

РЕКОМБИНАЦИЯ

Генетическая рекомбинация - это перераспределение генетического материала (ДНК), приводящее к возникновению новых комбинаций генов.

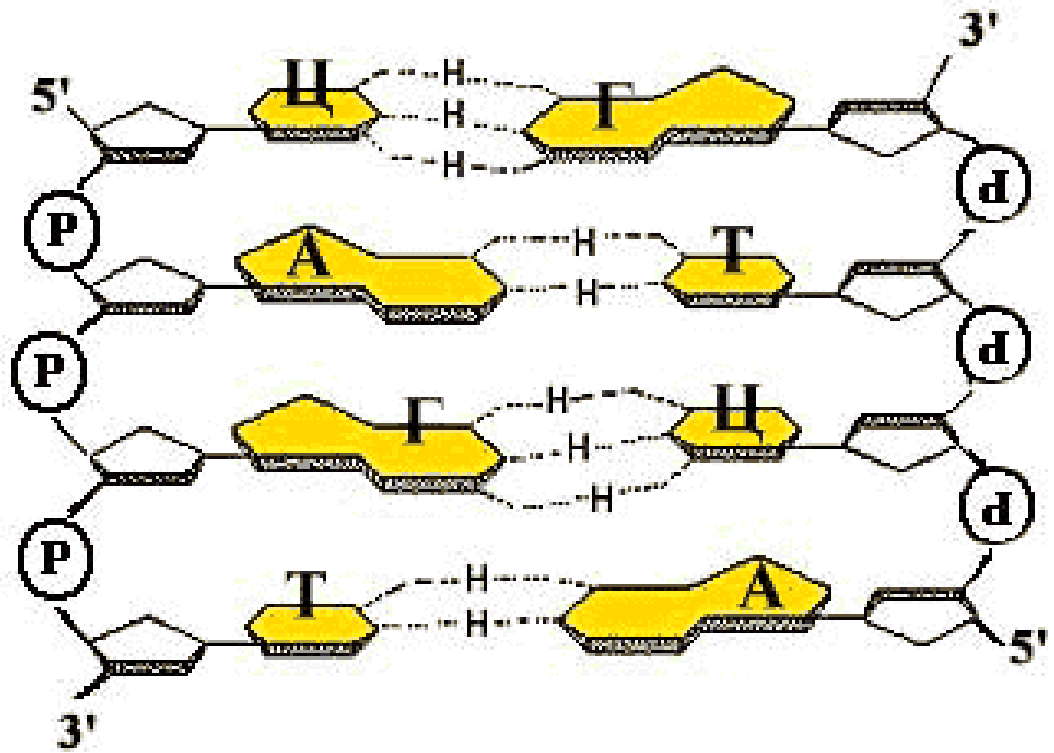
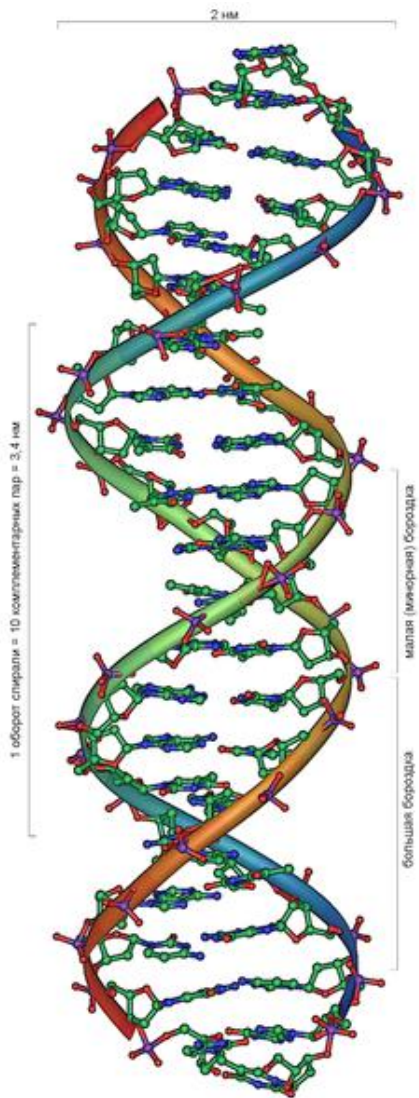
Пути рекомбинации:

- обмен клеточными ядрами
- обмен целыми молекулами ДНК
- обмен частями молекул ДНК

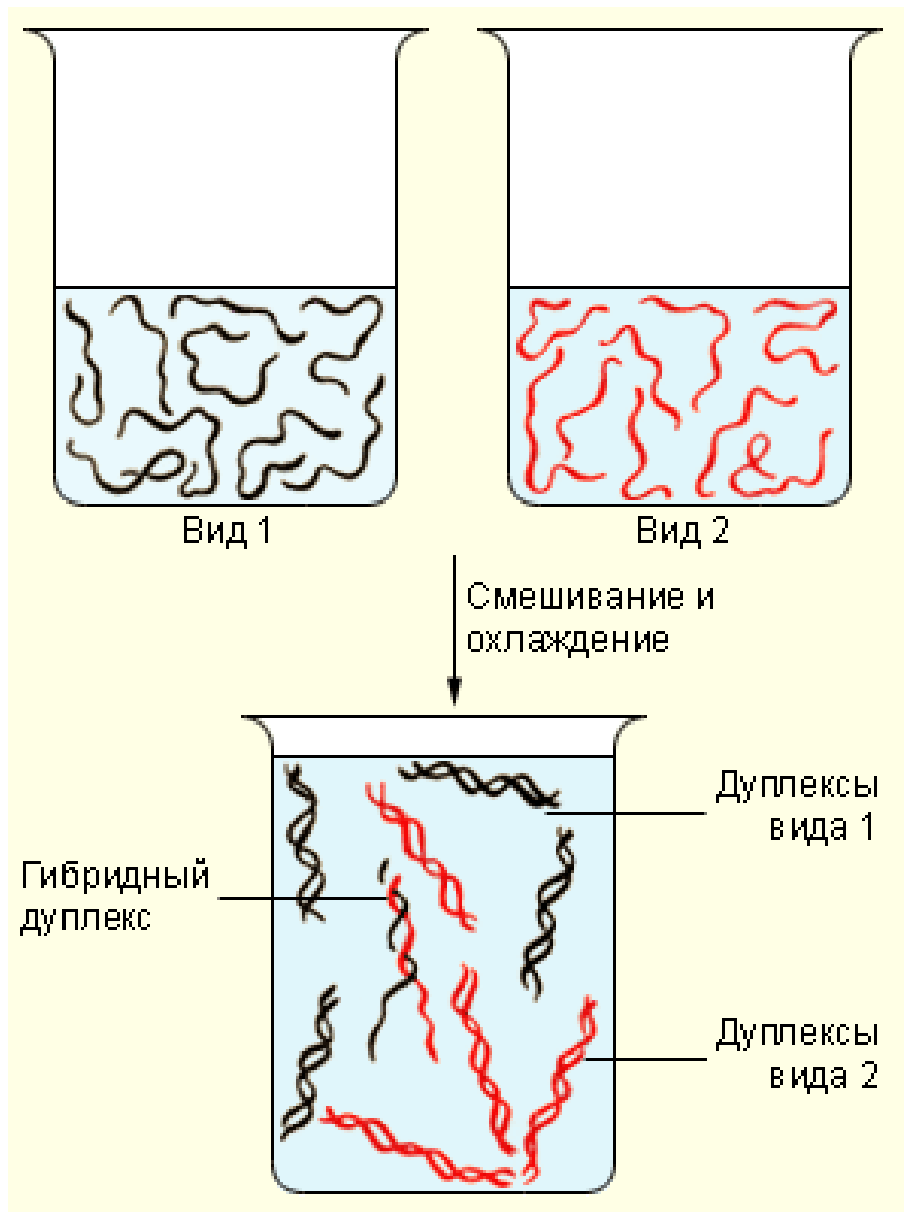
Понятие "рекомбинация" включает большой набор разных по своей природе явлений.

Для всех рекомбинационных процессов характерен этап, на котором молекулы ДНК вступают в контакт в участке, где произойдет обмен полинуклеотидными цепями. Этот этап получил название "**синапсис**".

Однако механизм синапсиса при разных типах рекомбинации принципиально различен. Более того, он является одним из критериев при классификации рекомбинационных явлений.



