

Cromosomi omologhi si scambiano segmenti durante il crossing-over

Benchè tutti i geni che avevano scoperto potessero tutti essere organizzati in gruppi di associazione, Morgan e i suoi colleghi scopersero che all'interno dei gruppi la associazione era incompleta. La maggior parte delle volte, i geni noti come associati (e pertanto situati sullo stesso cromosoma) venivano segregati assieme, come atteso. Però talvolta, due o più di tali caratteri apparivano nella progenie in combinazioni non-parentali. Questo fenomeno della "associazione-non-proprio-completa" fu chiamato ricombinazione perché alleli differenti apparivano nella progenie in combinazioni nuove e inaspettate.

Per spiegare tale progenie ricombinante, Morgan propose che cromosomi omologhi potessero scambiarsi dei segmenti, presumibilmente mediante un evento di rottura-riunione-fusione, come illustrato nella figura 18-17 a. Con questo processo, un allele o un gruppo di alleli originariamente presente su un membro della coppia di cromosomi omologhi poteva essere trasferito all'altro cromosoma in un modo reciproco.

Nell'esempio della figura 18-17 a, due cromosomi omologhi, uno con gli alleli A e B e l'altro con gli alleli a e b, sono affiancati alla sinapsi. Porzioni di due cromatidi non-fratelli (AB e ab) si scambiano segmenti di DNA, producendo due cromatidi ricombinanti, uno con gli alleli A e b e uno con gli alleli a e B. ciascuno dei quattro cromatidi finisce in un differente gamete alla fine della seconda divisione meiotica, così i prodotti della meiosi includeranno due gameti parentali e due gameti ricombinanti, assumendo che sia avvenuto un singolo evento di crossing-over (figura 18-17 b).

Sappiamo ora che il crossing-over avviene durante lo stadio pachitene della prima profase meiotica (vedi figura 18-17), in un momento in cui i cromatidi fratelli sono compattati ed è difficile osservare che cosa stia avvenendo. Quando i cromatidi cominciano a separarsi al diplotene, ciascuno dei quattro cromatidi in un bivalente può essere identificato come appartenente all'uno o all'altro dei due omologhi. Tutte le volte che è avvenuto un crossing-over tra cromatidi non-fratelli, i due omologhi rimangono attaccati l'uno all'altro, formando un chiasma.

Alla prima metafase meiotica, i cromosomi omologhi sono quasi sempre tenuti assieme da almeno un chiasma; se no, potrebbero non segregare correttamente. Molti bivalenti contengono chiasmi multipli. I bivalenti umani, per esempio, tipicamente contengono due o tre chiasmi poiché crossing-over multipli avvengono routinariamente tra omologhi appaiati. Per avere un effetto genetico, i crossing-over devono avvenire tra cromatidi non-fratelli. In alcune specie si osservano anche scambi tra cromatidi fratelli, ma tali scambi non hanno conseguenze genetiche perché i cromatidi fratelli sono geneticamente identici.

La localizzazione dei geni può essere mappata misurando le frequenze di ricombinazione

Eventualmente, divenne chiaro a Morgan e ad altri che la frequenza di progenie ricombinante era differente per differenti coppie di geni all'interno dei vari gruppi di associazione, ma che per una specifica coppia di geni era rimarcabilmente

costante. Questo suggeriva che la frequenza di ricombinazione dipendesse da quanto lontani i geni fossero situati lungo lo stesso cromosoma. Se la probabilità di crossing-over fosse la stessa in qualunque punto lungo un cromatide (una assunzione che sembra essere corretta nella maggior parte dei casi), allora geni localizzati molto vicini gli uni agli altri avrebbero una minor probabilità di venir separati da un evento di crossing-over tra di loro che geni che siano situati distanti gli uni dagli altri.

Fu, in effetti, presto realizzato che la frequenza di ricombinazione, espressa come la percentuale di progenie ricombinante, era un mezzo utile per quantificare la distanza tra i geni. Questa intuizione portò Alfred Sturtevant, uno studente nel laboratorio di Morgan, a suggerire nel 1911 che i dati di ricombinazione potevano essere utilizzati per determinare dove fossero localizzati i geni lungo i cromosomi di *Drosophila*. Pertanto, un cromosoma poteva essere visto come una sequenza lineare di geni le cui posizioni potevano essere determinate sulla base dei dati di ricombinazione.

Determinare l'ordine sequenziale e la spaziatura dei geni su un cromosoma basandosi sulle frequenze di ricombinazione viene detto **mappatura genetica**. Nella costruzione di tali mappe, la frequenza di ricombinazione è la distanza di mappa espressa in unità di mappa. Se, per esempio, gli alleli in figura 18-17 b appaiono nella progenie nelle combinazioni parentali (AB e ab) 85% delle volte e nelle combinazioni ricombinanti (Ab e aB) 15% delle volte, concludiamo che i due geni sono associati (cioè sono situati sullo stesso cromosoma) e che sono distanziati di 15 unità di mappa. Questo approccio è stato usato per mappare i cromosomi di molte specie di piante e animali, nonché di batteri e di virus. Però, dato che batteri e virus non si riproducono per via sessuale, i metodi usati per generare i ricombinanti sono in qualche modo differenti.

