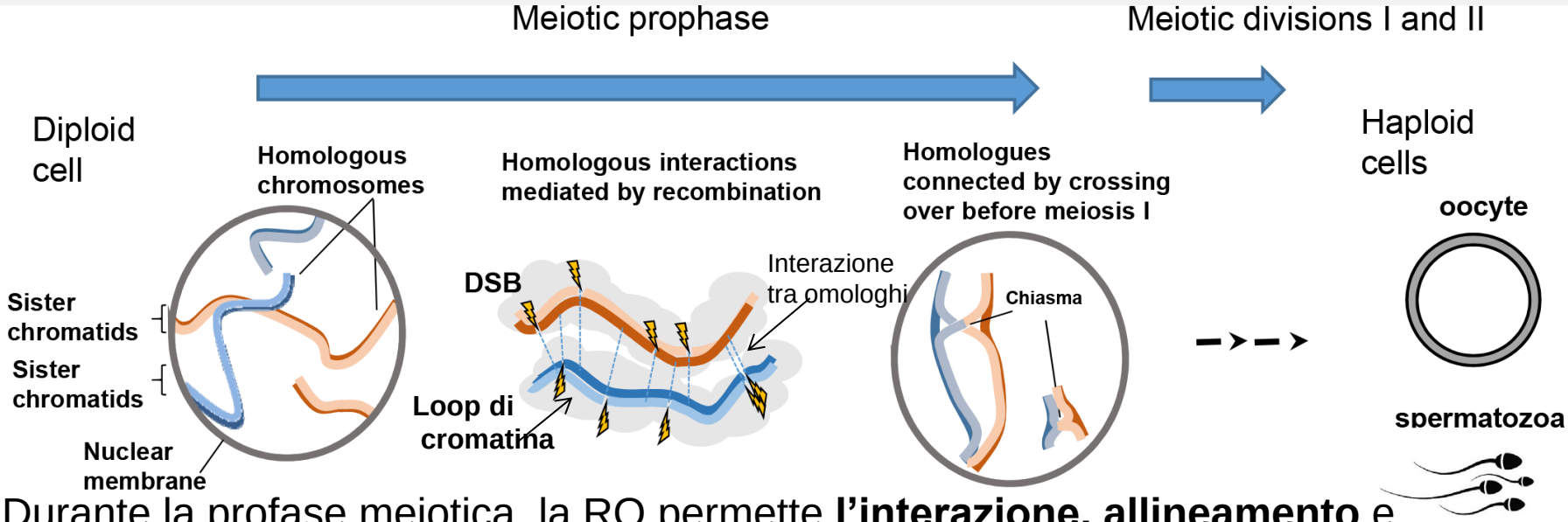


le sequenze devono essere le stesse o molto simili



Ruolo della ricombinazione omologa durante la profase della meiosi :

Grey et al.(2018) PLoS Genet 14(8): e1007479.



- Durante la profase meiotica, la RO permette **l'interazione, allineamento** e **connesione** attraverso i chiasmi dei cromosomi omologhi.
- I cromosomi sono strutturati da un asse proteico (line blu e rosse per i cromosomi pat. e mat., rispettivamente) a cui sono ancorati i loop di cromatina (nuvola grigia).
- La via di ricombinazione è iniziata dalla formazione di **diversi DSB** (freccie gialle) su ogni omologo**. I siti DSB sono determinati da PRDM9.**

La riparazione DSB promuove le interazioni tra omologhi (sottili linee tratt. blu).

- Un piccolo sottoinsieme di eventi di riparazione DSB, almeno uno per coppia di omologhi, porta ad un XO visualizzato come un chiasma che stabilisce una connessione topologica tra gli omologhi. Queste connessioni sono necessarie per una corretta segregazione cromosomica alla 1a divisione meiotica (meiosi I).

- Le due divisioni meiotiche portano alla formazione di ovociti e spermatozoi aploidi
- DSB, rottura del doppio filamento di DNA; **PRDM9, proteina 9 contenente dominio PR.**

La proteina PRDM9 (PR domain-containing protein 9)

- Espressa solo in ovociti e spermatozoi. Membro della famiglia di fattori di trascrizione PRDM

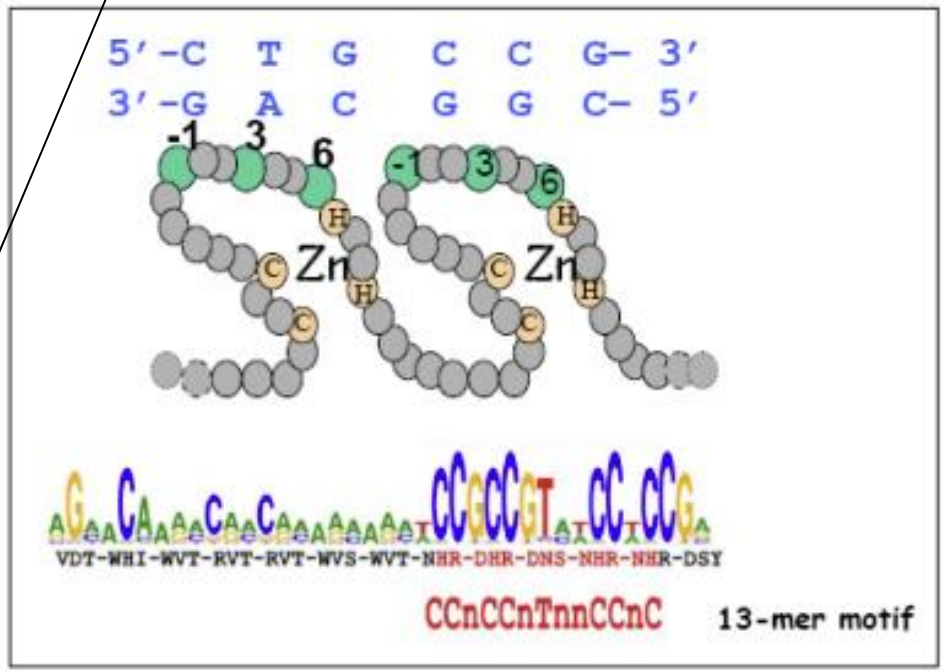


(A) **PRDM9 contiene diversi domini proteici noti**:

- KRAB,
- SSXRD,
- PR/SET e
- C2-H2 Zinc fingers.

- Il residuo G278 in
- PRDM9 del topo è essenziale per la sua attività di **metil-trasferase**

- La disposizione di zinc finger è parte di un esone singolo;



(B) In ogni **zinc finger, tre residui** (−1, 3 and 6) sono in contatto con il DNA (il residuo 2 gioca un ruolo minore ed è in contatto con il filamento opposto).

- La sequenza prevista che è riconosciuta da varianti maggiori della PRDM9 umana è mostrata in fig e si sovrappone con il motivo 13-mer.

Recombinazione tende a verificarsi a posizioni preferenziali nel genoma: hotspots di ricombinazione

- I crossover che portano alla ricombinazione hanno molte più probabilità di verificarsi in posizioni specifiche, **denominati punti caldi di ricombinazione.**
- Gli hotspot sono **regioni di DNA di circa 1-2kb di lunghezza**.
- Ad esempio, ci sono circa **30.000-50.000 hotspot all'interno del genoma umano** corrispondenti a **1/ 50-100kb di DNA** in media
- Questi hotspot si trovano **spesso negli spazi tra i geni.**
  - **differiscono notevolmente da uno all'altro nella probabilità** di una rottura a doppio filamento.
- Nell'uomo, il numero medio di eventi di ricombinazione crossover per hotspot **è 1 /1.300 meiosi,**
- l'hotspot più estremo ha una **frequenza di crossover di** 1 **ogni 110 meiosi.**
- Nel genoma umano, ad esempio, ci sono circa **30.000 hotspot di ricombinazione e circa 60 eventi crossover per meio**si---> eventi casuali
- Questi hotspot sono siti di legame per **PRDM9 (**PR domain-containing protein 9) Zinc Finger.
- Dopo il legame al DNA, **PRDM9** catalizza **la trimetilazione dell'istone 3 della lisina 4 e lisina 36.**

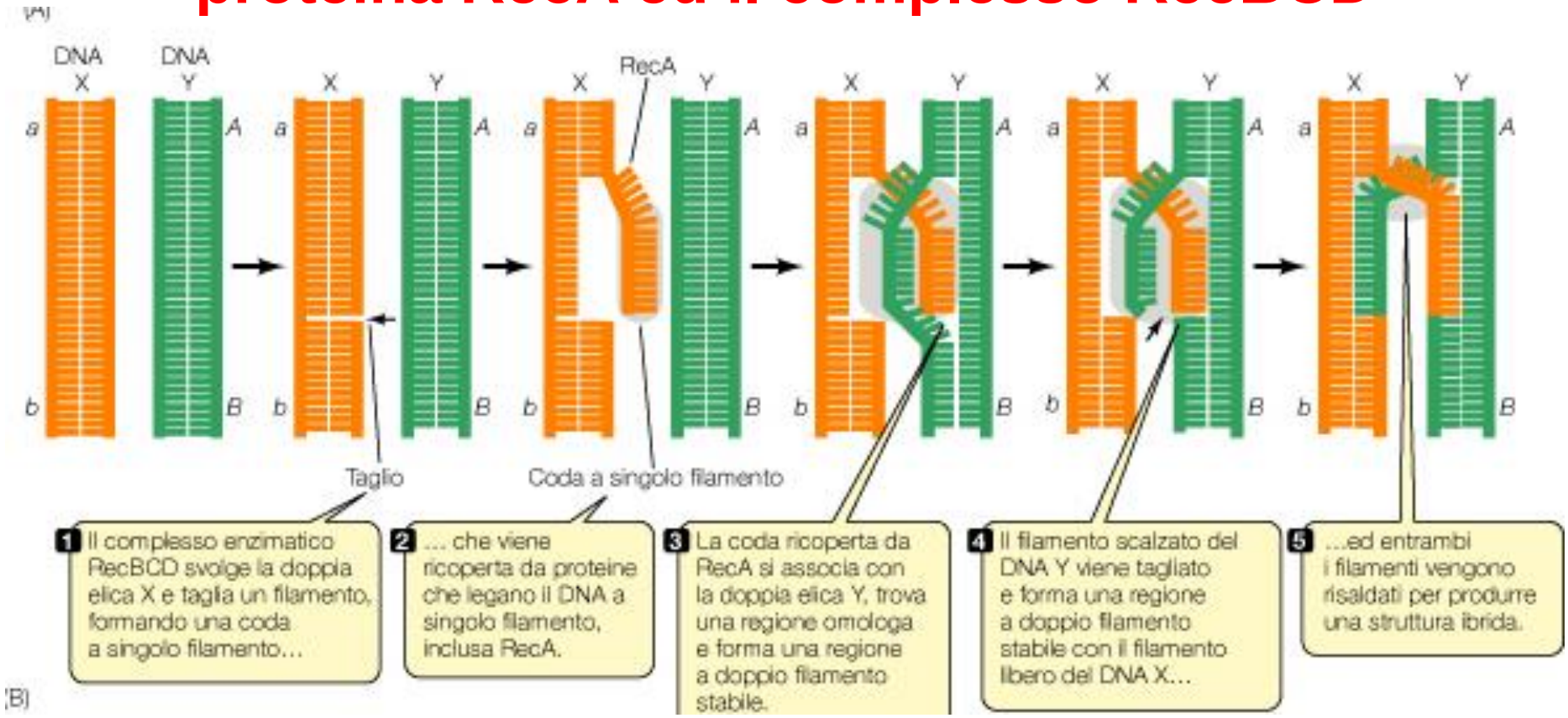
Recombinazione tende a verificarsi a posizioni preferenziali nel genoma: hotspots di ricombinazione (cont)

- Evidentemente, la **metilazione dell'istone H3,** da parte di PRDM9, **predispone il DNA a subire una rottura a doppio filamento**, ma i dettagli molecolari della formazione della rottura sono ancora sconosciuti.