Молекула ДНК -
дуплекс



ГЕТЕРОДУПЛЕКС

Гомологичная, или общая рекомбинация (кроссинговер)

Основана на спаривании
комплементарных цепей ДНК

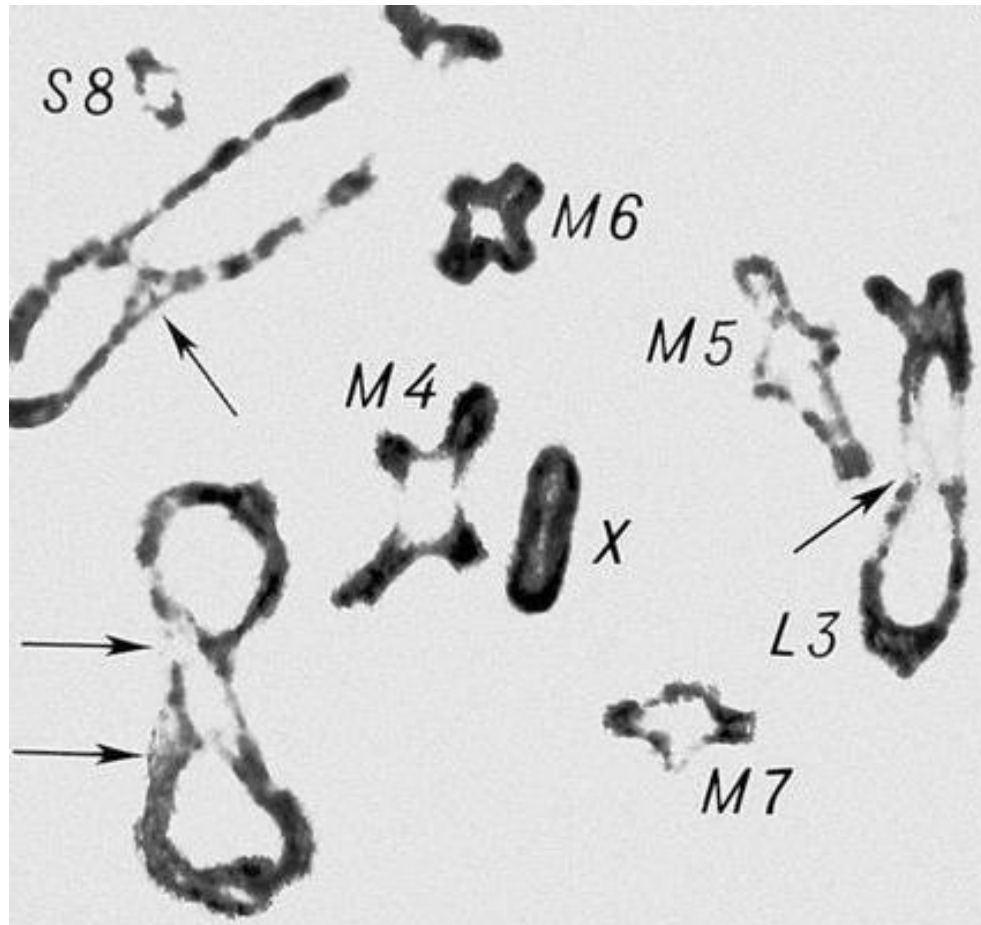
Условие: необходимость в
общей (по всей длине молекул)
гомологии между
рекомбинирующими ДНК.

Результат: обмен равными
частями гомологичных молекул.

В процессе участвует большой
набор специальных белков

Негомологичная рекомбинация

1. Сайт-специфическая
рекомбинация
2. Транспозиции
3. Незаконная
рекомбинация

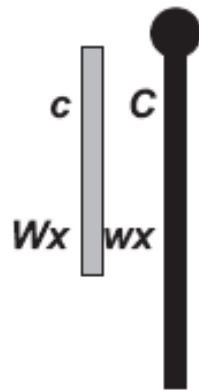


Хиазмы в диплотене у кузнечика

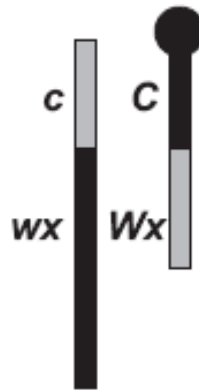
Хромосома дикого
типа имеет **c** и **Wx**



Мутантная хромосома
имеет "клов" около **C**,
транслокацию около **wx**

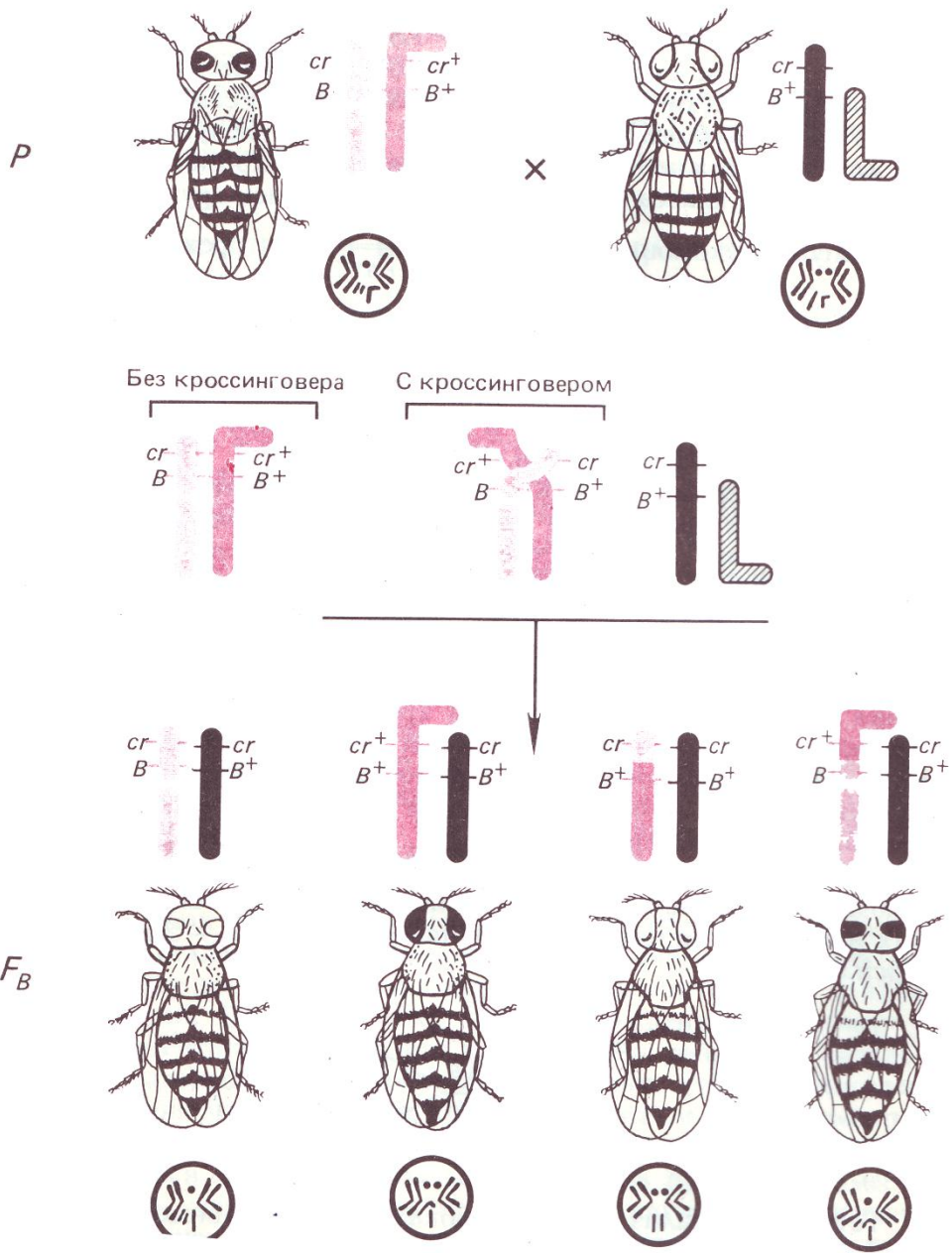


Родительские
хромосомы

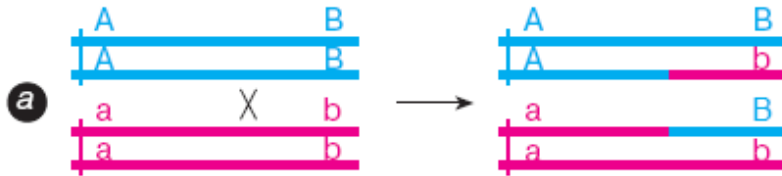


Кроссоверные
хромосомы
потомков

Рис 3.3. Схема кроссинговера в IX
паре хромосом кукурузы в опытах
Крейтона и МакКлинток (из: Lewin,
1994, p. 68)



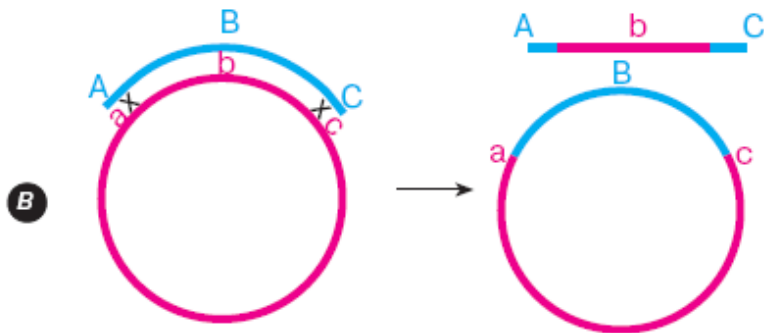
Схемы гомологичной рекомбинации



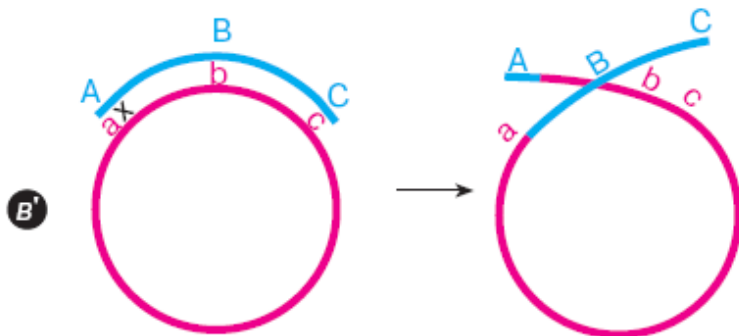
Кроссинговер в профазе I
деления мейоза



Кроссинговер в соматической
клетке на стадии G1
клеточного цикла



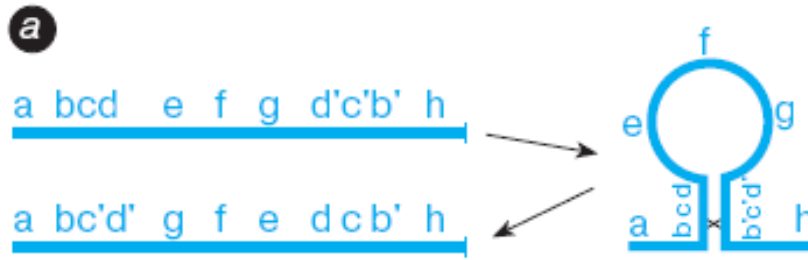
Кроссинговер в клетке кишечной
палочки *Escherichia coli*