La Ricombinazione Genetica nei Batteri e nei Virus

Da quanto detto sino ad ora, ci si aspetterebbe che la ricombinazione fosse ristretta a organismi che si riproducono sessualmente poiché la ricombinazione dipende dal crossing-over tra cromosomi omologhi. Come abbiamo visto, la riproduzione sessuale fornisce una opportunità per la ricombinazione ad ogni generazione quando i cromosomi omologhi diventano strettamente giustapposti durante la divisione meiotica che produce i gameti. In contrasto, batteri e virus sembrerebbero cattivi candidati per la ricombinazione genetica perché hanno genomi aploidi e si riproducono asessualmente, senza alcun ovvio meccanismo per portare a contatto tra loro i genomi di due individui differenti.

Malgrado questo, virus e batteri sono capaci di ricombinazione genetica. Di fatto, dati di ricombinazione hanno permesso una accurata mappatura di genomi virali e batterici ben prima dell'avvento della moderna tecnologia del DNA. Per comprendere come la ricombinazione possa avvenire in un genoma aploide, dobbiamo esaminare i meccanismi che permettono a due genomi aploidi, o a porzioni di essi, di venire a contatto in una singola cellula.

La Ricombinazione Genetica Può Avvenire in Cellule Batteriche Coinfettate con Batteriofagi Correlati

La maggior parte delle prime informazioni a livello molecolare sui geni e sulla loro organizzazione, così come la terminologia usata per questi argomenti, è derivata da esperimenti sui batteriofagi, in particolare i fagi T-pari e il fago λ (vedere la BOX 16A). Sebbene i fagi siano aploidi e non si riproducano sessualmente, può avvenire ricombinazione genetica tra fagi quando singole cellule batteriche sono infettate contemporaneamente da varianti diverse dello stesso fago. La Figura 18-18 mostra un esperimento in cui cellule batteriche sono coinfeziate da due varianti del fago T4. Durante la replicazione fagica nella cellula batterica, le molecole di DNA fagiche possono venire a contatto casualmente in modo da permettere lo scambio di segmenti di DNA tra regioni omologhe. Ne derivano fagi ricombinanti con una frequenza che dipende dalla distanza tra i geni presi in considerazione, come negli organismi diploidi. Normalmente, più i geni sono distanti, maggiore è la probabilità che tra loro avvenga ricombinazione.

Nella ricombinazione fagica, il crossing over non avviene tra cromatidi, ma tra molecole di DNA nudo, relativamente corte. La semplicità di questa situazione ha facilitato la ricerca dei meccanismi molecolari della ricombinazione e delle proteine che catalizzano questo processo. È chiaro che la ricombinazione fagica richiede l'allineamento preciso di molecole di DNA omologhe nella regione del crossing over, un requisito presumibilmente necessario anche per la ricombinazione del DNA negli eucarioti e nei procarioti.

Trasformazione e Trasduzione Comportano Ricombinazione con DNA Libero o DNA Trasportato dai Batteriofagi nelle Cellule Batteriche

Nei batteri esistono diversi meccanismi per ricombinare l'informazione genetica. Uno di tali meccanismi è già stato menzionato nel Capitolo 16, in cui sono stati discussi gli esperimenti con i ceppi ruvidi e lisci degli pneumococchi che hanno portato Oswald Avery a concludere che le cellule batteriche possono essere trasformate da un tipo genetico in un altro esponendole a DNA purificato. Questa capacità di una cellula batterica di assorbire molecole di DNA e di incorporare parte di tale DNA nel suo proprio genoma si chiama **trasformazione** (Figura 18-19a). Benchè inizialmente descritta come una tecnica di laboratorio per introdurre artificialmente DNA in cellule batteriche, la trasformazione è ora riconosciuta come un meccanismo naturale mediante il quale alcuni tipi di batteri (benchè certamente non tutti) possono acquisire informazione genetica dal DNA di altre cellule.

Un secondo meccanismo di ricombinazione genetica tra batteri, chiamato **trasduzione**, coinvolge il DNA trasportato in una cellula batterica da un batteriofago. La maggior parte dei fagi contiene solo il proprio DNA, ma occasionalmente un fago può incorporare nelle particelle della sua progenie sequenze del DNA della cellula batterica ospite. Tale particella fagica può in seguito infettare un altro batterio, iniettando, come una siringa, il DNA di una cellula batterica in un'altra (Figura 18-19b). I fagi capaci di portare DNA dell'ospite da una cellula all'altra sono chiamati *fagi trasduttori*.

Il fago trasduttore P1, che infetta *E.coli*, è stato particolarmente utile per mappare i geni di questo batterio. La quantità di DNA che può stare in una particella fagica è piccola in confronto alle dimensioni del genoma batterico. Due geni, o più generalmente due marcatori genetici (specifiche sequenze di basi), devono pertanto essere molto vicini per essere entrambi trasportati in una cellula batterica da una singola particella fagica. Questa è la base della *mappatura per cotrasduzione*, nella quale la vicinanza di un marcatore all'altro viene determinata quantificando la

frequenza con cui i marcatori si trovano assieme in una particella fagica trasducente. Più vicini sono i due marcatori, più probabile è che siano cotrasdotti in una cellula batterica. Studi con il fago trasduttore P1 hanno rivelato che due marcatori non possono essere cotrasdotti se sono separati nel DNA batterico da più di circa 10^5 paia di basi. Questo è in accordo con l'osservazione che il fago P1 ha un genoma di circa quelle dimensioni.