- un gruppo di ricercatori ha trovato una serie di geni nel testicolo dei topi che sono espressi contemporaneamente al gene per PRDM9.

- È stato dimostrato che **una proteina chiamata ZCWPW1 è riscontrabile** negli stessi siti di PRDM9, ed è **responsabile** del suo **trasporto in quella localizzazione**.
- **ZCWPW1** sembra collegare
  - la selezione della posizione da parte di PRDM9
  - ai meccanismi di riparazione del DNA necessari per lo scambio genico tra i cromosomi

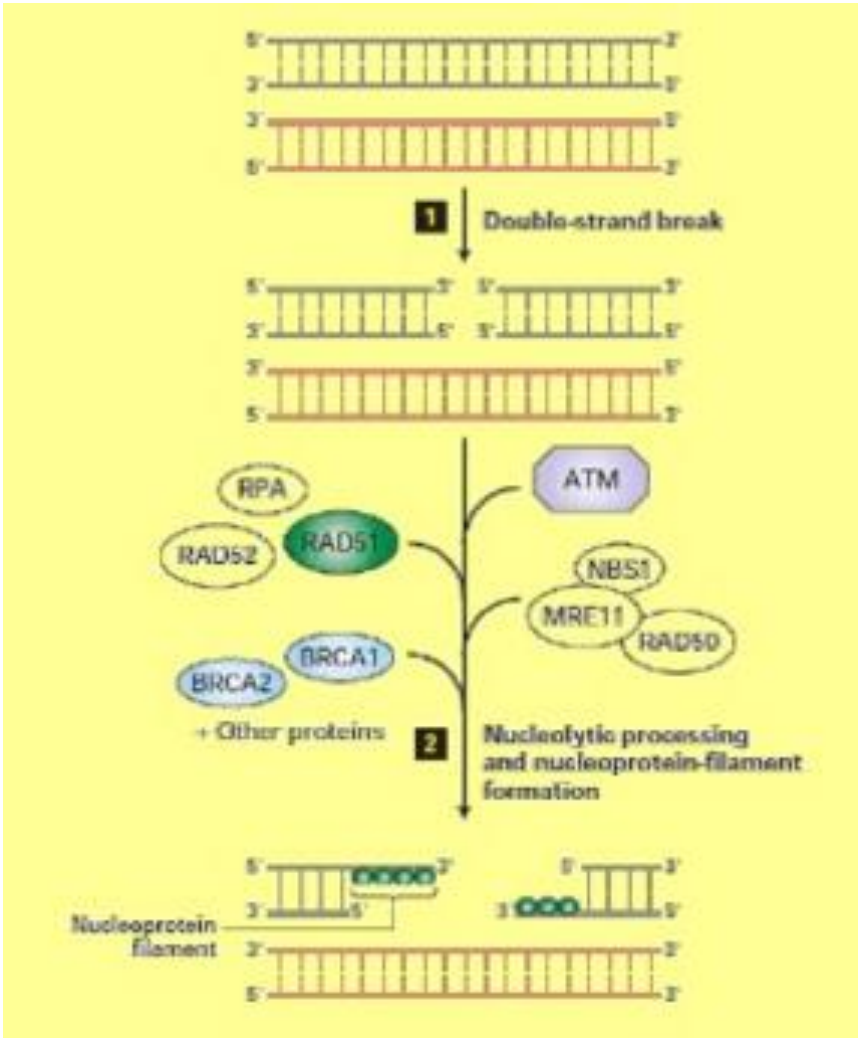
La ricombinazione omologa necessita la proteina RecA ed il complesso RecBCD



- **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

Inizio della ricombinazione omologa a livello molecolare: Eucarioti

- **Topoisomerase SPO11:** un **enzima che introduce rotture asimmetriche** nel filamento di DNA



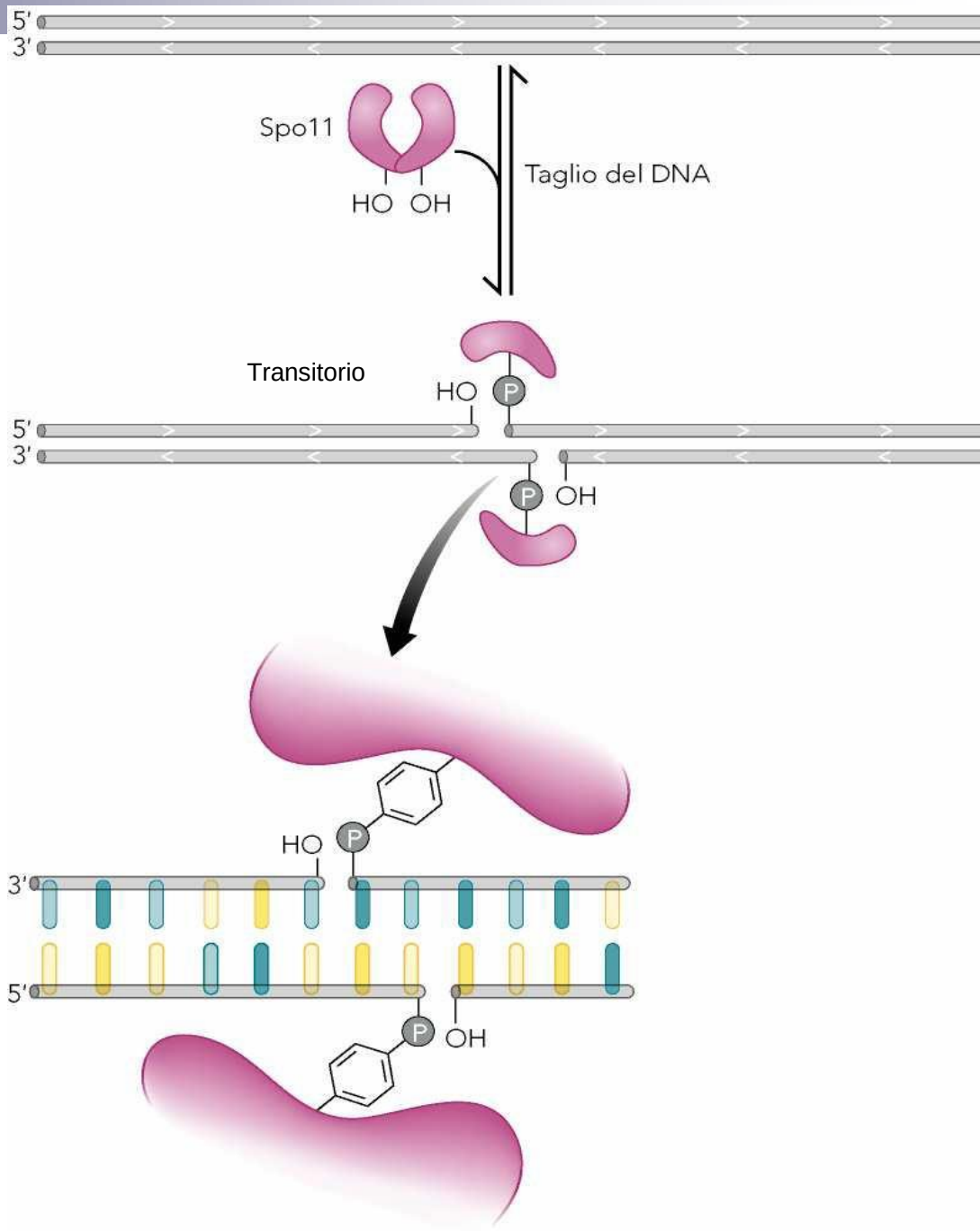
- **Spo11:** attività catalitica per formazione di rotture a doppio filamento
- Formazione di DSB richiede proteine addizionali non ancora caratterizzate

Bernard de Massy *Annu. Rev. Genet.* 2013. 47:563–99

Il meccanismo di taglio di Spo11

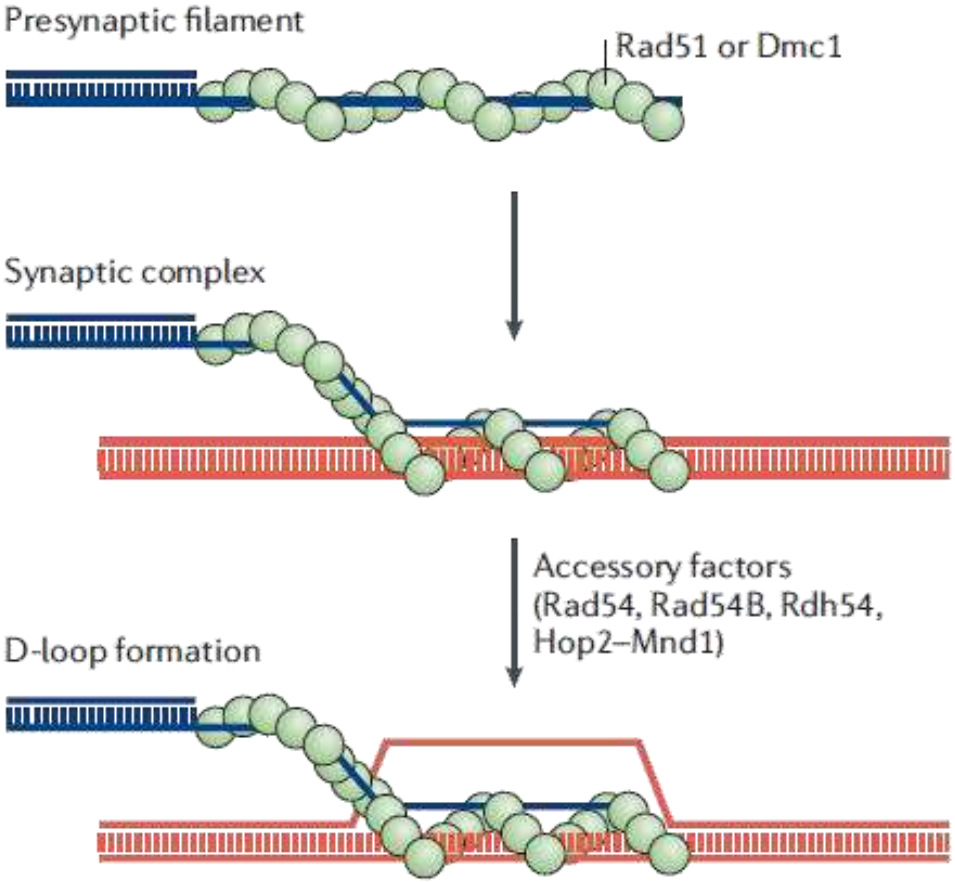
- Il **gruppo OH di una tirosina della proteina Spo11 attacca il DNA**
- Si forma un legarne covalente tra la proteina e l'acido nucleico.
- Sono **necessarie due subunità di Spo11 per generare** una rottura a doppio filamento sul DNA e ognuna di queste attacca uno dei due filamenti.