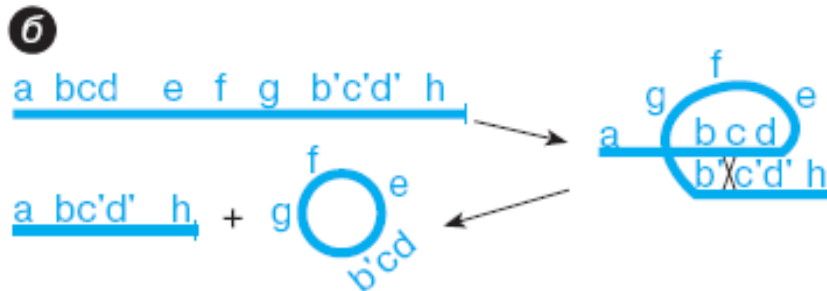
(Глазер, 1998)

Эктопическая рекомбинация

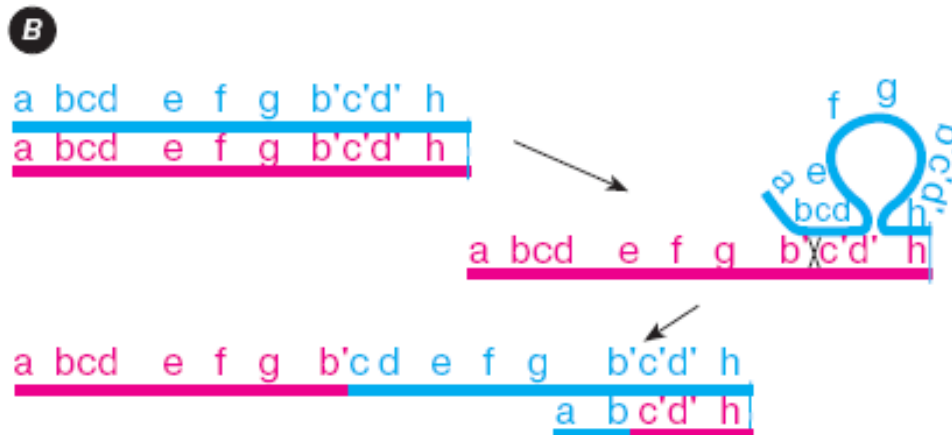
Схемы возможных перестроек хромосом между повторяющимися последовательностями ДНК



Инверсия



Делеция



Дупликация
и делеция

(Глазер, 1998)

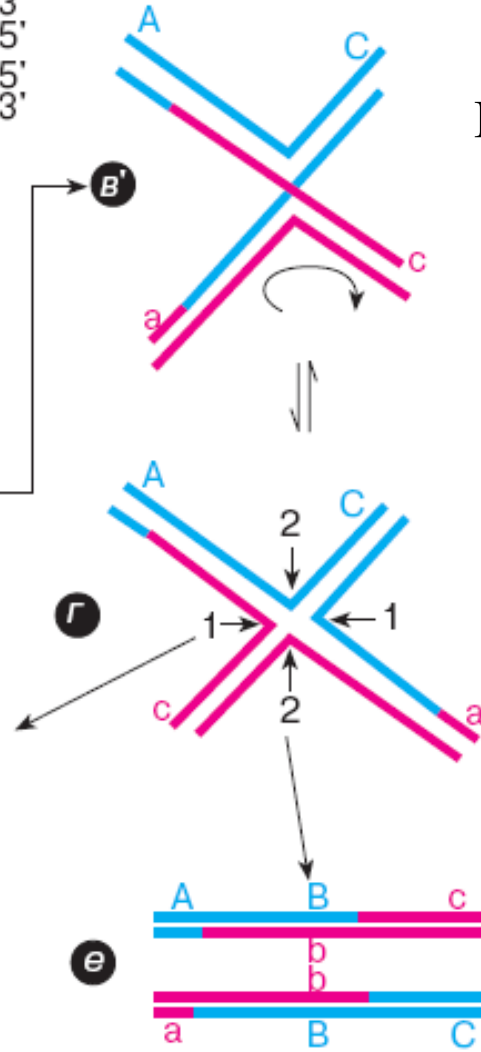
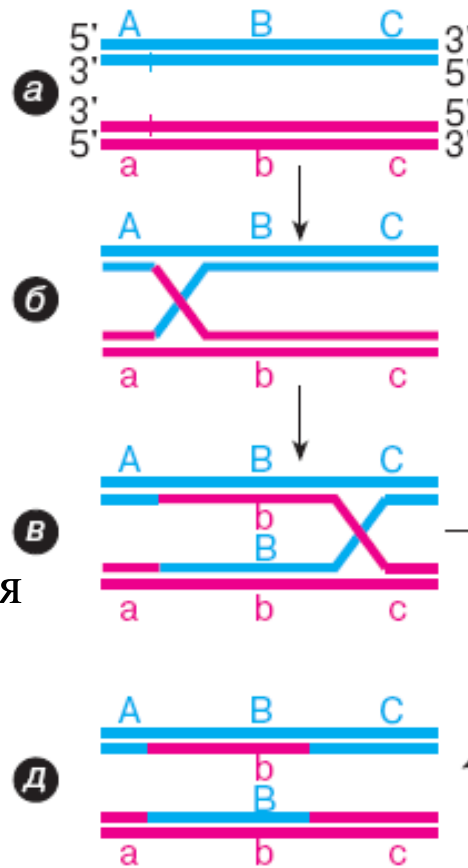
Модель Холлидея

дуплексы ДНК с
одноцепочечными
разрывами

гетеродуплекс,
«полухиазма»
Холлидея

миграция ветвления

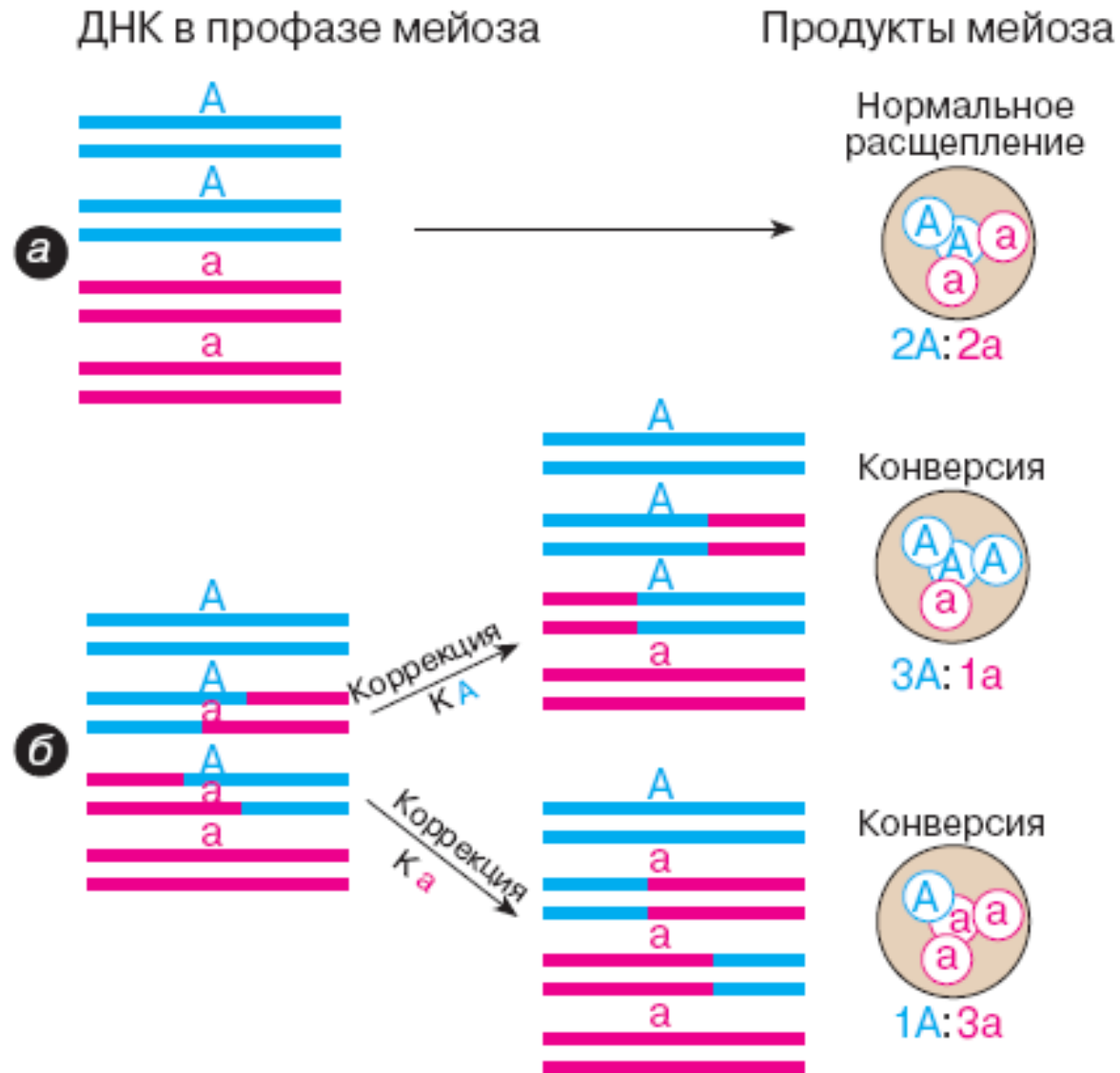
Разработана для
мейотического
кроссинговера