La Coniugazione E' una Attività Sessuale Modificata che Facilita la Ricombinazione Genetica nei Batteri

Oltre alla trasformazione e alla trasduzione alcuni tipi batterici trasferiscono DNA da una cellula all'altra mediante **coniugazione**. Come suggerisce il nome, la coniugazione assomiglia a un atto sessuale, in quanto un batterio, (spesso detto "maschio"), è chiaramente identificabile come donatore e un altro (detto "femmina") come ricevente. Benchè la coniugazione assomigli a un processo sessuale, questa modalità di trasferimento del DNA non è una parte integrante del ciclo vitale del batterio e in genere coinvolge solo una parte del genoma; pertanto, non si può considerare come una vera riproduzione sessuale. L'esistenza della coniugazione fu postulata nel 1946 da Joshua Lederberg e Edward L. Tatum, che per primi dimostrarono che nei batteri può avvenire ricombinazione genetica (in assenza di trasformazione). Stabilirono anche che la coniugazione richiede un contatto fisico tra le due cellule batteriche. Sappiamo ora che la coniugazione comporta il trasferimento direzionale di DNA dal batterio donatore al batterio ricevente. Consideriamo alcuni dettagli di tale processo.

Il Fattore F. La presenza di una sequenza di DNA, detta fattore F (F per fertilità), rende una cellula di *E.coli* in grado di agire come donatore durante la coniugazione. Il fattore F può essere presente in due forme, o come plasmide capace di replicazione indipendente (pagina xxx), o come un segmento di DNA all'interno del cromosoma batterico. Batteri donatori che contengono il fattore F nella sua forma plasmidica, si chiamano F^+ , mentre le cellule riceventi che di solito sono completamente prive di fattore F, si chiamano F^- . Le cellule donatrici sviluppano lunghe proiezioni simili a peli, dette **pili sessuali** che si dipartono dalla superficie cellulare (Figura 18-20a). L'estremità di ciascun pilo sessuale contiene molecole che si legano specificamente alla superficie delle cellule riceventi, portando alla formazione di un **ponte di coniugazione** citoplasmatico transitorio, attraverso il quale il DNA viene trasferito dalla cellula donatore alla ricevente (Figura 18-20b).

Quando una cellula donatrice contiene un fattore F nella forma plasmidica, una copia del plasmide viene rapidamente trasferita durante la coniugazione alla cellula ricevente, convertendola da F^- a F^+ (Figura 18-21a). Il trasferimento inizia sempre da un punto del plasmide detto **origine del trasferimento**, nella figura rappresentato dalla freccia. Durante il trasferimento di un fattore F in una cellula F^- , la cellula donatrice non perde il suo stato F^+ , in quanto il fattore F viene replicato in coincidenza con il suo trasferimento, permettendo che una copia del fattore F resti nella cellula donatrice. Il risultato del mescolamento di cellule batteriche F^+ e F^- è una popolazione di cellule interamente F^+ . La "mascolinità" è, in un certo senso, infettiva e il fattore F è l'agente infettivo.

Cellula Hfr e Trasferimento del Cromosoma Batterico. Fino ad ora abbiamo visto che le cellule donatrici e riceventi sono definite dalla presenza o assenza del fattore F e che questo è trasmesso per coniugazione. Ma come fanno a comparire i ricombinanti

batterici mediante questo meccanismo? La risposta è che il fattore F, normalmente presente come plasmide, può talvolta integrarsi nel cromosoma batterico come si vede nella Figura 18-21b. (L'integrazione deriva da un crossing over tra corte sequenze di DNA nel cromosoma e sequenze simili nel fattore F). L'integrazione cromosomica del fattore F converte una cellula donatrice F^+ in una cellula **Hfr** (high frequency of recombination) capace di produrre una alta frequenza di ricombinazione in successivi incroci poiché ora può trasferire DNA genomico durante la coniugazione.

Quando un batterio Hfr è incrociato con un ricevente F^- nella cellula ricevente viene trasferito del DNA (Figura 18-21c). Ma invece di trasferire solo il fattore F, la cellula Hfr trasferisce almeno parte (e talvolta tutto) del suo DNA cromosomico, conservandone una copia come nel trasferimento del plasmide F. Il trasferimento inizia dall'origine del trasferimento del fattore F integrato e procede nella direzione dettata dall'orientamento del fattore F all'interno del cromosoma. Si noti che il DNA cromosomico è trasferito in forma lineare, con una piccola parte del fattore F all'estremità iniziale e il resto all'estremità terminale. Poiché il fattore F in questo modo viene diviso in due pezzi, solo le cellule riceventi che ricevono un cromosoma batterico completo dal donatore Hfr possono diventare esse stesse cellule Hfr. Il trasferimento dell'intero cromosoma è un evento estremamente raro, tuttavia, perché richiede circa 90 minuti. In genere, il contatto si interrompe spontaneamente prima che il trasferimento sia completo, e nella cellula ricevente è passato solamente una parte del cromosoma Hfr (Figura 18-21c). Il risultato è che i geni situati vicino all'origine del trasferimento sul cromosoma Hfr sono quelle che hanno la maggior probabilità di essere trasferite nella cellula ricevente.