- Si noti che, grazie a questo meccanismo di taglio, la rottura a doppio filamento **può essere richiusa semplicemente invertendo la reazione.**



Cont..

- Isolando mutanti difettivi nella ricombinazione si è identificata **la proteina RecA**
- **RecA si lega al DNA a ss, in presenza di ATP 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 H) un'altra molecola di DNA ds promuovendo l'appaiamento dei nucleotidi nel ssDNA con le basi nel filamento complementare di ds DNA.

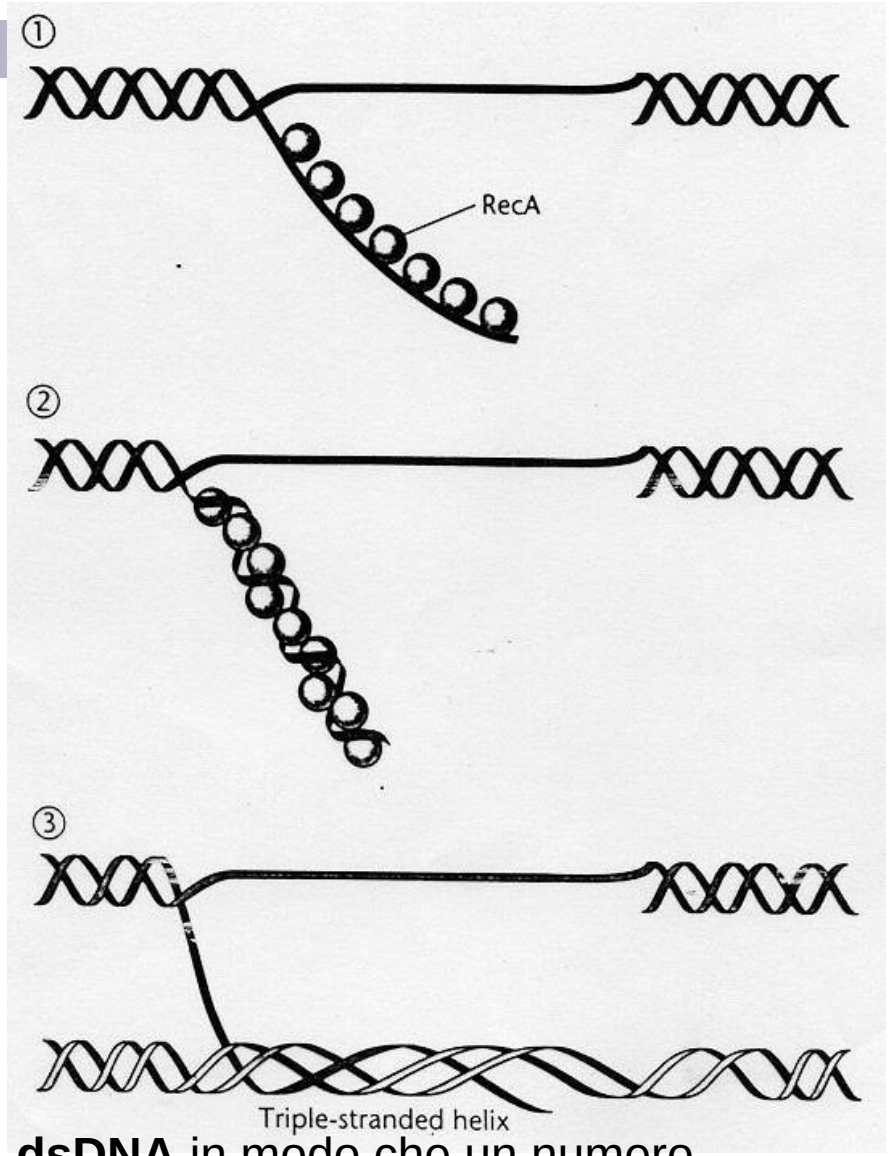


- Recombinasi come **RecA/ Rad51/ Dmc**1 si legano al DNAss
- Fattori accessori come Rad54, Rad54B, e Rdh54 aiutano il riconoscimento e l'invasione della regione omologa

- **RecA s**i lega al DNA al filamento singolo

- formando un complesso RecA-DNAss 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 (Single Strand Binding 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 X** volte
- RecA ha omologhi in tutte le specie batteriche
- RecA necessita DNAss per iniziare il processo di appaiamento

- **Chi crea molecole di DNAss?**

❑ Per questo è necessario il **complesso costituito dalle proteine RecB - RecC - RecD**

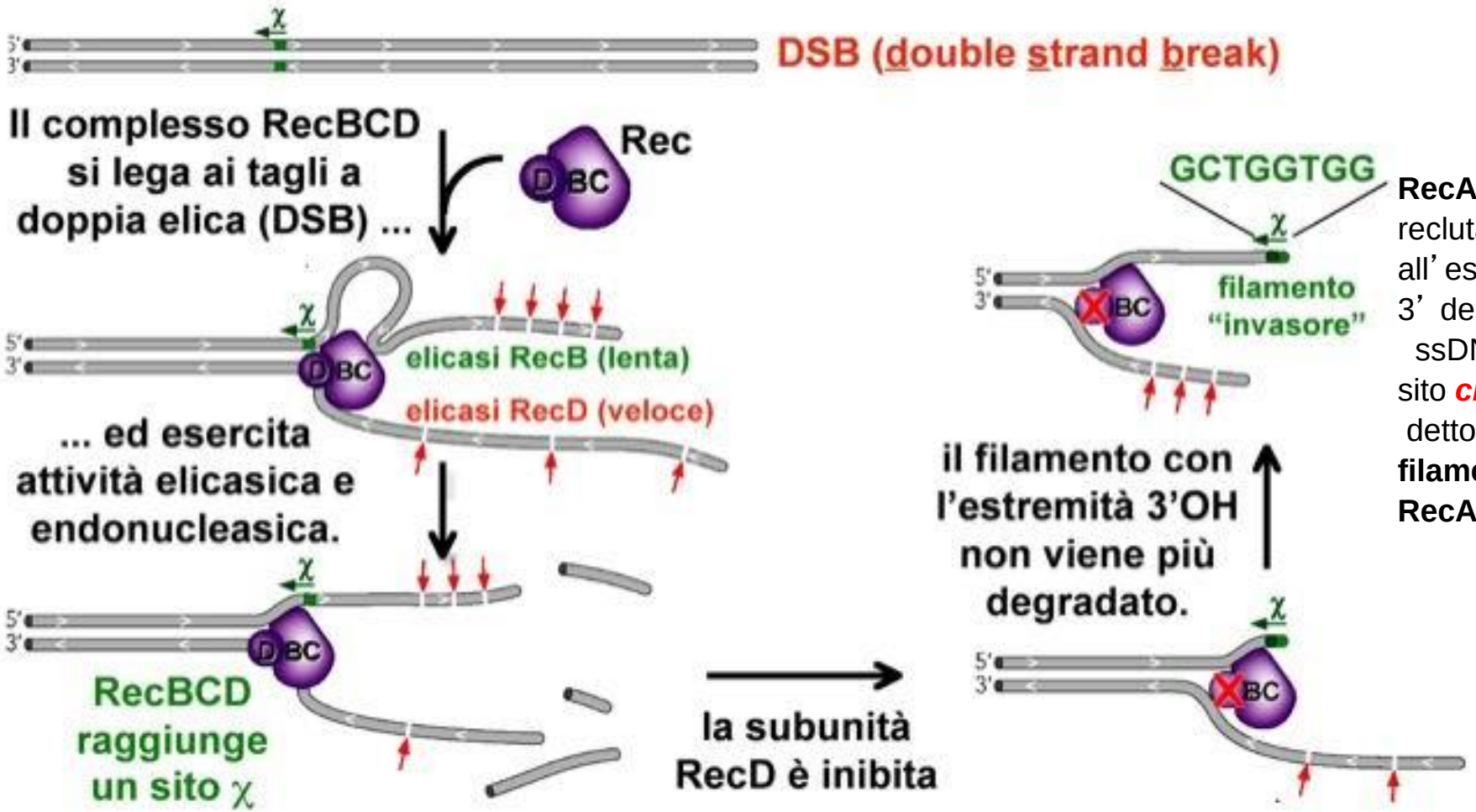
➢ **Il Complesso RecBCD è un complesso multifunzionale dotato di**

- attività nucleasica su DNA ss e ds

- attività elicasica

- attività ATPasica (idrolizza ATP)

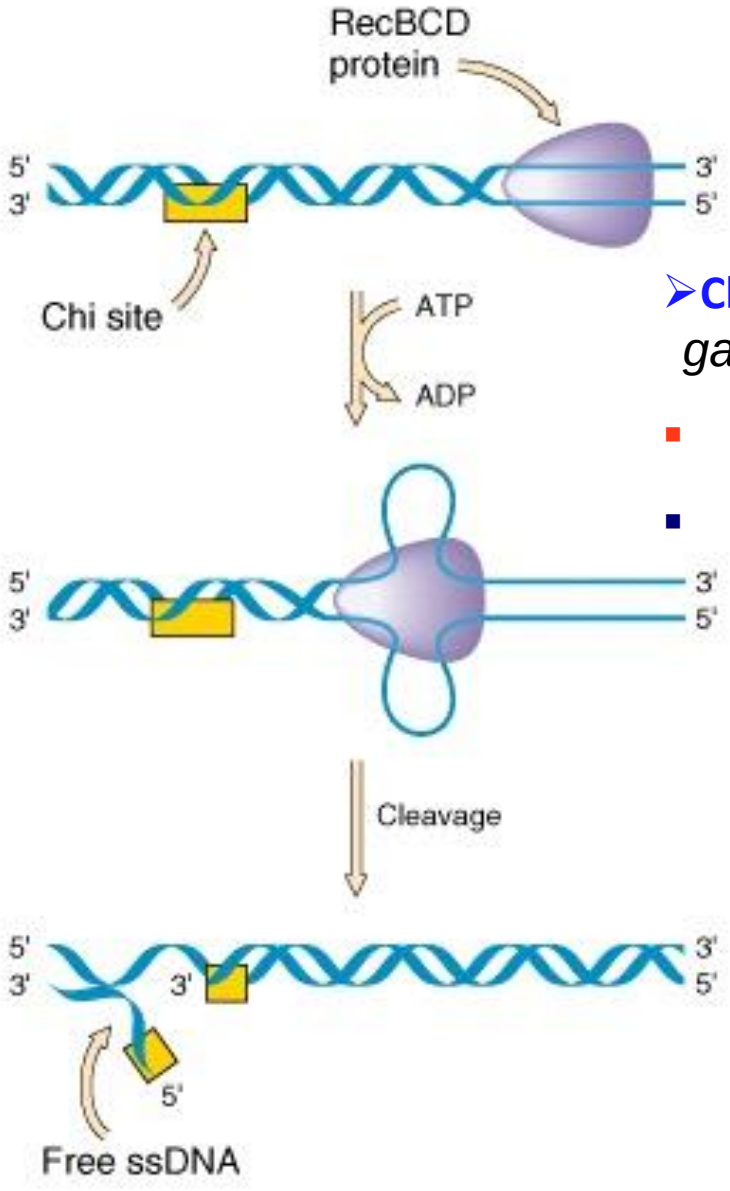
Il complesso RecBCD genera il filamento "invasore"



RecA e' reclutata all'estremita' 3' del ssDNA (con sito ***chi***), detto **filamento RecA**

RecBCD prepara il DNA per la ricombinazione.