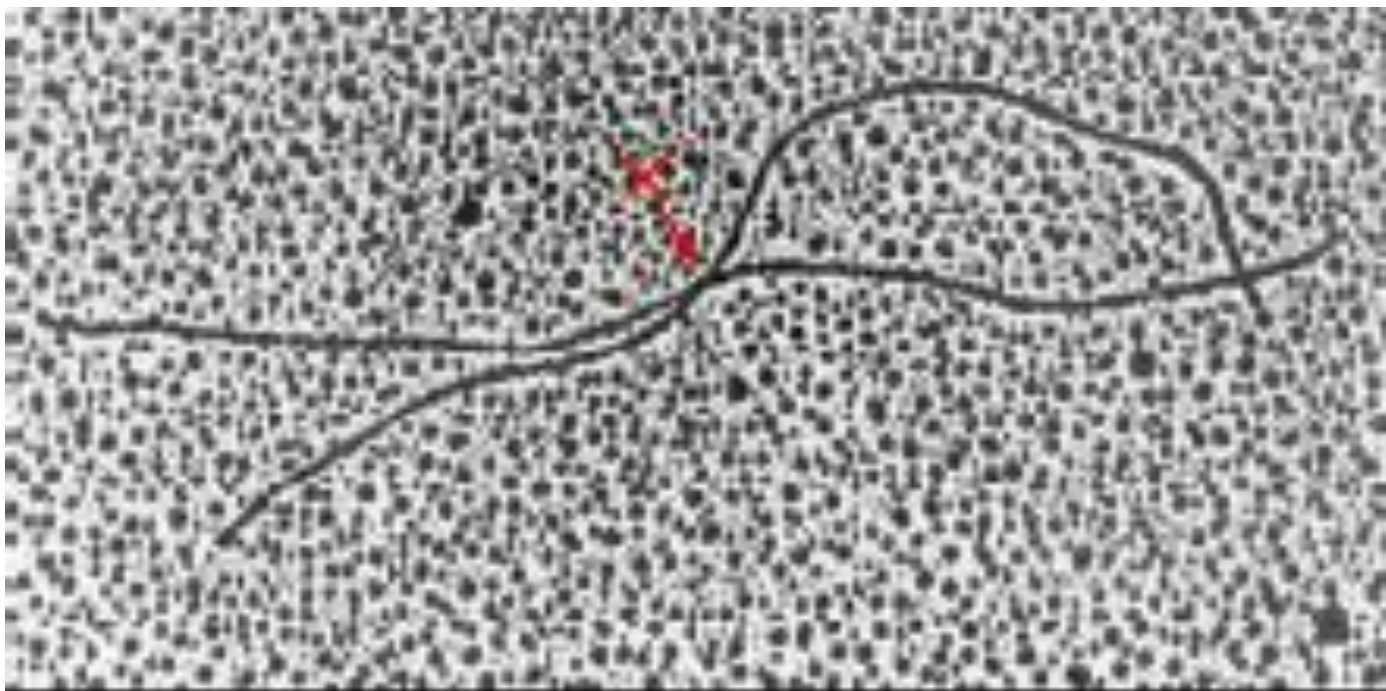


Изомеризация
полухиазмы

Разрешение
полухиазмы

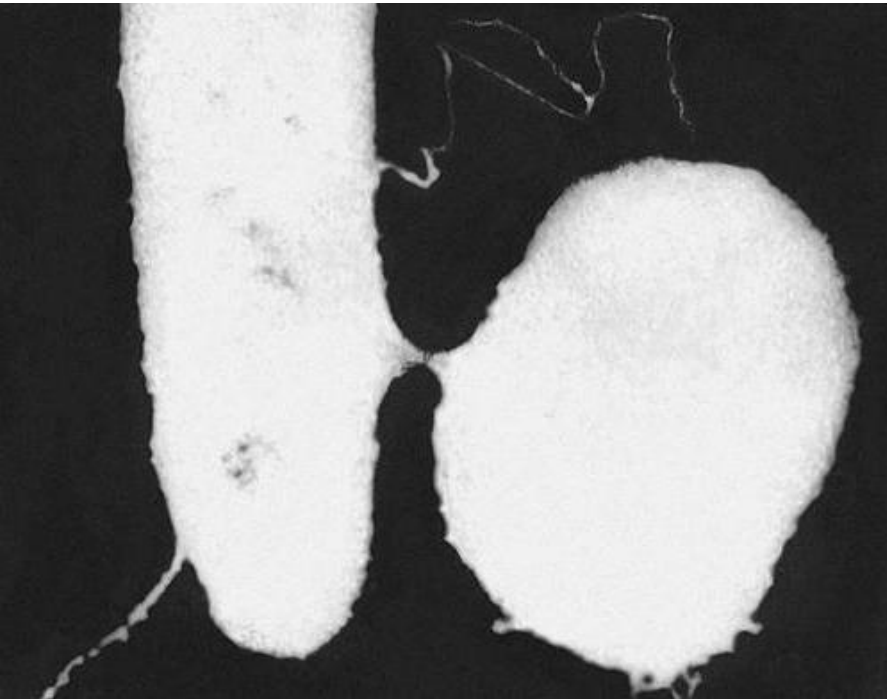
Схема конверсии гена у дрожжей





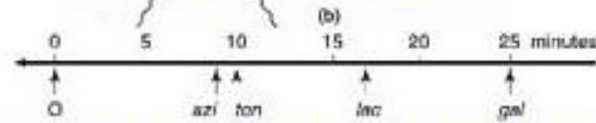
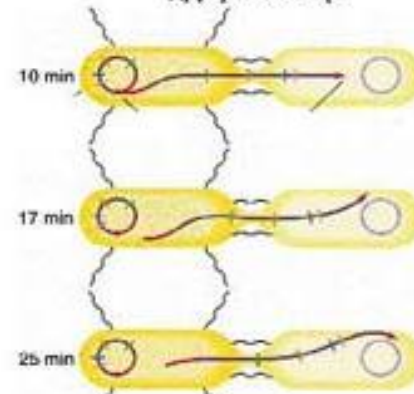
Электронно-микроскопическая фотография
полухиазмы Холлидея

Рекомбинация у *Escherichia coli*: генетический контроль и молекулярный механизм



Электронномикроскопическое изображение **конъюгации** у кишечной палочки; удлинённая клетка — донор, круглая — реципиент.

Чем дольше клетки конъюгируют, тем большая часть хромосомы (и большее число генетических маркеров) успевает перейти в другую клетку.



Генетическая карта участка генома *E. coli*, построенная на основе конъюгативного переноса маркеров