Quando una parte del cromosoma Hfr è stata introdotta in una cellula ricevente mediante coniugazione, può ricombinare con regioni del DNA cromosomico della cellula ricevente che hanno sequenze omologhe (simili). I cromosomici batterici ricombinanti generati con questo processo contengono informazione genetica in parte della cellula donatrice e in parte della ricevente. Solo le sequenze di DNA del donatore che attraverso questo meccanismo di ricombinazione sono riuscite ad integrarsi sopravvivono nella cellula ricevente e nella sua progenie. Il DNA del donatore che durante la ricombinazione non si è integrato, così come il DNA che durante la ricombinazione si è staccato dal cromosoma del ricevente, alla fine viene degradato dalle nucleasi.

La correlazione tra la posizione di un gene sul cromosoma batterico e la sua probabilità di essere trasferito può essere utilizzata per mappare i geni rispetto all'origine del trasferimento e quindi anche uno rispetto all'altro. Per esempio, se il gene *A* del cromosoma Hfr viene trasferito durante la coniugazione nel 95% delle volte, il gene *B* nel 70% e il gene *C* nel 55% delle volte, allora la sequenza di questi geni è *A-B-C*, e il gene *A* è il più vicino all'origine del trasferimento. Inoltre, dato che le cellule figlie del batterio ricevente, essendo ricombinanti, possono servire per l'analisi genetica. In genere, si fanno incroci tra ceppi Hfr e F^- che differiscono in due o più proprietà genetiche. Dopo che la coniugazione è avvenuta, piastrando le cellule su terreno di coltura su cui possono crescere i ricombinanti ma non le cellule "parentali", si possono identificare i ricombinanti e calcolare le frequenze di ricombinazione.

Meccanismi Molecolari della Ricombinazione Omologa

Abbiamo descritto cinque diverse situazioni in cui si può scambiare informazione tra molecole di DNA omologhe: (1) la profase I della meiosi associata alla gametogenesi

degli eucarioti, (2) la coinfezione di batteri con batteriofagi correlati, (3) la trasformazione dei batteri con il DNA, (4) la trasduzione dei batteri da parte di fagi trasducenti e (5) la coniugazione dei batteri. Nonostante le ovvie differenze, tutte queste cinque situazioni condividono un aspetto: tutte coinvolgono la **ricombinazione omologa**, in cui avviene lo scambio di informazione genetica tra molecole di DNA con elevata omologia di sequenza. Siamo quindi pronti per discutere i meccanismi molecolari che sono alla base di questo tipo di ricombinazione. Ci serviremo di esempi presi sia dagli eucarioti che dai procarioti, dato che i principi coinvolti sono apparentemente molto simili nei due tipi di organismi.

La Rottura e lo Scambio del DNA Sono Alla Base della Ricombinazione Omologa

Poco dopo la scoperta che durante la meiosi avviene scambio di informazione genetica fra i cromosomi, furono espresse due teorie per spiegare come questo potesse avvenire. Il *modello della rottura-e-scambio* postulava che avvenissero delle rotture nelle molecole di DNA di due cromosomi appaiati, seguite da scambio e riunione dei segmenti interrotti. Secondo il *modello della scelta di copia*, la ricombinazione genetica avviene durante la replicazione del DNA. Secondo la seconda teoria, la replicazione del DNA inizia con la copiatura di una molecola di DNA di un cromosoma e, ad un certo punto, prosegue copiando il DNA del cromosoma omologo. Il risultato netto sarebbe una nuova molecola di DNA contenente informazione derivata da entrambi i cromosomi. Una delle predizioni più ovvie del modello della scelta di copia è che la replicazione del DNA e la ricombinazione genetica debbano avvenire insieme. Quando studi successivi rivelarono che la replicazione del DNA avviene durante la fase S mentre la ricombinazione avviene tipicamente durante la profase I, l'idea della scelta di copia dovette essere abbandonata come modello generale della ricombinazione meiotica.

La prima evidenza sperimentale a sostegno del modello di rottura-e-scambio fu ottenuta nel 1961 da Matthew Meselson e Jean Waigle usando fagi dello stesso tipo genetico marcati con un isotopo pesante (^{15}N) o un isotopo leggero (^{14}N) dell'azoto. L'infezione simultanea di cellule batteriche con questi due ceppi marcati dello stesso fago risultò nella produzione di particelle fagiche ricombinanti contenenti geni derivati da entrambi i fagi. Quando fu esaminato il DNA di questi fagi ricombinanti, si trovò che conteneva una miscela di ^{15}N e ^{14}N (Figura 18-22). Dato che questi esperimenti venivano attuati in condizioni che prevenivano la sintesi di nuovo DNA, le molecole di DNA ricombinante dovevano essere state prodotte per rottura e riunione di molecole di DNA derivate dai due fagi originali.