Produzione di un singolo filamento di DNA



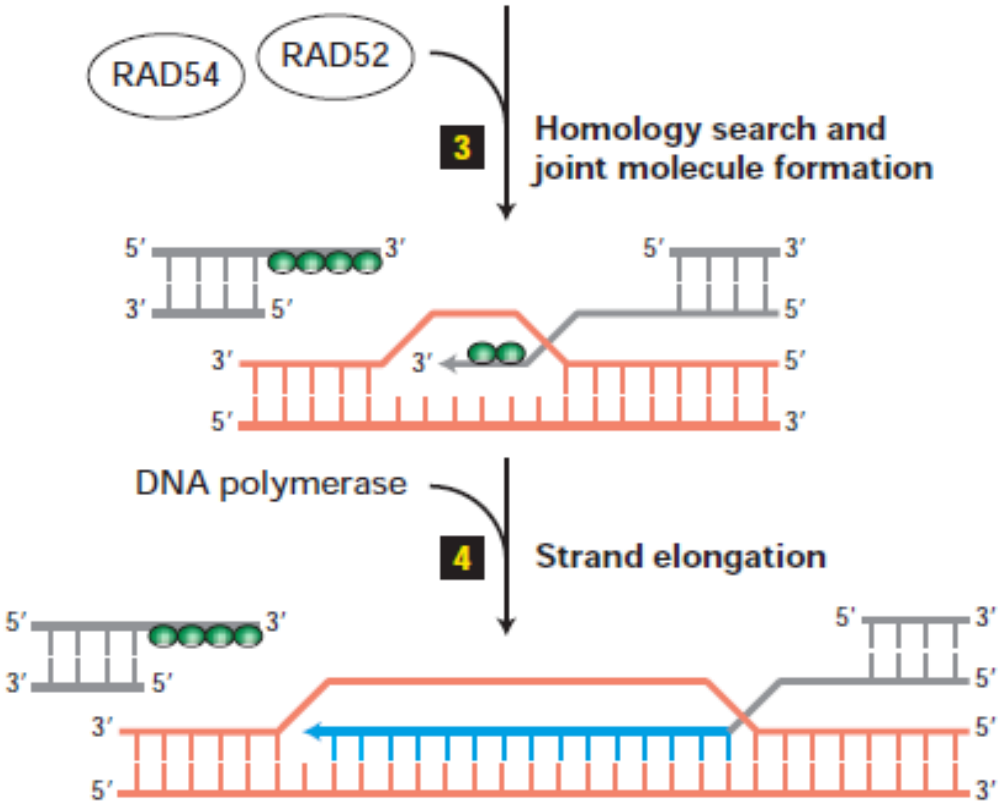
- **RecBCD protein complex have both**
  - **nuclease (nicking)**
  - **helicase activity (unwinding)**

- **Chi site** = siti *chi* (**C***rossing over* ***h****otspot* *insti-gato*r) aumentano la frequenza di RO, ~x10 **;**
  - **5'- G C TG G T G G -3'**
  - **target site for nuclease activity of RecBCD**

- *E. coli* possesses a high number of χ
- sequences

- In *E.coli* chromosome is present a χ approx. every **5 kb**

Cont..



- After the formation of D-loop,
- **DNA polymerase involved to elongate the 3' invading single strand**

Bernard de Massy *Annu. Rev. Genet.* 2013. 47:563–99

Key steps of HR



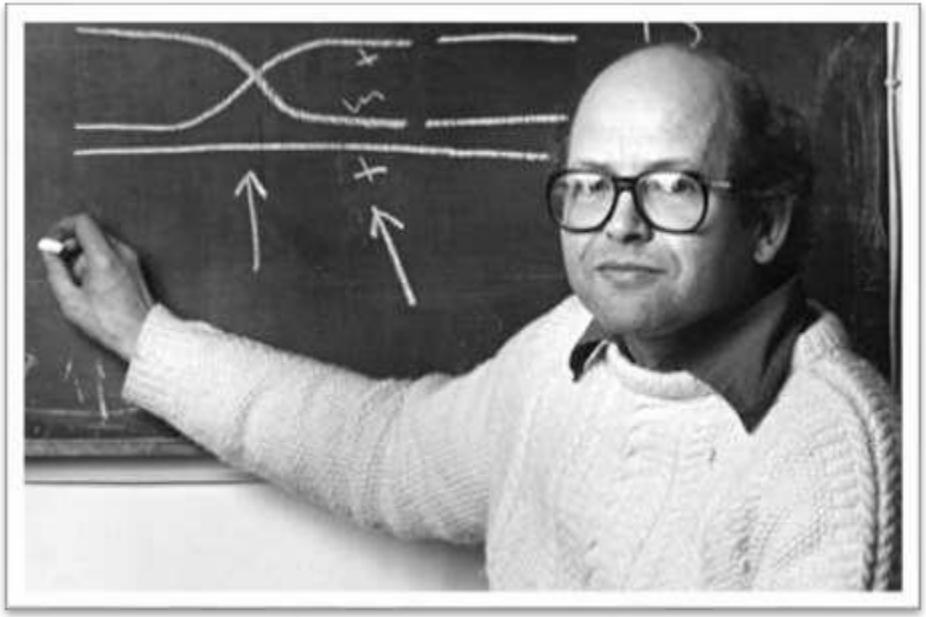
1. Alignment of **two homologous DNA** molecules
2. Introduction of **breaks** in the DNA
3. Formation of initial short regions of **base pairing** between the two recombining DNA molecules.
4. **Strand invasion**.
5. Formation of Holliday junction & Cleavage of the **Holliday junction**

Two Models For Homologous Recombination

1. **The Holliday Model**

2. **The Double-Strand Break Repair Model**

(More accurately describes recombination processes)