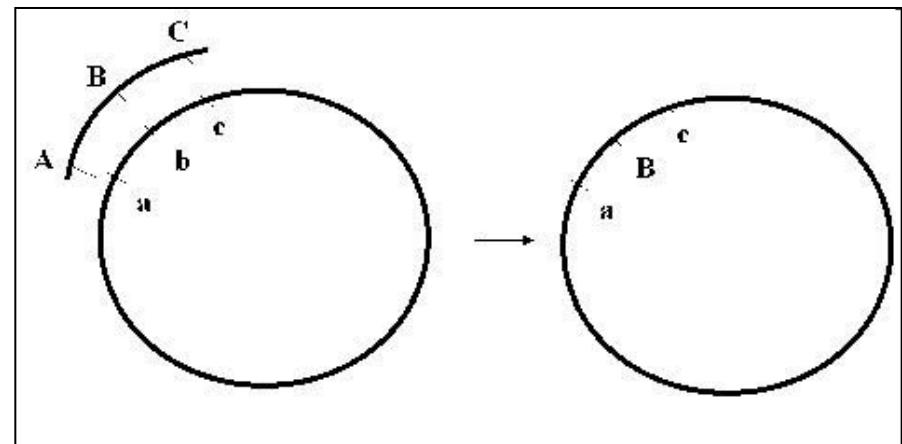


Схема трансдукции у бактерий

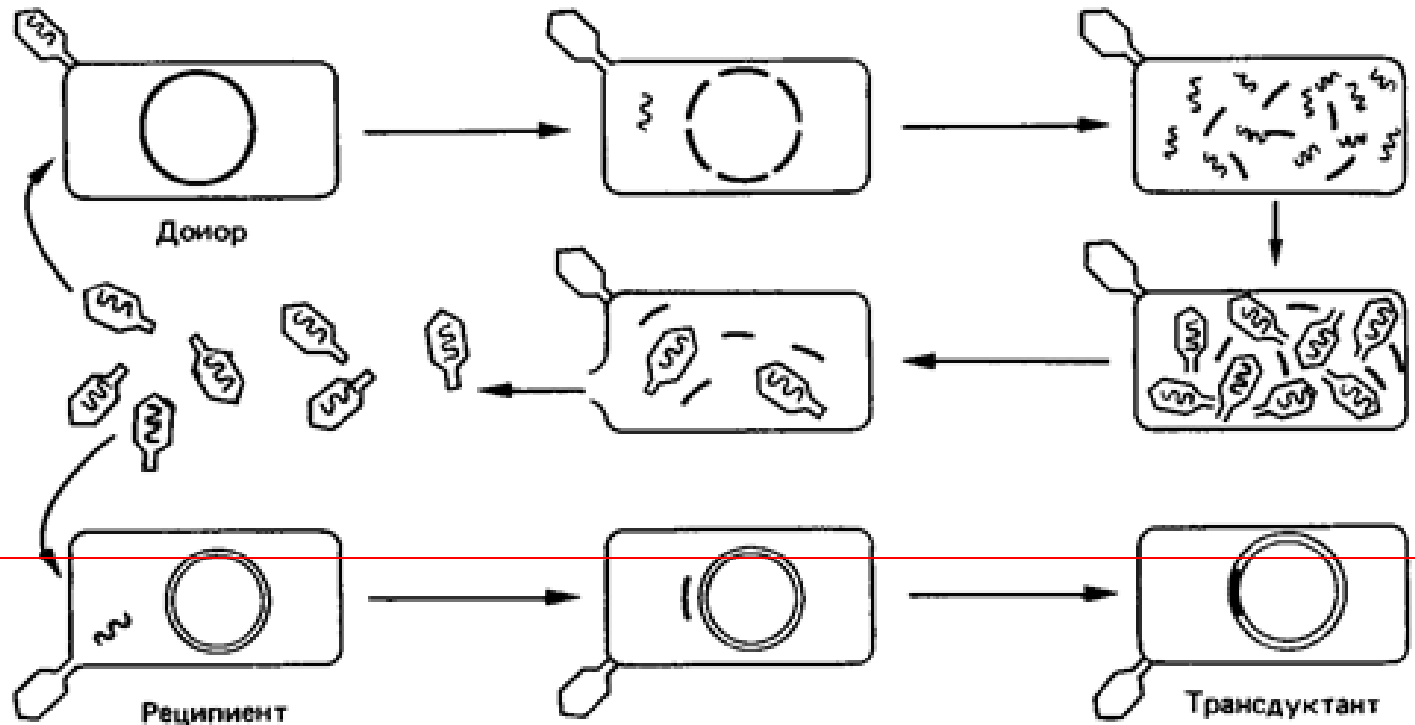
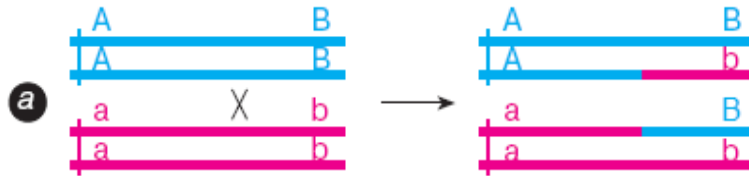


Рис. 15.19. Неспецифическая трансдукция – один из механизмов переноса ДНК из одной бактериальной клетки в другую.

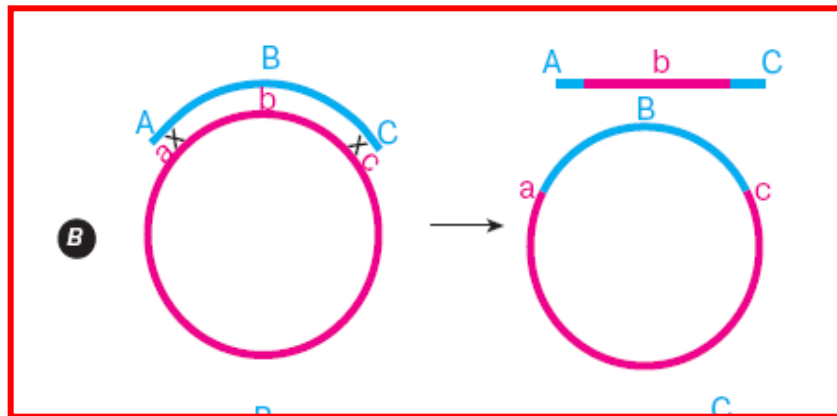
Схемы гомологичной рекомбинации



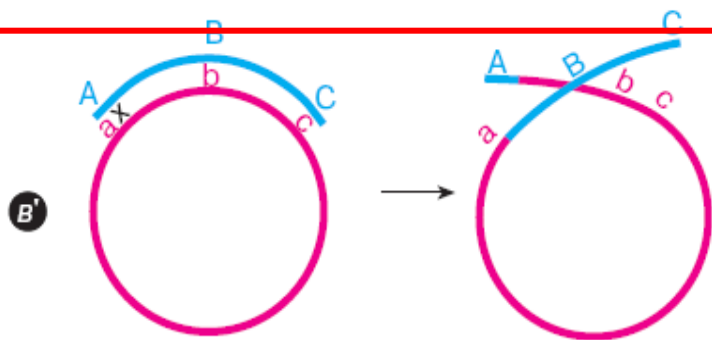
Кроссинговер в профазе I
деления мейоза



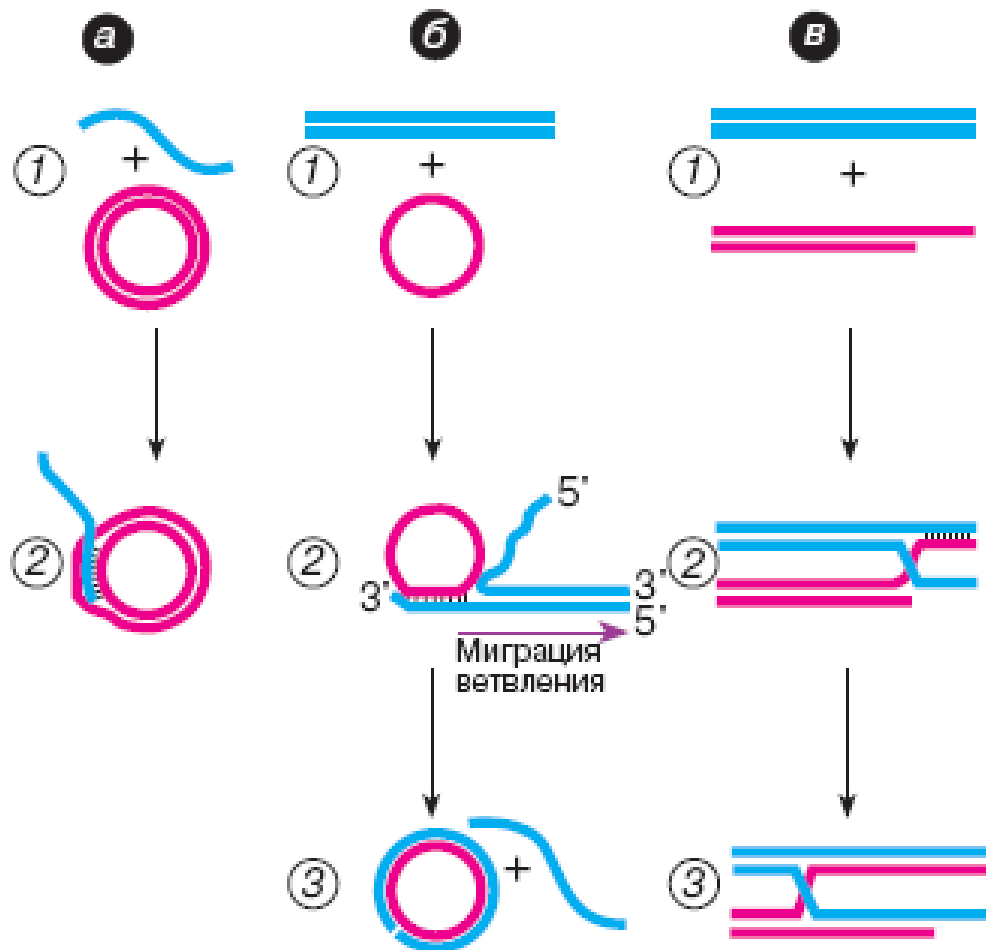
Кроссинговер в соматической
клетке на стадии G1
клеточного цикла



Кроссинговер в клетке
кишечной палочки *Escherichia coli*



Схемы трёх рекомбинационных реакций, осуществляемых белком RecA *Escherichia coli in vitro*



А – образование D-петли.
Реакция между кольцевой двухцепочечной ДНК и гомологичной одноцепочечной ДНК

Б – реакция между одноцепочечной кольцевой ДНК и гомологичным линейным дуплексом.

В – реакция между гомологичными дуплексами, один из которых имеет одноцепочечный конец.

Основная функция белка RecA - приводить во взаимодействие одноцепочечную ДНК с гомологичным дуплексом.

Стадии кроссинговера у *E. coli*.

1. Пресинаптическая

Первичное связывание RecA с ДНК.

Формирование ДНКRecA-ДНК-филамента, в котором ДНК «растянута» в 1,5 раза

2. Синатптическая

Происходят только внутри филаментов.

Взаимодействие филамента с «голой» ДНК - формирование гетеродуплекса.