Esperimenti successivi con batteri i cui cromosomi erano stati marcati con ^{15}N e ^{14}N rivelarono che il DNA contenente una miscela di entrambi gli isotopi è prodotto anche durante la ricombinazione genetica fra cromosomi batterici. Inoltre, quando tali molecole di DNA ricombinante sono riscaldate per dissociarle in filamenti singoli, in ciascuno dei filamenti di DNA si ritrova una miscela di ^{15}N e ^{14}N ; pertanto, durante la ricombinazione la rottura e riunione deve essere avvenuta nella doppia elica del DNA.

Gli esperimenti fatti poco dopo sulle cellule eucariotiche da J. Herbert Taylor portarono a conclusioni simili. In questi studi, le cellule venivano brevemente esposte a ^3H -timidina durante la fase S precedente l'ultima mitosi prima della meiosi, generando cromatidi la cui doppia elica conteneva un filamento di DNA radioattivo. Durante la fase S successiva, la replicazione del DNA in assenza di ^3H -timidina produceva cromosomi contenenti un cromatidio marcato e uno non marcato (Figura

18-23). Durante la meiosi successiva, però, nei singoli cromatidi si trovava una miscela di segmenti radioattivi e non radioattivi come predetto dal modello di rottura-e-scambio. Inoltre, la frequenza degli scambi era direttamente proporzionale alla frequenza con cui andavano incontro a ricombinazione genetica i geni situati in queste regioni. Queste osservazioni diedero grande sostegno all'idea che la ricombinazione genetica nelle cellule eucariotiche, come nelle procariotiche, coinvolge la rottura e lo scambio del DNA. Questi esperimenti dimostrarono anche che la maggior parte degli scambi avviene tra cromosomi omologhi piuttosto che tra due cromatidi fratelli di un cromosoma. Questo è importante perché assicura lo scambio dei geni avvenga tra cromosomi paterni e materni.

La Ricombinazione Omologa Può Produrre Conversione Genica

La conclusione che la ricombinazione omologa è basata sulla rottura-e-scambio del DNA non fornisce di per se stessa molte informazioni sui sottostanti meccanismi molecolari. Uno dei più semplici modelli di rottura-e-scambio che si possano immaginare prevederebbe il taglio delle due molecole di DNA a doppia elica omologhe in posizioni corrispondenti, seguita dallo scambio e dalla riunione delle estremità. Questo modello implica che la ricombinazione genetica sia del tutto reciproca, e cioè che tutti i geni scambiati da un cromosoma compaiano nell'altro e viceversa. Consideriamo, per esempio, la situazione ipotetica di due geni che chiamiamo *P* e *Q*. Se su un cromosoma ci sono le forme *P1* e *Q1* di questi geni e sull'altro le forme alternative *P2* e *Q2* i prodotti attesi di uno scambio reciproco sarebbero un cromosoma con i geni *P1* e *Q2* e l'altro cromosoma con i geni *P2* e *Q1*.

Sebbene in genere si osservi questa reciprocità, in alcune situazioni si è trovato che la ricombinazione non è reciproca. In seguito a ricombinazione, per esempio, si possono generare un cromosoma con i geni *P1* e *Q2* e l'altro con i geni *P2* e *Q2*. In questo caso, il gene *Q1* atteso sul secondo cromosoma sembra essere stato convertito in un gene *Q2*. Per questa ragione, la ricombinazione non reciproca è spesso definita **conversione genica**. La conversione genica si osserva più frequentemente per geni situati molto vicini uno all'altro. Dato che la ricombinazione tra geni vicini è un evento raro, la conversione genica è più facilmente osservabile in organismi che si riproducono rapidamente e generano ampie progenie, come i lieviti e la comune muffa del pane, *Neurospora*.

La *Neurospora* è un organismo particolarmente adatto per studiare la conversione genica in quanto le sue cellule meiotiche sono contenute in un astuccio, detto **asco**, che impedisce il movimento delle cellule e permette di seguire facilmente la discendenza di ciascuna cellula (Figura 18-24). Inizialmente ogni asco contiene una singola cellula diploide. La divisione meiotica di questa cellula produce quattro cellule aploidi che successivamente si dividono per mitosi, producendo alla fine un totale di otto cellule. Dato che la divisione finale è mitotica, per ogni cellula che si divide si devono generare due cellule figlie identiche. Eppure, in un numero significativo di casi, questa mitosi produce due cellule geneticamente diverse. Questi risultati inattesi sono in genere osservati con geni vicini al sito di una ricombinazione genetica.

Come si possono produrre per mitosi due cellule geneticamente diverse? La spiegazione più diretta è che un cromosoma contenga uno o più geni nei quali i due filamenti della doppia elica del DNA non sono del tutto complementari. Quando i due filamenti di DNA in queste regioni non complementari si separano e fanno da stampo

per la replicazione del DNA, i due filamenti neosintetizzati avranno una sequenza di basi leggermente diversa in questa regione e costituiranno quindi geni leggermente diversi.