1. Holliday Model of Recombination

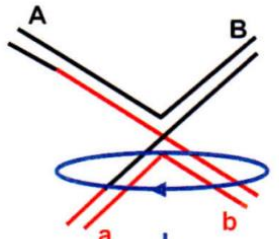
1. Appaiamento

2. Rottura di un elemento per ciascuna doppia elica

3. Scambio

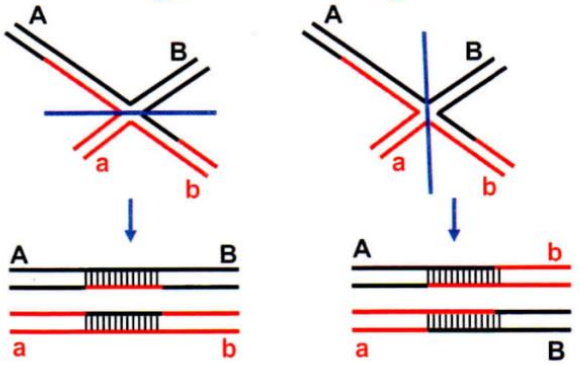
4. Riattacco

5. Scivolamento (terminalizzazione)



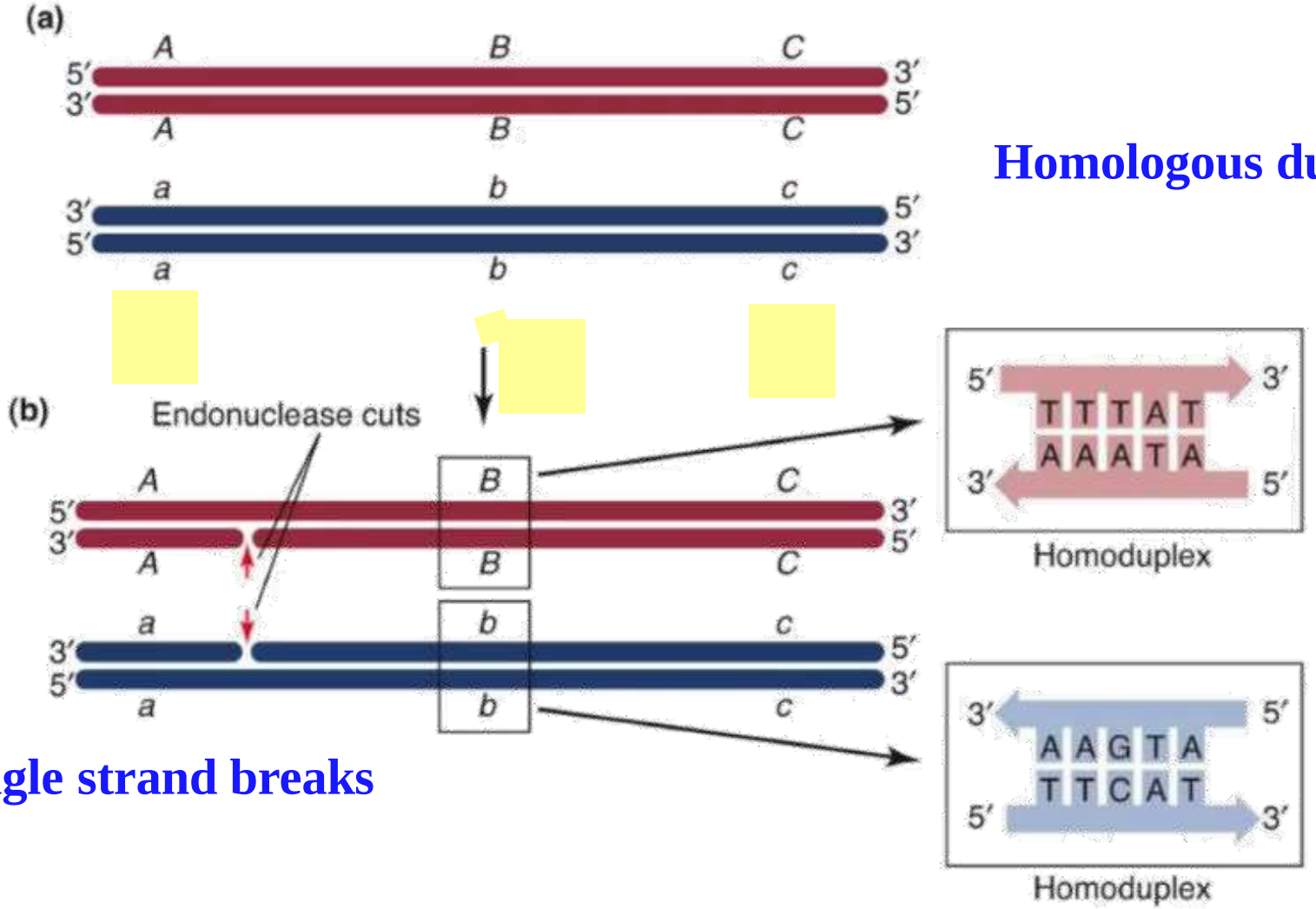
6. Isomerizzazione

7. Taglio orizzontale o verticale



8. Filamenti risultanti con heteroduplex

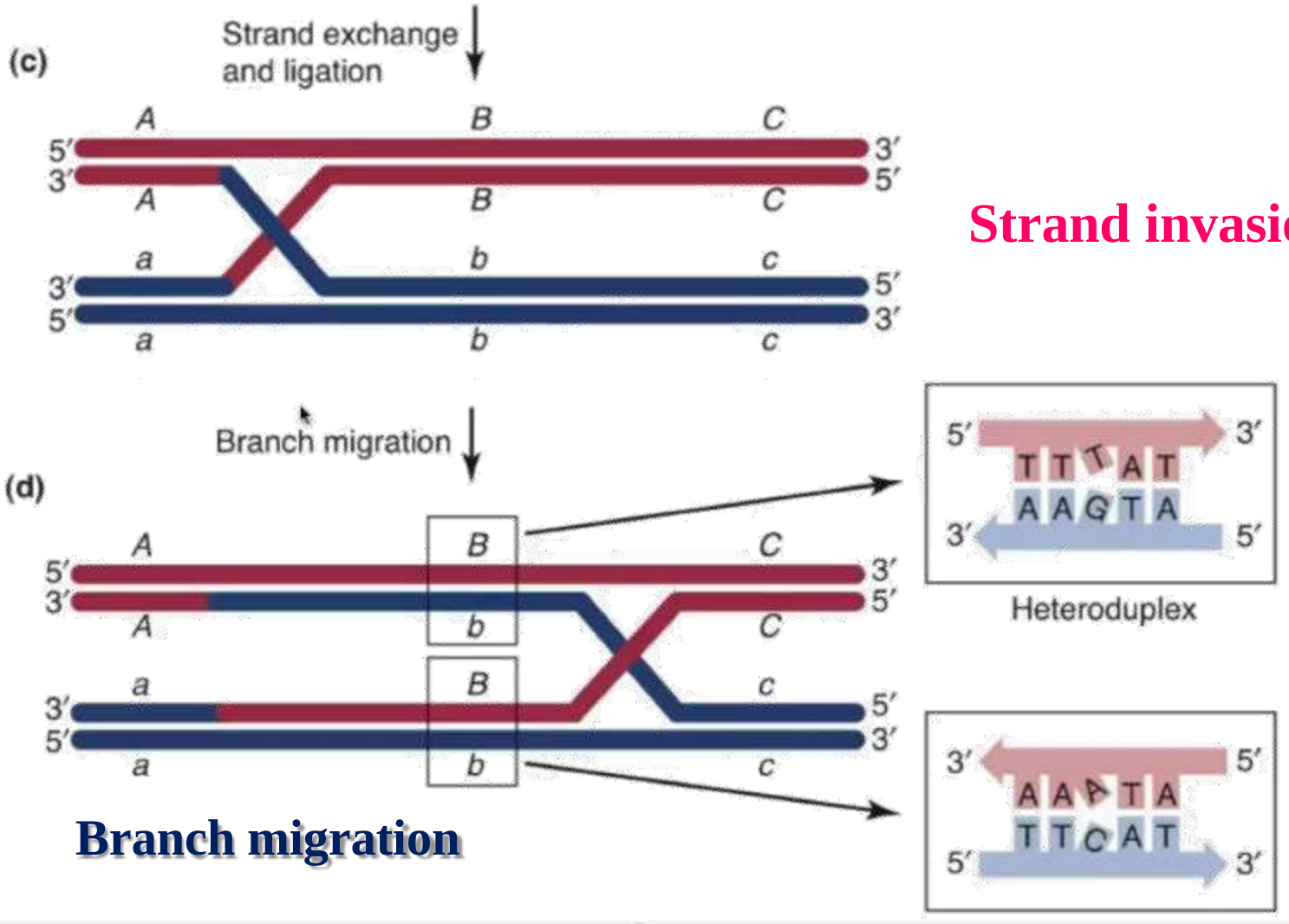
1. The Holliday Model



Homologous duplex

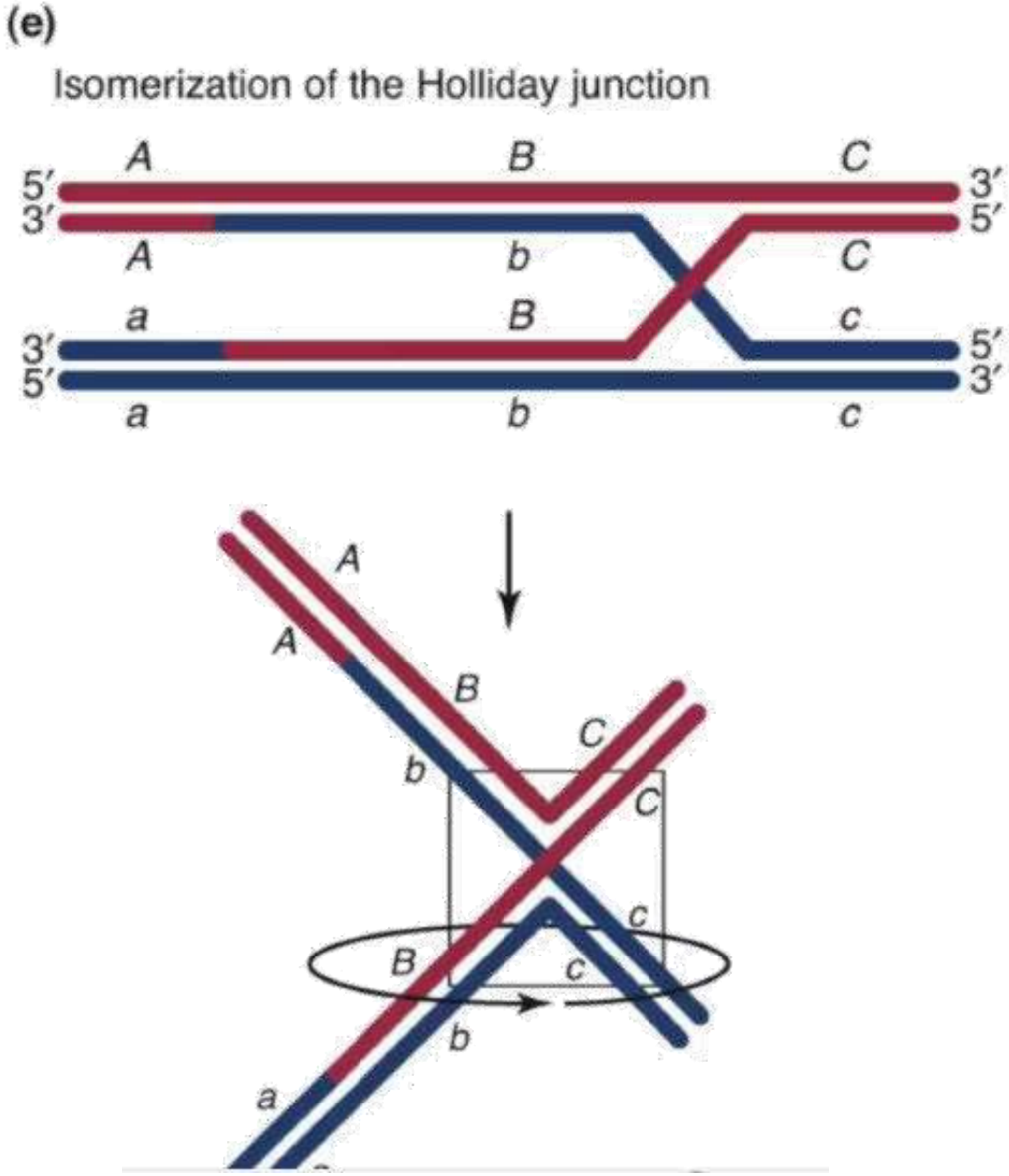
Single strand breaks

Cont..