Образование D-петли

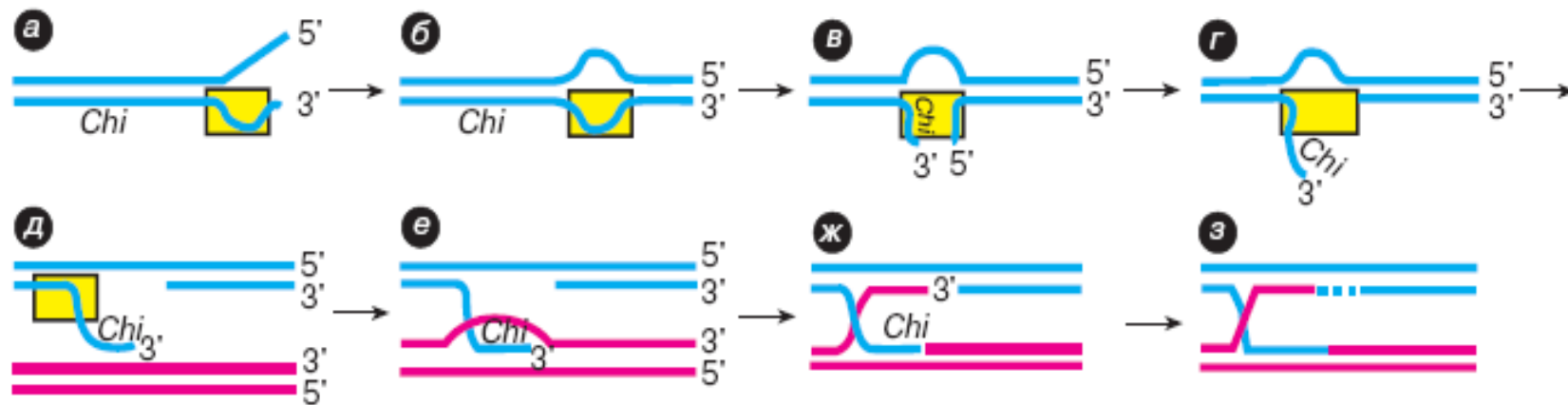
3. Постсинаптическая

Миграция ветвления

RecBCD-нуклеаза

- субъединицы кодируются генами *recA*, *recB*, *recD*
- активна в присутствии АТФ
- экзонуклеазная активность: гидролизует одно- и двухцепочечную ДНК с обоих концов
- хеликазная активность: расплетает дуплекс ДНК
- работает как сайт-специфическая эндонуклеаза: расщепляет одноцепочечную ДНК около особой 8-нуклеотидной последовательности - **Chi-сайта** (5'-GCTGGTGG-3')
- готовит субстрат для белка *RecA*

Схема рекомбинации с участием RecBCD-нуклеазы



а – фермент начинает расплетать конец дуплекса

б – в 5'-цепи возникает вторая петля

в – фермент разрывает цепь в 4-6 п. н. до Chi-сайта

г – вытеснение рекомбиногенного одноцепочечного 3'-конца

д – формирование RecA-ДНК-филамента

е – образуется закрытая D-петля

ж – D-петля разрезается эндонуклеазой, возникает полухиазма Холлидея

з – ДНК-полимераза и ДНК-лигаза ликвидируют брешь и разрывы в цепях

Ферменты репликации

RecA обеспечивает взаимодействие одноцепочечной ДНК с ГОМОЛОГИЧНЫМ ДУПЛЕКСОМ

RecBCD-нуклеаза

RuvA узнает крестообразную полухиазму и нацеливает на нее RuvB

RuvB узнает комплекс RuvA-полухиазма и осуществляет миграцию полухиазмы (работая как ДНК-хеликаза)

RuvC (резолваза) связывается с комплексом RuvB-полухиазмаи в определенный момент разрешает полухиазму

ДНК-лигаза

ДНК-гираза

ДНК-полимераза

МОДЕЛЬ РЕКОМБИНАЦИИ НА ОСНОВЕ РЕПАРАЦИИ ДВУЦЕПОЧЕЧНЫХ РАЗРЫВОВ ДНК



Эндонуклеаза ↓



5'-3'-Экзонуклеаза ↓



Синапсис
и репаративный
синтез ↓



Предложена в 1983 г.
Дж. Жостаком

а, б - специфическая эндонуклеаза вводит разрывы в обе цепи одного из дуплексов

в - 5'-концы цепей в точках разрывов гидролизуются экзонуклеазой с образованием рекомбиногенных 3'-цепей

г - 3'-цепи внедряются в другой дуплекс. Происходит репаративный синтез утраченных участков ДНК

Негомологичная рекомбинация

- группа рекомбинационных процессов, основанных на очень ограниченной гомологии между рекомбинирующими ДНК или вообще происходящих без нее.

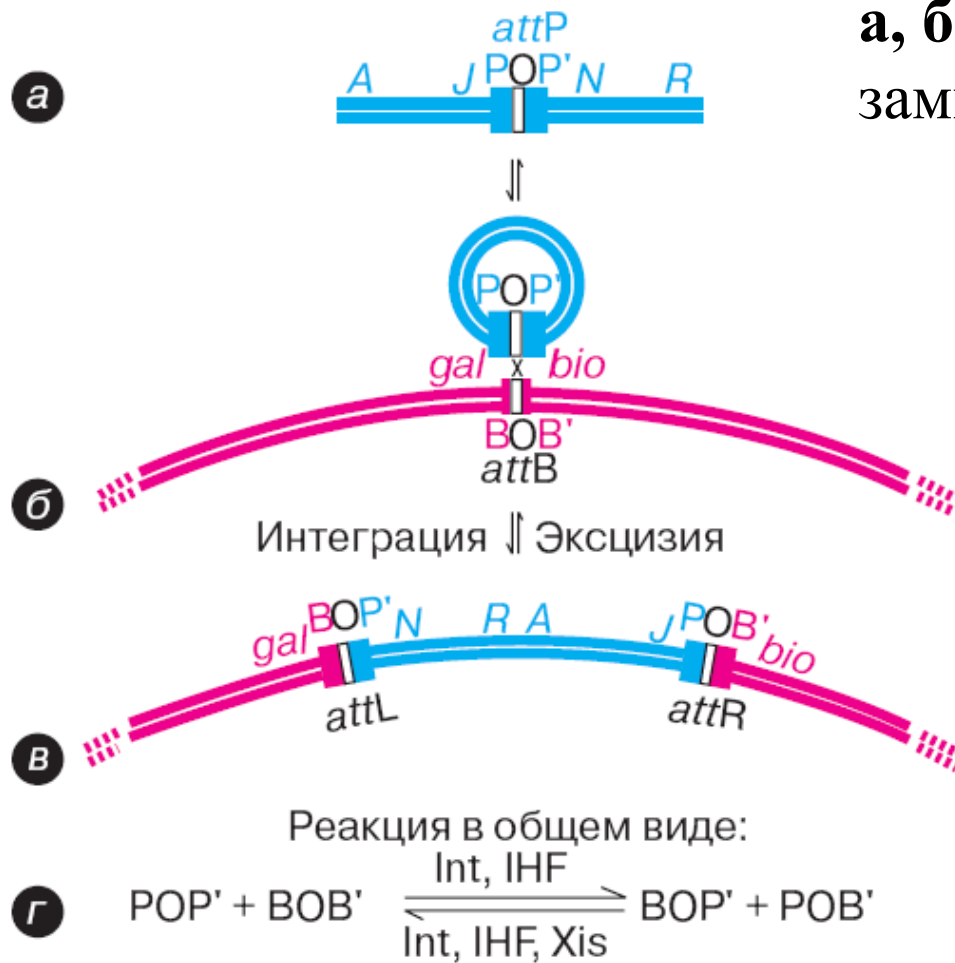
1. Сайт-специфическая рекомбинация
2. Транспозиции
3. Незаконная рекомбинация

Сайт-специфическая рекомбинация

Происходит между специфическими последовательностями ДНК в пределах очень коротких участков гомологии, обычно 15-30 п.н.

- обеспечивает интеграцию (включение) ДНК умеренных фагов в хромосомы бактерий
- обеспечивает инверсию отдельных участков ДНК в хромосомах бактерий и бактериофагов и в плазмидах дрожжей
- обеспечивает перестройки в последовательностях ДНК, кодирующих иммуноглобулины

Схема сайт-специфической рекомбинации у фага λ



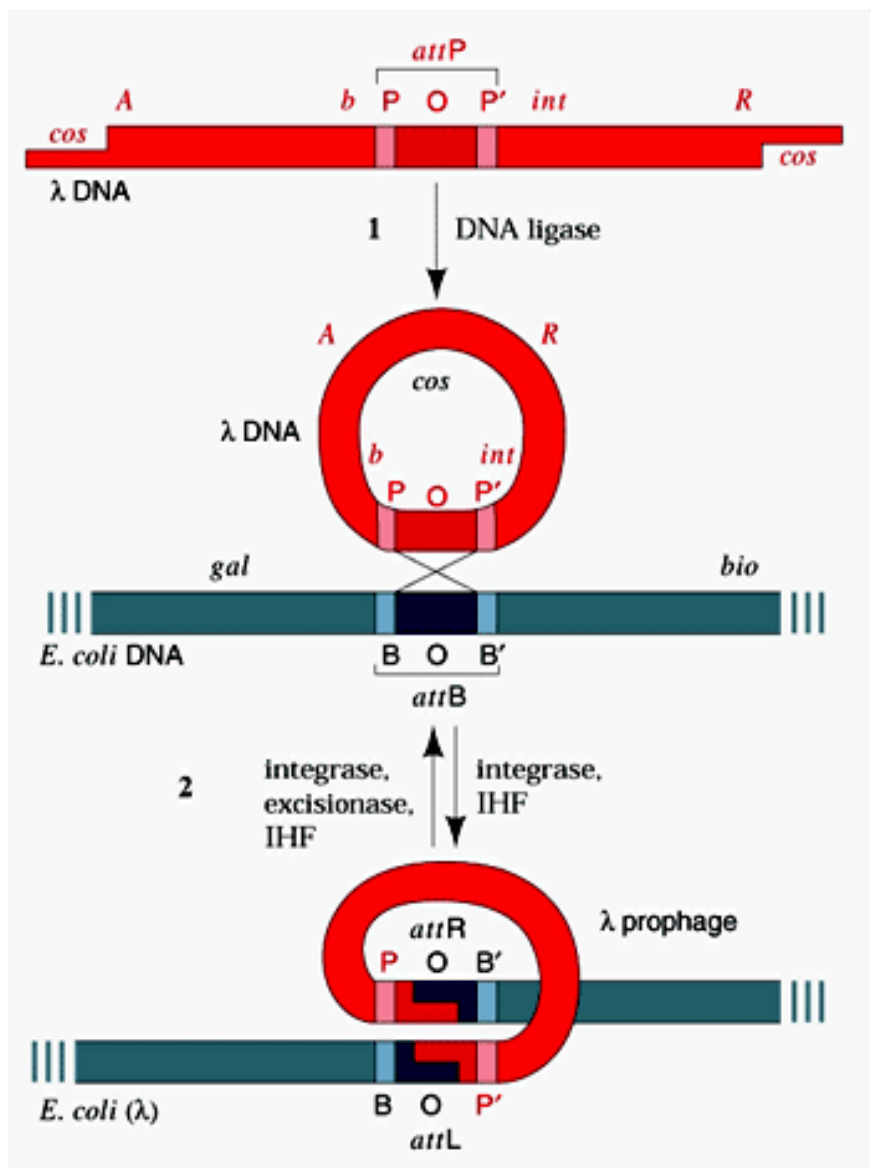
а, б - двуцепочечная ДНК фага замыкается в кольцо