La Ricombinazione Omologa Inizia con Scambi di DNA a Singolo Filamento (Giunzioni di Holliday)

Le osservazioni precedenti suggeriscono che la ricombinazione omologa sia più complicata di quanto ci si aspetta dal semplice modello di rottura-e-scambio in cui il crossing over avviene per rottura di due molecole di DNA a doppia elica e quindi per scambio e riunione delle estremità. Robin Holliday fu il primo a proporre un modello alternativo di ricombinazione, basato sullo scambio di singoli filamenti di DNA tra due molecole di DNA a doppia elica. Un adattamento successivo del modello di Holliday dello scambio di DNA a singolo filamento, proposto da Matthew Meselson e Charles Radding è illustrato nella Figura 18-25. Secondo questo modello, il passaggio iniziale (1) della ricombinazione è la rottura di uno (o di entrambi) i filamenti della doppia elica di DNA. In entrambi i casi, un singolo filamento di DNA derivato da una delle molecole di DNA “invade” una regione complementare di una molecola omologa di DNA a doppia elica, spostando uno dei due filamenti (2). Il processo di riparazione del DNA genera poi una struttura a croce detta **giunzione di Holliday**, nella quale un singolo filamento da ciascuna doppia elica di DNA passa dall'altra parte e si riunisce con la doppia elica opposta (4). La microscopia elettronica ha dato prova diretta dell'esistenza delle giunzioni di Holliday, dimostrando l'esistenza di doppie eliche di DNA riunite da tratti di DNA a singola elica ai siti della ricombinazione genetica.

Quando si è formata una giunzione di Holliday, lo srotolamento e il riavvolgimento delle doppie eliche di DNA causa lo spostamento avanti e indietro lungo il DNA cromosomico del punto di incrocio (5); questo fenomeno, detto migrazione di branca, può rapidamente far aumentare la lunghezza di DNA a singola elica che viene scambiato tra due molecole di DNA. Dopo che è avvenuta la migrazione di branca, la giunzione di Holliday viene tagliata e i filamenti di DNA interrotti sono riuniti assieme a formare due molecole separate di DNA. Ci sono due modi in cui può essere tagliata e riunita una giunzione di Holliday. Se viene tagliata in uno dei due piani, le due molecole di DNA prodotte esibiranno crossing over, cioè il DNA cromosomico al di là del punto dove è avvenuta la ricombinazione sarà stato completamente scambiato tra i due cromosomi (6a). Se la giunzione di Holliday viene invece tagliata nell'altro piano, il crossing over non avviene ma le molecole di DNA esibiscono una regione non complementare vicino al sito dove si era formata la giunzione di Holliday (6b).

Quale è il destino di tali regioni non complementari? Se rimangono intatte, la divisione mitotica successiva separerà i filamenti di DNA non complementari e ciascuno servirà da stampo per la sintesi di un nuovo filamento complementare. Il risultato netto saranno due nuove molecole di DNA con differenti sequenze di basi e pertanto due cellule che contengono geni leggermente diversi (alleli) nella regione interessata. Questa è la situazione occasionalmente osservata in *Neurospora*, dove durante la mitosi che segue la meiosi possono comparire due cellule geneticamente diverse (Figura 18-24). Alternativamente, una regione di DNA non complementare può essere corretta dal meccanismo di escissione e riparo. L'effetto netto della riparazione del DNA, in questo caso, sarà la conversione di geni da una forma a un'altra, in altre parole la conversione genica.

Un enzima chiave coinvolto nella ricombinazione omologa è stato identificato usando estratti batterici che in vitro catalizzano la formazione di giunzioni di Holliday. Tali estratti contengono una proteina chiamata **RecA**, la cui presenza è necessaria per la ricombinazione. Studi sulla proteina RecA purificata hanno dimostrato che catalizza una reazione di “invasione del filamento” nella quale un segmento a singola elica di DNA sposta uno dei due filamenti di una doppia elica di DNA; in altre parole, catalizza il passaggio (2) della Figura 18-25. Nella catalisi di questa reazione, la proteina RecA per prima cosa copre la regione di DNA a singolo filamento. Successivamente, il DNA a singolo filamento ricoperto di proteina interagisce con una doppia elica di DNA muovendosi lungo il DNA bersaglio fino a raggiungere una sequenza complementare. Qui RecA denatura la molecola di DNA bersaglio e promuove l'appaiamento di basi tra il DNA a singolo filamento e il suo filamento complementare. Batteri mutanti che producono proteina RecA difettiva non sono in grado di fare ricombinazione genetica, e gli estratti preparati da tali cellule non sono in grado di formare giunzioni di Holliday da molecole di DNA omologhe.

Il Complesso Sinaptonemale Facilita la Ricombinazione Omologa durante la Meiosi

Come abbiamo visto in precedenza, durante la profase I della meiosi i cromosomi omologhi sono tenuti insieme da una struttura proteica a cerniera detto complesso sinaptonemale. Alcune osservazioni suggeriscono che questa struttura giochi un ruolo importante nella ricombinazione genetica. Primo, il complesso sinaptonemale appare esattamente al momento della ricombinazione. Secondo, la sua localizzazione tra cromosomi omologhi opposti corrisponde alla regione dove avviene il crossing over. Infine, i complessi sinaptonemali sono assenti negli organismi in cui non avviene ricombinazione meiotica come nei maschi del moscerino della frutta.