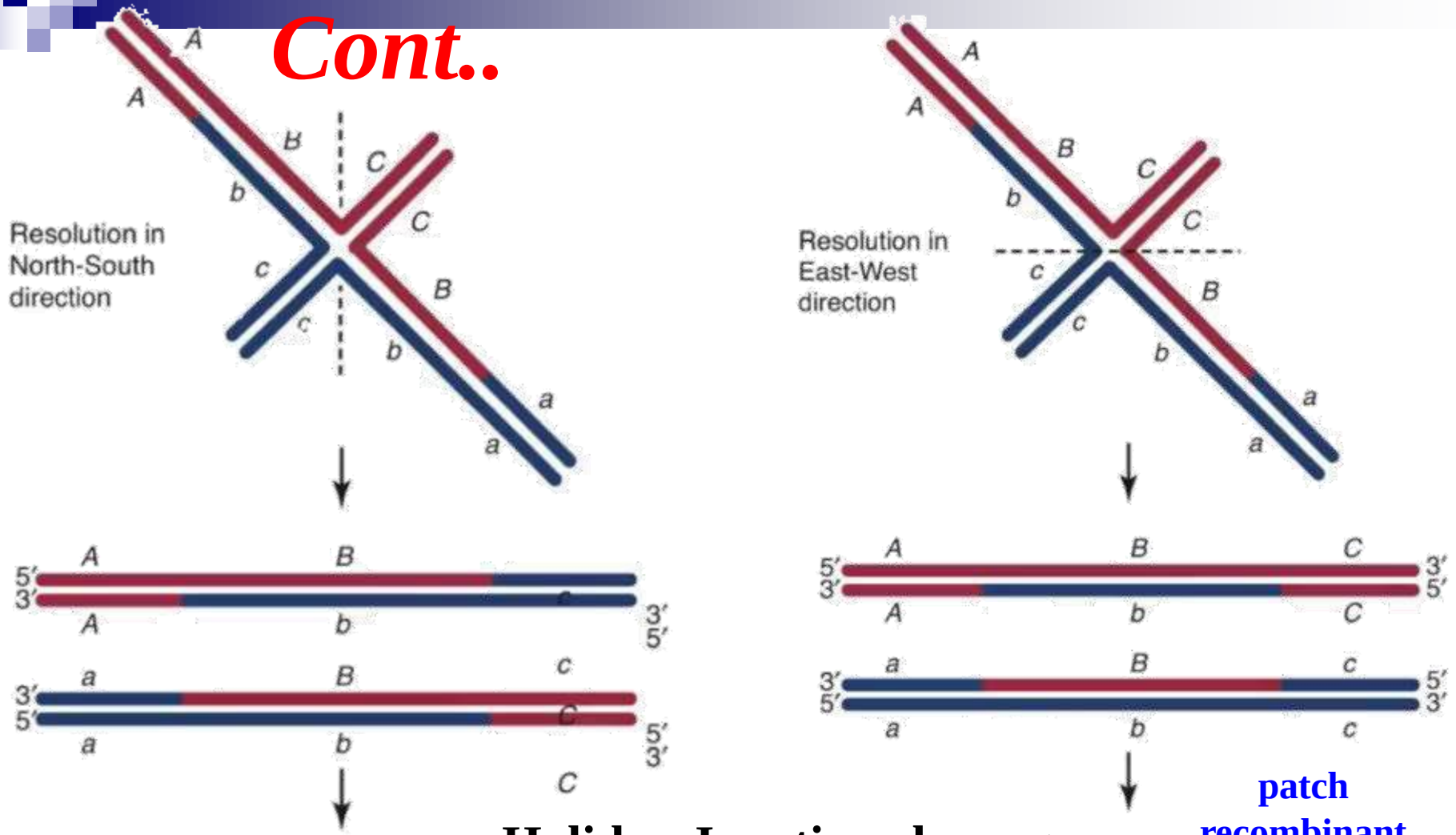

(c)
Strand exchange and ligation
A
B
C
5′
3′
3′
5′
A
B
C
a
b
c
3′
5′
5′
3′
a
b
c
Strand invasion
Branch migration
(d)
A
B
C
5′
3′
3′
5′
A
b
C
a
B
c
3′
5′
5′
3′
a
b
c
5′
3′
T T T A T
A A G T A
3′
5′
Heteroduplex
3′
5′
A A A T A
T T C A T
5′
3′
Branch migration

Cont..

Holiday Junction



Cont..



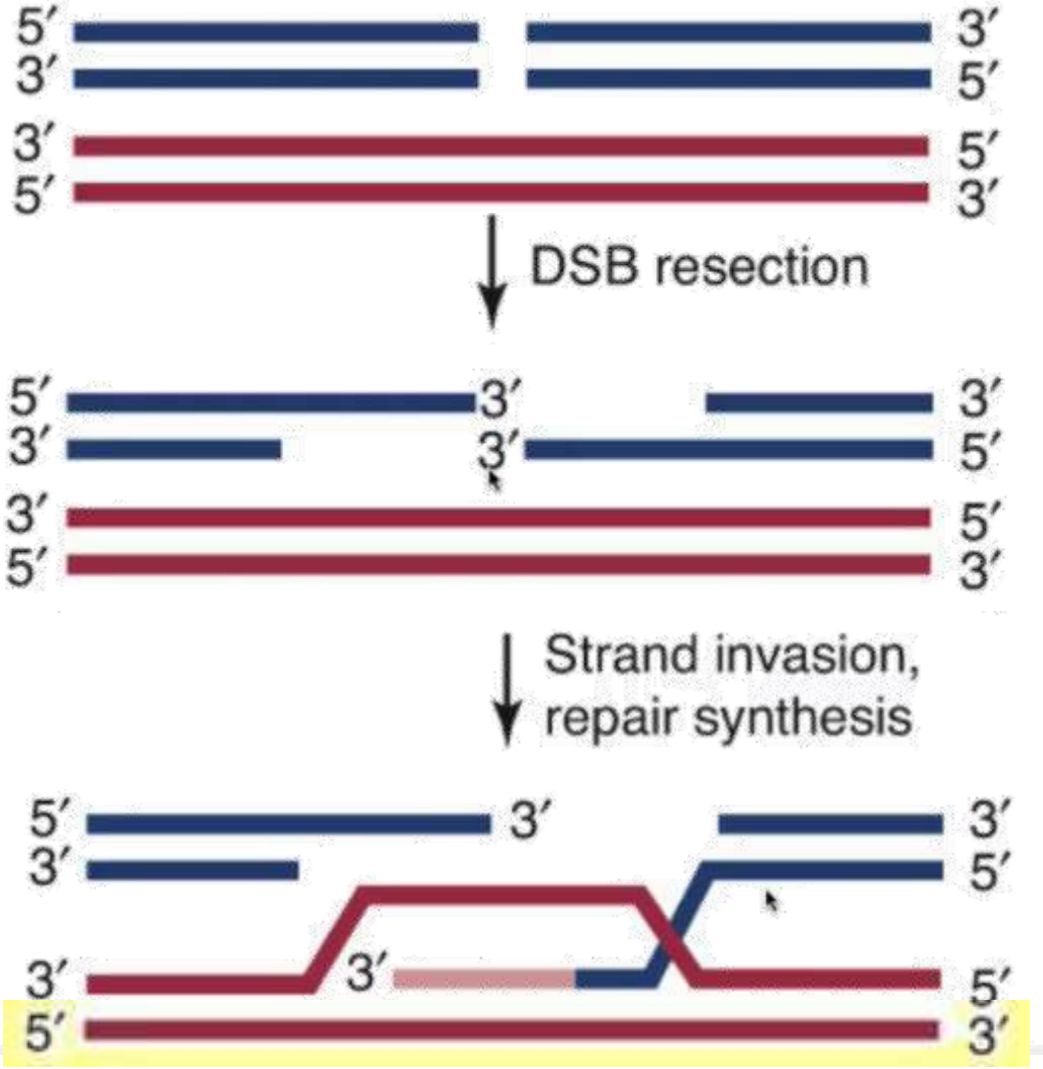
splice recombinant

Holiday Junction cleavage

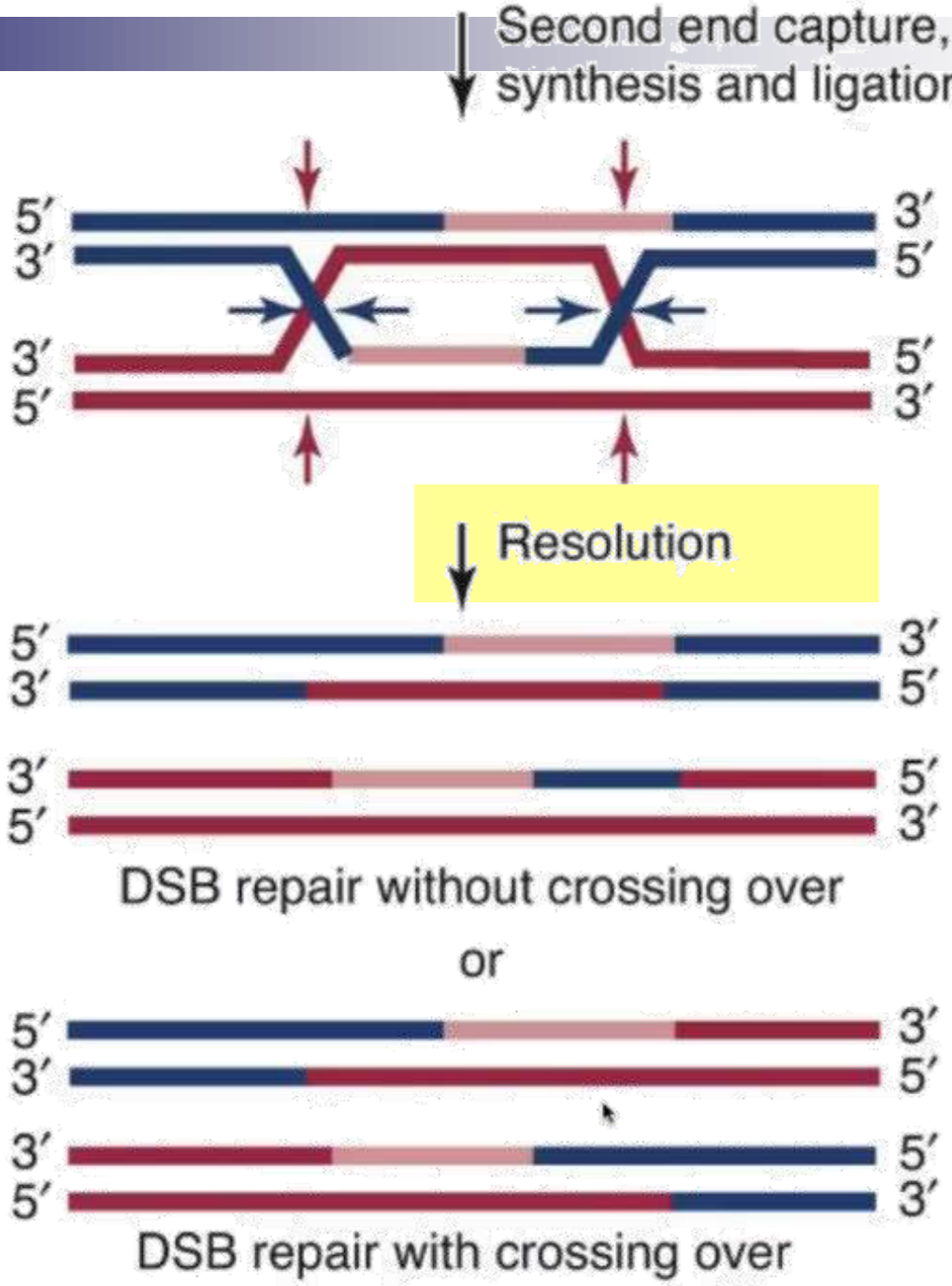
patch recombinant

Resolution

2. The Double-Strand Break Repair Model



Cont..