б, в - интеграция ДНК фага в хромосому бактерии между генами gal и bio, путем рекомбинации между особыми att (attachment)-сайтами

в – профаг

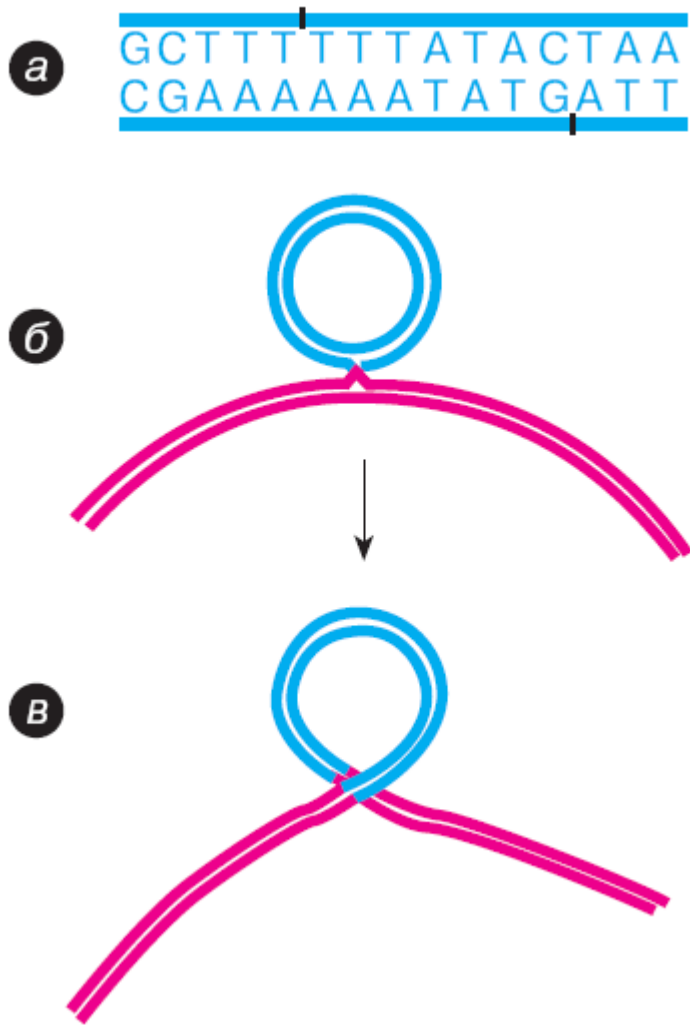
г – запись процесса рекомбинации в общем виде

Сайт-специфическая рекомбинация



Встраивание кольцевой ДНК фага λ в хромосому *E. coli* и ее обратное выщепление

Схема двух основных этапов интегративной рекомбинации у фага лямбда

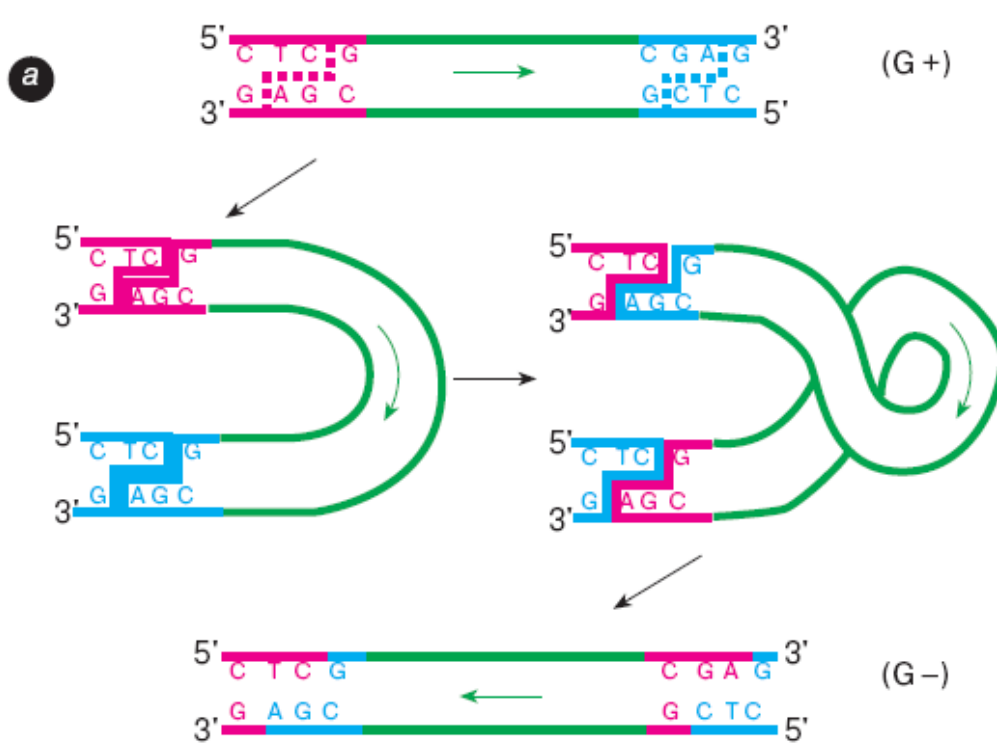


а - нуклеотидная последовательность att-сайтов в центральной части O

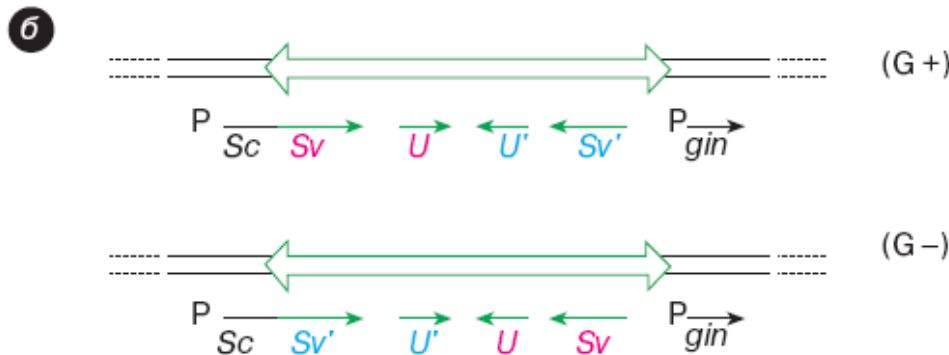
б – промежуточная структура, образовавшаяся после обмена двумя цепями ДНК одинаковой полярности в att-сайтах

в – продукт завершенной рекомбинации

Схема сайт-специфической инверсии сегмента G в ДНК фага Му



а - сегмент G содержит инвертированные повторы со специфическими рекомбинационными сайтами. Инвертаза проводит рекомбинацию между этими сайтами.



б - G-сегмент содержит четыре гена: U, U', Sv и Sv'. При одной ориентации сегмента (G+) транскрибируются гены Sv и U, при противоположной ориентации (G-) функционируют гены Sv' и U.

Транспозиции

Лежат в основе передвижения подвижных (мобильных) генетических элементов.

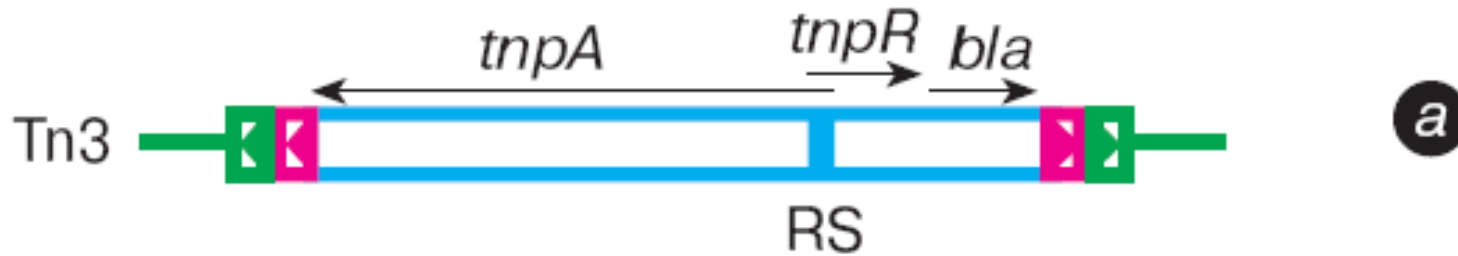
Подвижные элементы - это особые последовательности ДНК, способные к перемещениям из одного участка молекулы ДНК (хромосомы или плазмиды) в другой, или в другую молекулу в той же клетке, или даже в клетки другого организма.

Подвижные элементы, как правило, не существуют автономно, а находятся в составе хромосом или плазмид.

Главный белок транспозиции – транспозаза.

Структурная организация некоторых подвижных элементов

а – бактериальный транспозон Tn3.