Presumibilmente, il complesso sinaptonemale facilita la ricombinazione mantenendo uno stretto appaiamento tra cromosomi omologhi adiacenti lungo la loro intera lunghezza. Se il complesso sinaptonemale funziona per facilitare la ricombinazione, come fanno le cellule ad assicurarsi che tali strutture si formino solo tra cromosomi omologhi? Recenti osservazioni suggeriscono l'esistenza di un processo detto *ricerca dell'omologia*, nel quale una rottura a singola elica in una molecola di DNA produce un filamento libero che “invade” un'altra doppia elica di DNA e verifica la presenza di sequenze complementari (vedi (2) in Figura 18-25). Se non si trova una omologia sufficiente, il filamento di DNA libero invade un'altra molecola di DNA e ne verifica la complementarietà, ripetendo il processo fino ad incontrare una molecola di DNA omologa. Solo a questo punto si sviluppa un complesso sinaptonemale che fa appaiare i cromosomi omologhi per tutta la loro lunghezza per facilitare il processo di ricombinazione.

Figura 18-18 Ricombinazione Genetica nei Batteriofagi. (1) Cellule batteriche sono coinfezzate con due popolazioni di fagi parentali con genotipi diversi, garantendo in questo modo che nella stessa cellula siano presenti entrambi i genomi fagici. Uno dei fagi parentali porta gli alleli mutanti a e b, e l'altro porta gli alleli A e B. (2) Durante la replicazione (3) le molecole di DNA fagico possono venire casualmente a contatto in modo da permettere il crossing over e la ricombinazione, (4) dando origine a molecole di DNA fagico ricombinante. La frequenza con cui si formano genotipi ricombinanti è una misura della distanza tra i geni. (Come in altre situazioni, i genotipi della progenie di particelle fagiche sono determinati dai loro fenotipi. Un esempio di fenotipo fagico è la dimensione delle placche che forma su una patina di batteri.)

Coinfezione di una singola cellula batterica da parte di fagi di differenti genotipi
Fagi parentali
Cellula batterica
Replicazione del DNA fagico
Casuale giustapposizione e crossing over tra i DNA dei due genotipi fagici
Molecole di DNA fagiche ricombinanti

Figura 18-19 Trasformazione e Trasduzione in Cellule Batteriche. (a) La trasformazione comporta l'assunzione da parte della cellula batterica di DNA esogeno che occasionalmente si integra nel genoma batterico mediante due eventi di crossing over (indicati dalle x). Il DNA esogeno è evidenziabile nelle cellule della progenie solo se integrato nel cromosoma batterico, in quanto il frammento di DNA che entra nella cellula normalmente non ha capacità di replicazione autonoma nella cellula. (La

principale eccezione è un plasmide intatto.) **(b)** La trasduzione implica la introduzione di DNA esogeno in una cellula batterica mediante un fago. Una volta iniettato nella cellula ospite, il DNA può integrarsi nel genoma batterico come nella trasformazione. In entrambi i casi, i frammenti lineari di DNA che non si integrano nel cromosoma vengono degradati dalle nucleasi. In questa figura, le lettere *A* e *a* rappresentano alleli dello stesso gene.

Cromosoma batterico (DNA)

Cellula batterica

Frammento di DNA

Trasformazione di una cellula batterica da parte di DNA esogeno

DNA dell'ospite batterico

Precedente

Fago trasduttore

Cromosoma batterico (DNA)

Cellula batterica

Trasduzione di una cellula batterica da parte di un fago trasduttore

Figura 18-20 L'Apparato Cellulare per la Coniugazione Batterica. **(a)** La cellula batterica donatrice sulla destra, una cellula F^+ , ha numerose sottili appendici, dette pili, sulla superficie. Di queste fanno parte i pili sessuali, come il pilo molto lungo che connette la cellula F^+ con la cellula F^- . Fatto di proteina codificata da un gene del fattore F, il pilo sessuale permette l'attacco di una cellula donatrice a una cellula ricevente. **(b)** In seguito, si forma un ponte di coniugazione citoplasmatico, attraverso il quale il DNA passa dal donatore al ricevente (TEM).

Pilo sessuale

Ponte di coniugazione

Figura 18-21 Trasferimento di DNA mediante Coniugazione Batterica **(a)** La coniugazione tra un batterio donatore F^+ e un batterio ricevente F^- consiste nel trasferimento di una copia del plasmide fattore F dal donatore al ricevente, convertendo la cellula F^- in una cellula F^+ . Il trasferimento del plasmide F avviene attraverso un ponte di coniugazione e inizia sempre dall'origine del trasferimento del fattore F indicata dalla freccia. **(b)** Conversione di una cellula F^+ in una cellula Hfr per integrazione del fattore F nel cromosoma batterico. **(c)** La coniugazione tra un donatore Hfr consiste nel trasferimento di una copia del genoma Hfr attraverso il ponte di coniugazione nella cellula F^- , a partire dalla origine di trasferimento del fattore F integrato. Di solito, il trasferimento è incompleto, poiché raramente le cellule restano in contatto abbastanza a lungo perché sia trasferito l'intero cromosoma batterico. Una volta all'interno della cellula F^- , parti del DNA della cellula Hfr possono subire una ricombinazione con il DNA della cellula F^- , proprio come nella trasformazione e nella trasduzione (vedere la Figura 18-19). Nella figura le lettere maiuscole rappresentano alleli portati dall'Hfr, le lettere minuscole rappresentano i corrispondenti alleli portati dalla cellula F^- . Nell'ultimo passaggio, l'allele *A* dell'Hfr si è ricombinato nel DNA della cellula F^- al posto del suo allele *a*.