Second end capture,
synthesis and ligation
5′
3′
3′
5′
3′
5′
5′
3′
3′
5′
Resolution
5′
3′
3′
5′
3′
5′
5′
3′
DSB repair without crossing over
or
5′
3′
3′
5′
3′
5′
5′
3′
DSB repair with crossing over

Modello di riparazione dei DSB attraverso ricombina-zione omologa

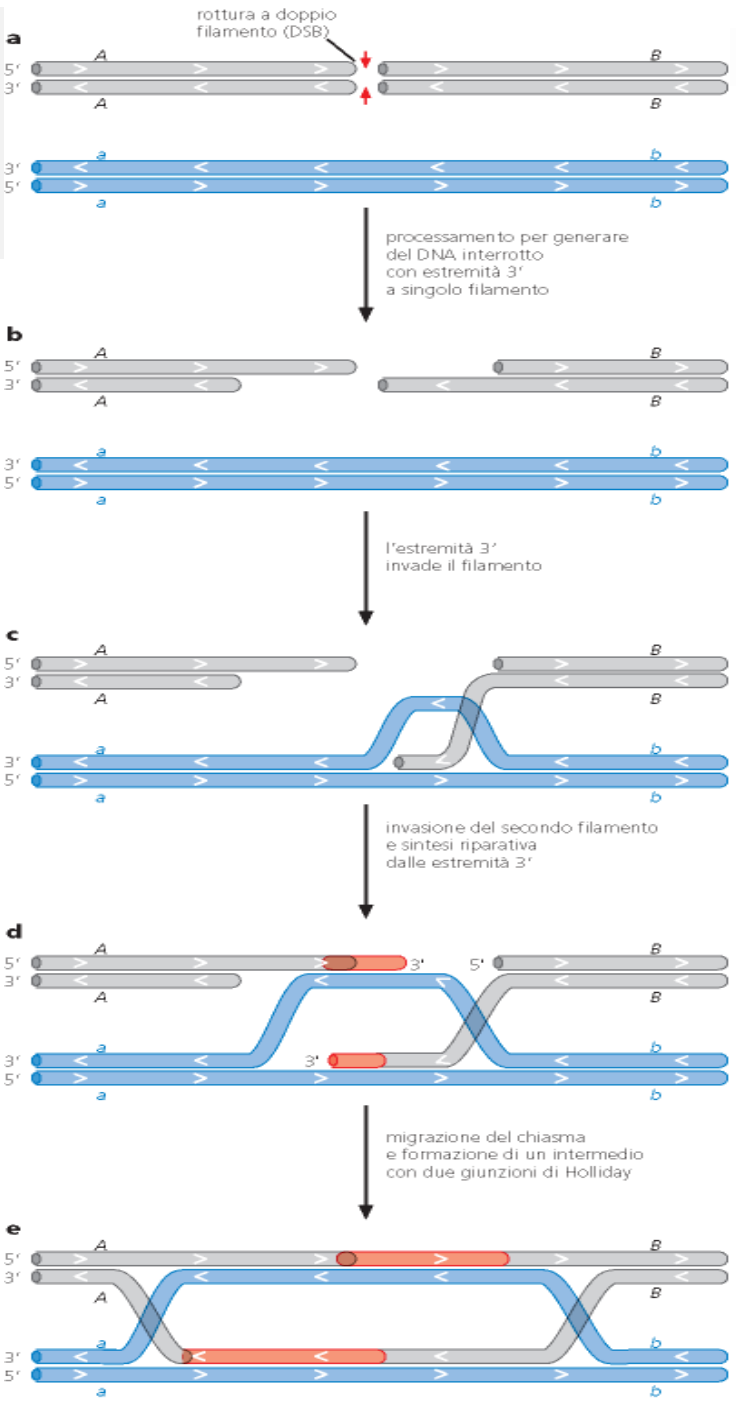
Lo scambio genetico solitamente inizia con un taglio del double strand (double strand break, DSB)).

Il DNA ricevente si taglia. Esonucleasi agiscono e liberano un 3'. Questo invade il DNA omologo e si estende. Si forma un D-loop.

Il D loop si estende e si appaia al DNA ricevente, e viene ricopiato.

Ci sono due regioni unite.

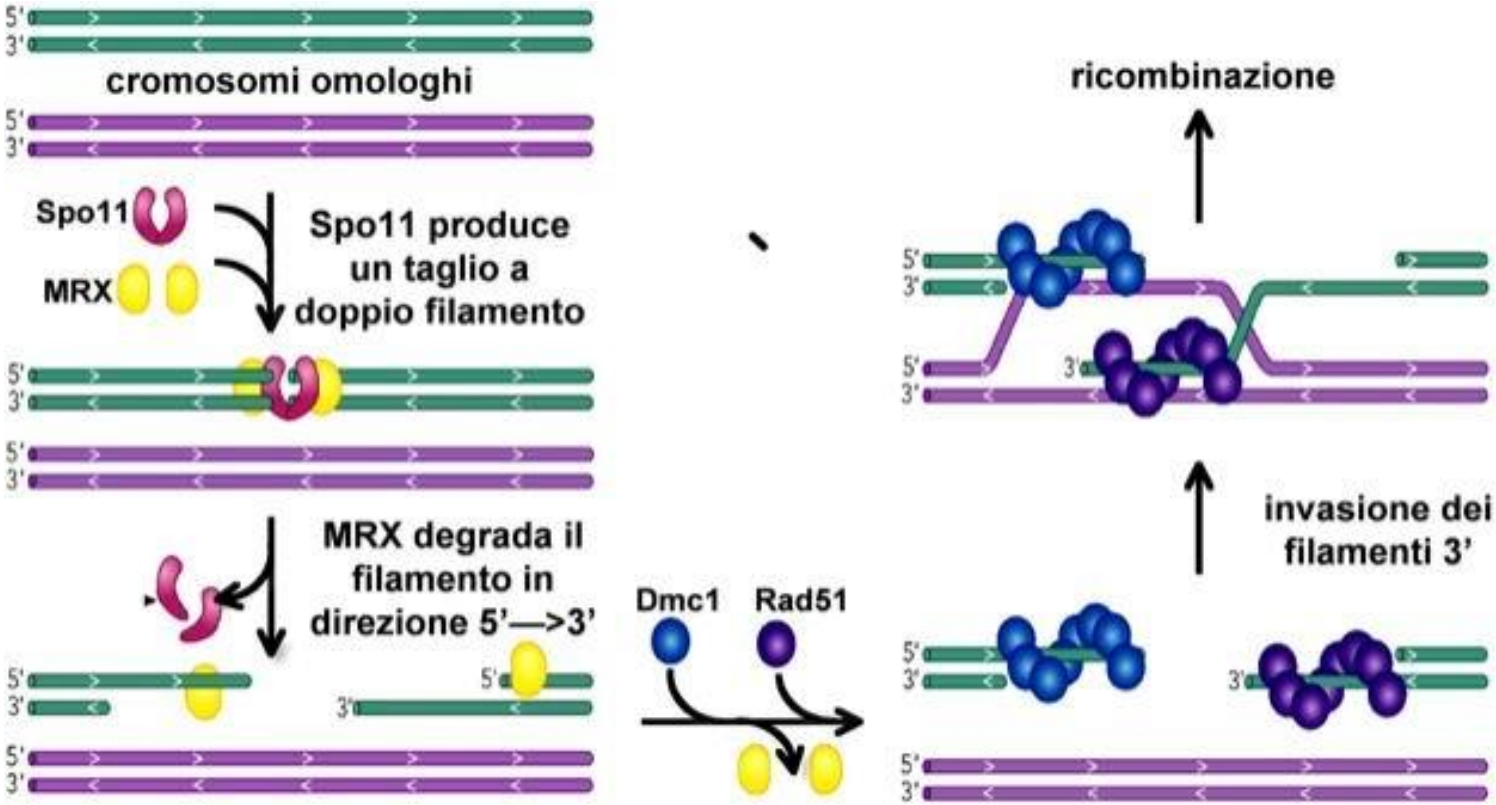
Il **DNA del donatore ha sostituito quello dell'accettore.**



Enzimi che catalizzano i passaggi chiave della ricombinazione

Passaggio ricombinativo	Enzimi di *E.coli*	Enzimi eucariotici
Processamento della rottura a doppio filamento	RecBCD (elicasi / nucleasi)	Rad50/58/60 (MRX)
Assemblaggio delle proteine per lo scambio dei filamenti	RecBCD e RecFOR	Rad52 e Rad 59
Appaiamento delle molecole omologhe e lo scambio dei filamenti (ricombinazione)	RecA	Rad51, Dmc1 (in meiosi)
Riconoscimento della giunz. di Holliday. e migrazione del chiasma	RuvA, RuvB	ignota
Risoluzione delle giunz. di Holliday.	RuvC	ignota
Introduzione delle rotture a doppio filamento	ignota	Spo11

Proteine di ricombinazione nella meiosi eucarioti



SPO11 introduce nel DNA delle rotture a doppio filamento, taglia in molti punti sul cromosoma, con poca selettività di sequenza MA… grande specificità temporale

MRX: complesso proteine di Mre11, Rad50, e Xrs2 →**complesso di riparazione DNA**

Dmc1 (*disrupted meiotic cDNA)***:** ruolo centrale in RO in meiosi→assembla i siti delle rotture ds programmate e cerca la sequenza allelica sui cromatidi omologhi

Rad51, membro della famiglia di proteine RAD51 omologo a RecA batterica: assiste riparo della rottura DNA ds

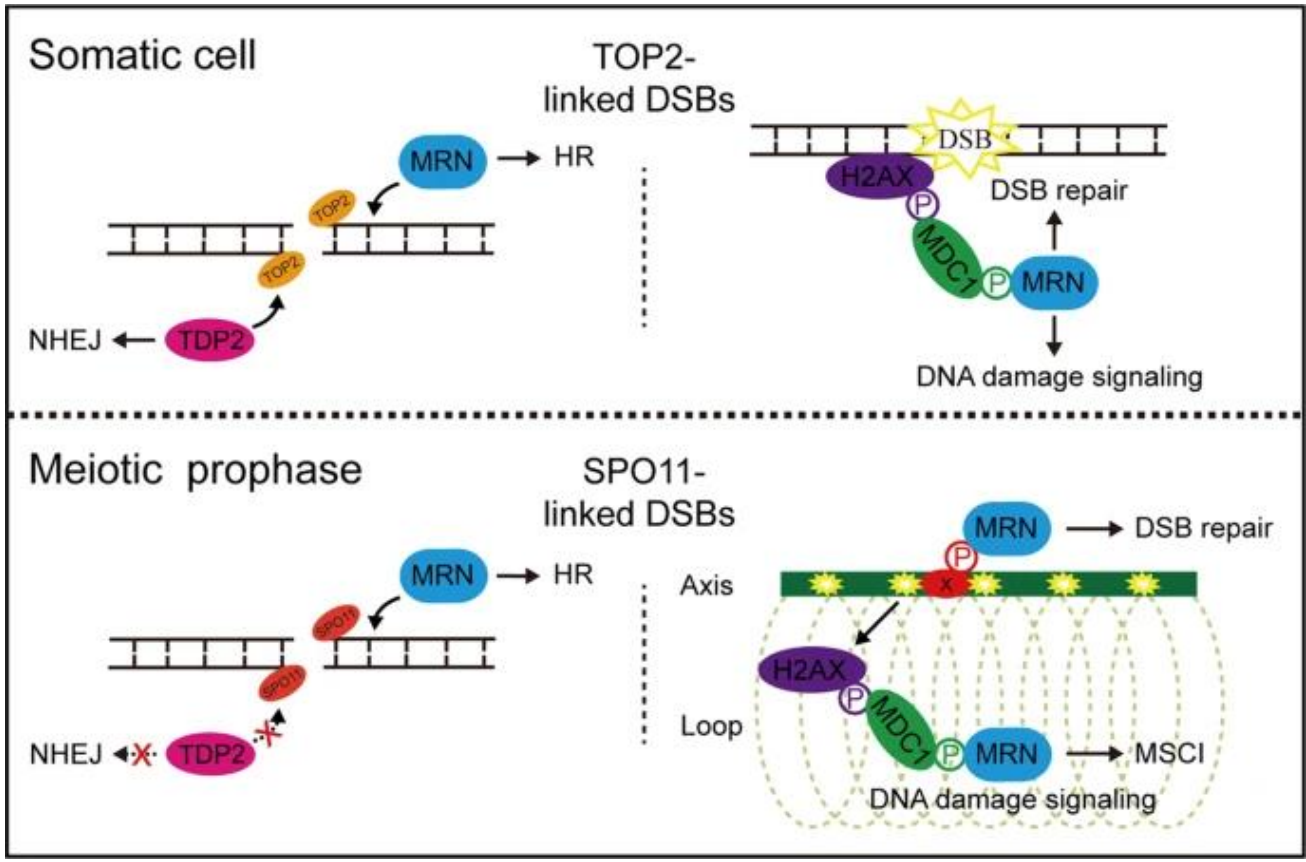
Working model: functions of MRN complex in protein-linked DSB repair in somatic cells and meiotic prophase.