б – бактериальный транспозон Tn5.

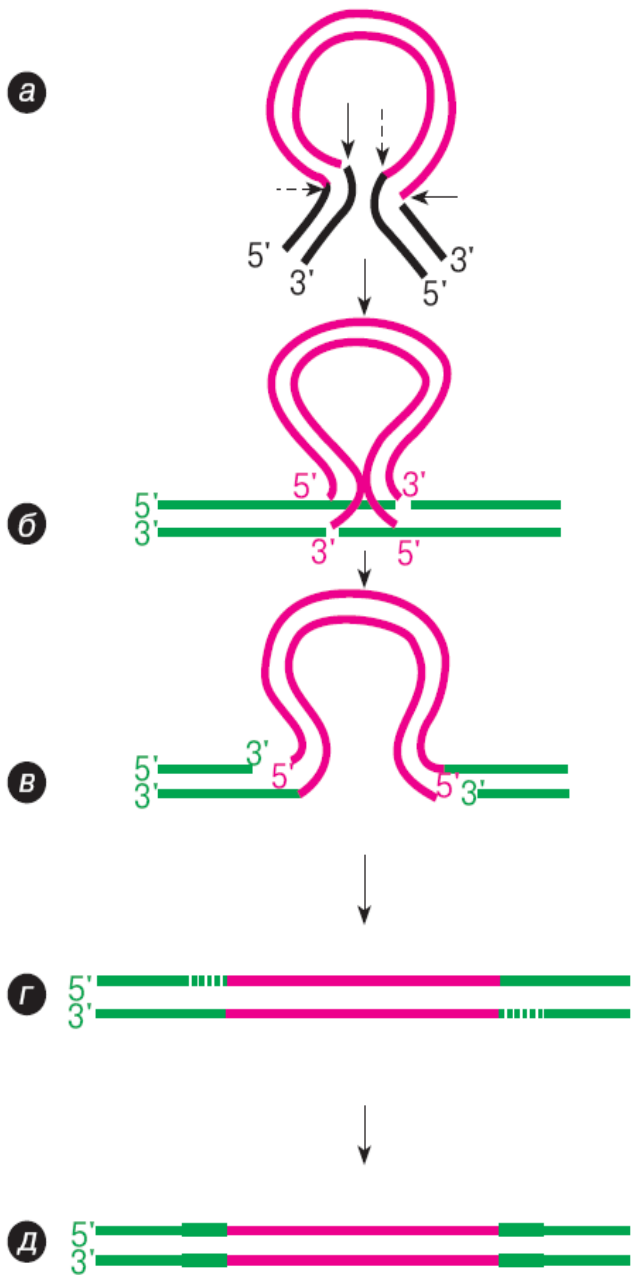


в – дрожжевой ретротранспозон Ty1.



Синим обозначена центральная часть элементов, красным - обращенные концевые повторы бактериальных подвижных элементов, зеленым - прямые повторы ДНК-мишени.

Общая схема рекомбинационных реакций при транспозициях



а - транспозаза (у ретротранспозонов - интеграз) сводит вместе концы подвижного элемента и делает разрывы точно по этим концам

б - транспозаза сводит в контакт концы элемента и дуплекс ДНК-мишени. При этом она делает в обеих цепях ДНК-мишени ступенчатые разрывы

в - обмен цепями, приводящий к рекомбинации между ДНК элемента и мишени, остаются бреши

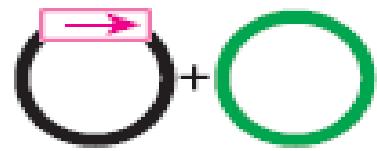
г - бреши заполняются путем репаративной репликации ДНК по матрице ДНК-мишени

д - возникновение прямых повторов ДНК-мишени на концах элемента

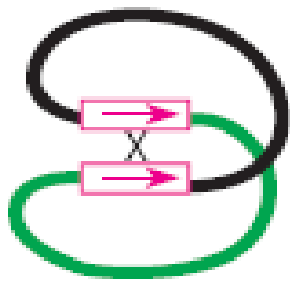
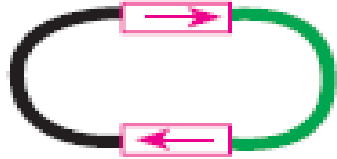
Выделяют три основных механизма рекомбинации при транспозициях:

- репликативная транспозиция
- нерепликативная транспозиция
- перемещение ретротранспозонов

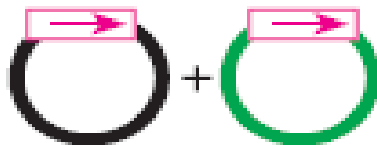
Репликативная транспозиция



коинтеграт



резолваза

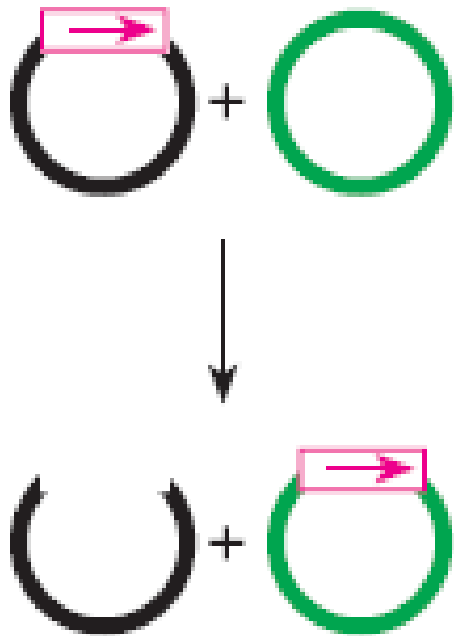


Подвижный элемент, перемещаясь в другую молекулу, оставляет свою копию в исходной ДНК.

Обнаружена у фага М₁ и бактериальных транспозонов семейства Tn3 с короткими обращенными повторами.

Нерепликативная транспозиция

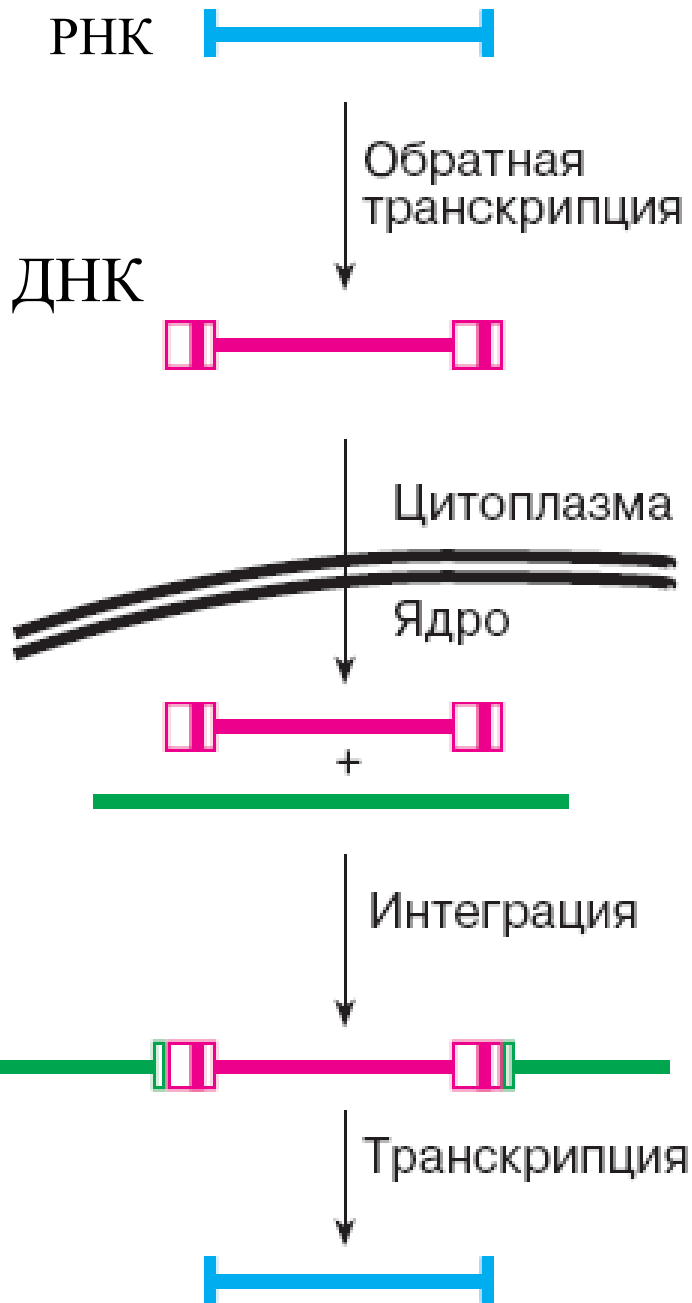
Заключается в вырезании элемента и его перемещении в новое место.



Характерна для большинства подвижных элементов бактерий и эукариотических элементов с короткими обращенными повторами

Перемещение ретротранспозонов

Ген *pol* ретротранспозона кодирует несколько ферментов: интегразу, обратную транскриптазу, РНКазуН и протеазу.



Незаконная рекомбинация

Сборная группа процессов, где рекомбинация происходит без гомологии между молекулами ДНК, и при этом без участия механизмов сайт-специфической рекомбинации или транспозиций. Общим для них является соединение концов негомологичных молекул ДНК.

- захват ретровирусом некоторых клеточных генов при его эксцизии из хромосомы хозяйской клетки
- интеграция фрагментов ДНК, вводимых в клетки позвоночных с помощью микроинъекций

Впервые описана японским исследователем Х. Икедой с сотрудниками в 1982 году.