Plasmide F

Cromosoma batterico

Cellula F^+

Cellula F^+ (donatrice)

Cellula F⁻ (ricevente)
Cellula F⁺
Coniugazione tra una cellula F⁺ e una cellula F⁻
Cellula F⁺
Cellula Hfr
Conversione di una cellula F⁺ in una cellula Hfr mediante integrazione del fattore F nel cromosoma batterico
Cellula Hfr (donatrice)
Cellula Hfr
Cellula F⁻ (ricevente)
Cellula F⁻ ricombinante
Coniugazione tra una cellula Hfr e una cellula F⁻

Figura 18-22 Prova del Modello di Rottura-e-Scambio del DNA durante la Ricombinazione dei Batteriofagi. In questo esperimento, cellule batteriche sono infettate con due ceppi dello stesso fago, uno marcato con ¹⁵N e l'altro con ¹⁴N. Dopo la ricombinazione, il DNA dei fagi ricombinanti fu trovato contenere sia ¹⁵N che ¹⁴N, a sostegno dell'idea che la ricombinazione comporta rottura e riunione delle molecole di DNA.

Particelle virali pesanti
Particelle virali leggere
Cellula batterica
Ricombinazione
Particelle virali isolate e analizzate mediante centrifugazione di densità all'equilibrio
Particelle virali leggere
Particelle virali ricombinanti
Particelle virali pesanti

Figura 18-23 Dimostrazione Sperimentale della Rottura-e-Scambio durante la Ricombinazione Eucariotica. In questo esperimento, il DNA è stato marcato radioattivamente esponendo brevemente le cellule eucariotiche alla ³H-timidina prima della ultima mitosi precedente la meiosi. Usando la autoradiografia per esaminare i cromatidi durante la meiosi, si trovò che alcuni contenevano una miscela di segmenti marcati e non marcati come predetto dal modello di rottura-e-scambio.

DNA di cromosomi omologhi
³H-timidina
Ultima mitosi prima della meiosi
Replicazione del DNA durante la fase S prima della meiosi (in assenza di ³H-timidina)
Profase I
Rottura-e-scambio
Cromatidi ricombinanti

Figura 18-24 La Meiosi in *Neurospora*. Nella muffa del pane *Neurospora*, le cellule che vanno incontro a divisione meiotica sono contenute in un astuccio detto asco. L'asco mantiene le singole cellule allineate in fila, rendendo facile seguire la progenie di ciascuna cellula. La separazione dei cromosomi omologhi durante la

meiosi I genera due cellule con caratteri genetici diversi. Anche le cellule prodotte durante la meiosi II possono essere geneticamente diverse a causa di crossing-over avvenuto durante la meiosi I. La terza divisione è una semplice mitosi per cui ci si attende che ogni cellula che si divide generi una coppia di cellule geneticamente identiche (in alto). Occasionalmente tuttavia, questa ultima mitosi produce una coppia di cellule non identiche (in basso).

Asco

Meiosi I

Meiosi II

Mitosi

Cellule vicine inaspettatamente diverse nella loro composizione genetica

Il DNA in questa cellula ha una regione non complementare

Figura 18-25 Modello Molecolare della Ricombinazione Omologa. In questo modello, il passaggio cruciale per la ricombinazione avviene quando (1) un filamento interrotto in una molecola di DNA (2) invade una regione complementare di una doppia elica di DNA omologa (processo catalizzato dalla proteina RecA). Il processo di riparazione del DNA (3) poi porta alla formazione (4) di una giunzione di Holliday, nella quale un singolo filamento da ciascuna doppia elica di DNA passa dall'altra parte e si lega alla doppia elica opposta. Dopo lo spostamento del punto di incrocio (migrazione di branca), causato dallo srotolamento e dal riavvolgimento del DNA (5), la rottura in un piano (6a) crea due molecole di DNA in cui è avvenuto crossing over, mentre la rottura nell'altro piano (6b) genera molecole di DNA che non esibiscono crossing over, ma contengono una regione non complementare vicina al sito dove si è formata la giunzione di Holliday. Nella immagine al microscopio elettronico, la freccia indica una regione dove due molecole di DNA di batteriofago sono riunite da una giunzione di Holliday durante la ricombinazione omologa.

Rottura a singolo filamento

Invasione di filamento (catalizzata da RecA)

Riparazione del DNA

Degradazione

sintesi di DNA

formazione di una giunzione di Holliday

migrazione di branca

per facilitarne la visualizzazione, la giunzione di Holliday è stata ridisegnata in modo che nessun filamento di DNA passi sopra o sotto a un altro filamento

rottura nel piano verticale

ligazione

crossing over

rottura nel piano orizzontale

ligazione

assenza di crossing over