Zhang, et al. 2020. Cell Death Differ 27, 2176

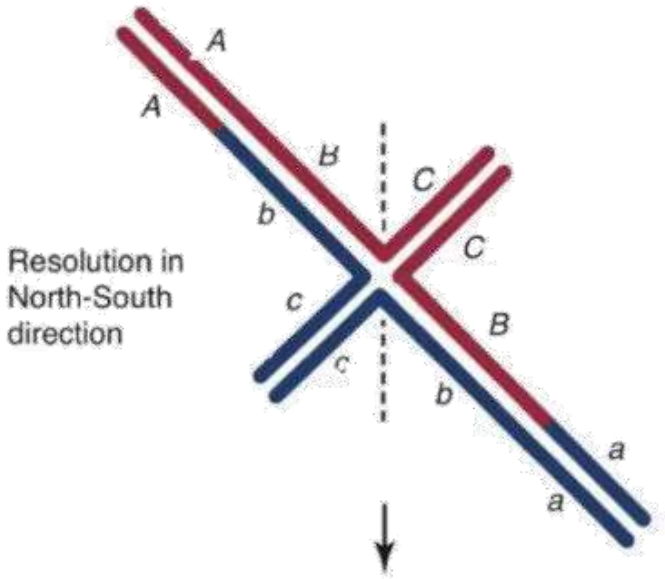
In somatic cells, TDP2-dependent NHEJ pathway and MRN complex-dependent HR pathway function in parallel to repair TOP2-linked DSBs.

- MRN complex is
- recruited to DSB sites

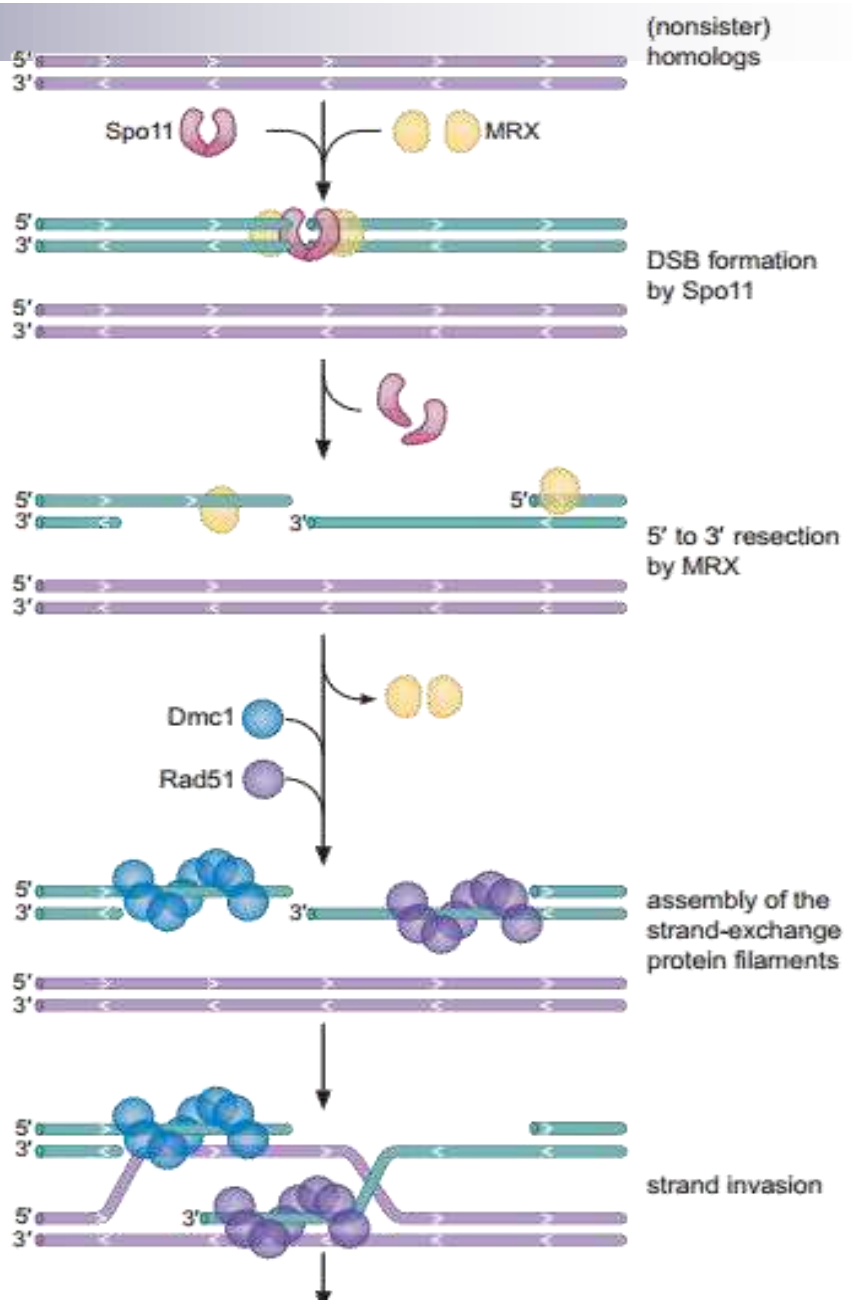
by phosphorylated MDC1. In meiotic prophase, TDP2-dependent NHEJ pathway is inactivated by unknown mechanisms and MRN complex-dependent HR pathway is essential for repairing SPO11-linked DSBs. The recruitment of NBS1 to SPO11-linked DSB sites on meiotic chromosome axes is independent of MDC1 but requires another unknown phosphorylated protein. MDC1 is required for spreading NBS1 signals from DSB sites to chromosome loops in XY body to mediate meiotic sex chromosome silencing (MSCI).



Homologous Recombination in Eukaryotes



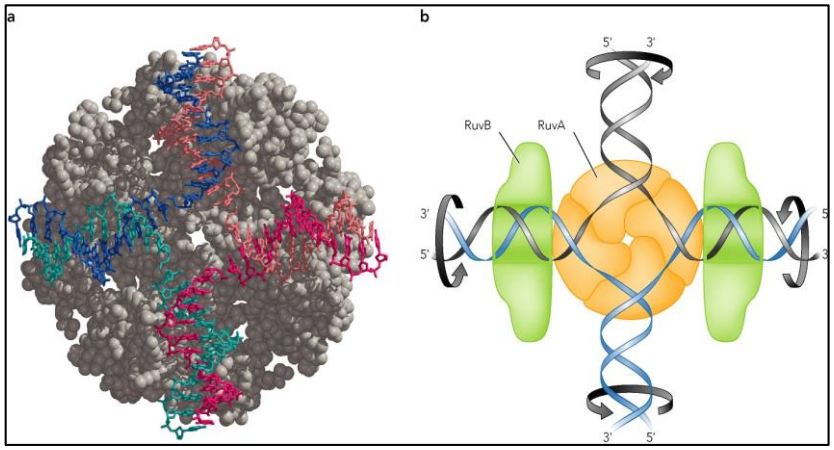
Resolution

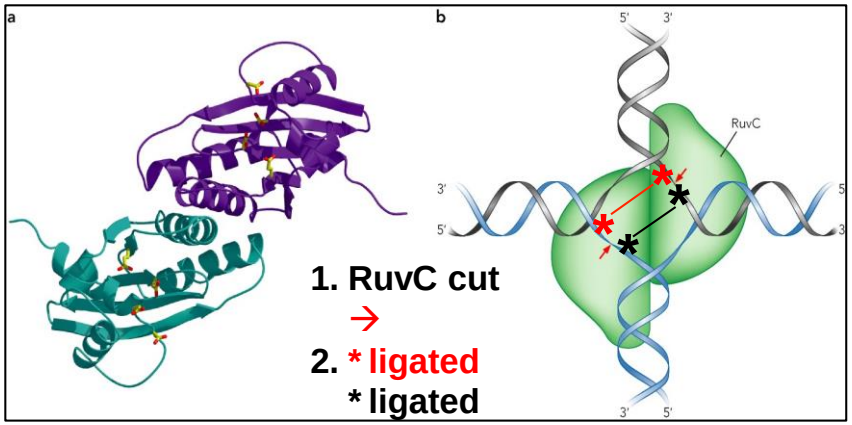


Recombination

Risoluzione delle giunzioni di Holliday RuvABC

- **RuvAB** riconosce la giunzione di Holliday e ne promuove la migrazione
- **RuvA** è un tetramero, **RuvB** un esamero con attività ATPasica.
- **RuvC** è una resolvasi che risolve il complesso tagliando in una delle due direzioni
- **RuvA** si lega specificamente alla Holliday Junction.
- Recluta **RuvB** che è un'ATPasi simile a elicasi, che muove la Holliday J.
- **RuvC** dimero risolve le Holliday Junctions: produce tagli e parti terminali aperte saranno saldate da una DNA ligase





PROKARYOTIC AND EUKARYOTIC PROTEINS CATALYST REQUIRED FOR HR

Pairing homologous DNAs and strand invasion	E. coli Protein Catalyst	Eukaryotic Protein Catalyst
Recombination Step	RecA protein	Rad51 Dcm1 (in meiosis)
Introduction of DSB	None	Spo11 (in meiosis) HO (for mating-type switching)
Processing DNA breaks to generate single strands for invasion	RecBCD helicase/nuclease	MRX protein (also called Rad50/58/ 60 nuclease)
Assembly of strand-exchange proteins	RecBCD and RecA	Rad52 and Rad59
Holliday junction recognition and branch migration	RuvAB complex	Not well characterized
Resolution of Holliday junctions	RuvC	Rad51c–XRCC3 complex, WRN, and BL

Adopted from: *Molecular Biology of the Gene*, (2013) 7th Ed, Benjamin Cummings, London.

Sintesi

- La ricombinazione produce nuove combinazioni geniche scambiando cromosomi omologhi.
- Sia le prove genetiche che fisiche hanno portato a diversi modelli di ricombinazione
- Caratteristiche comuni dei modelli di ricombinazione
  - formazione di DNA eteroduplex
  - riparazione non corrispondenti
  - risoluzione (giunzione)
- Il processo stesso di ricombinazione è sotto controllo genetico da parte di numerosi geni
  - RecA, B, C, D, E, F e G
  - RuvA, B e C
  - Rus E .....

Animations of Holliday structures



Holliday model [HD Animation].mp4