

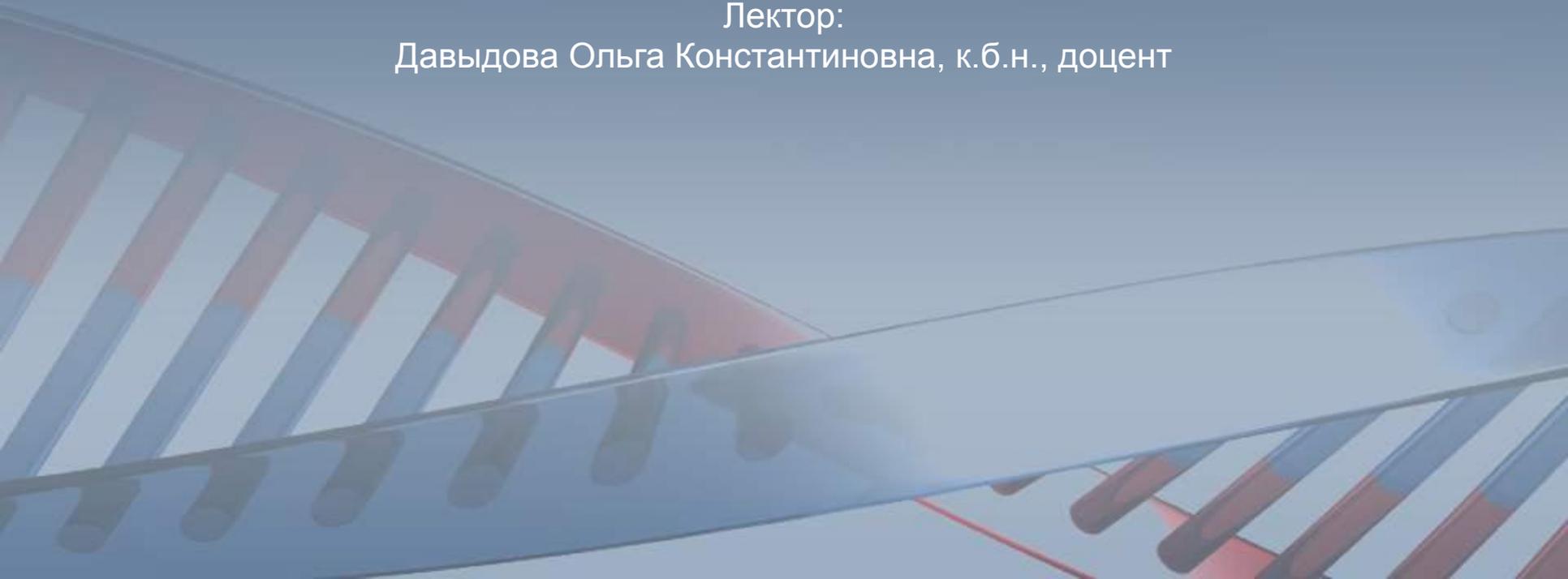
Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное бюджетное государственное образовательное учреждение
высшего образования «Оренбургский государственный университет»
Химико-биологический факультет
Кафедра биохимии и микробиологии

Механизмы рекомбинации

Лекция №6

Лектор:

Давыдова Ольга Константиновна, к.б.н., доцент



План лекции:

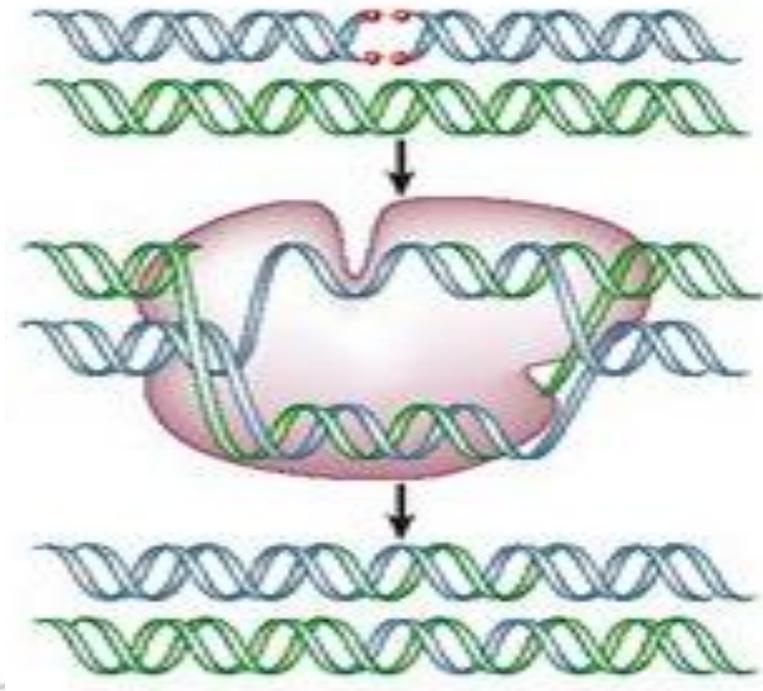
- Типы генетической рекомбинации.
- Общая (гомологичная) рекомбинация.
 - Разрыв и воссоединение нитей ДНК.
 - Ассимиляция нитей.
 - Образование гетеродуплексной области.
 - Структуры Холлидея.
 - Энзимология процесса рекомбинации.
 - Роль нуклеазы RecBCD
 - Белок RecA и условия рекомбинации.
 - Функция белков RuvABC.
- Сайт-специфическая рекомбинация.
 - Гены, контролирующие интеграцию и эксцизию.
 - Молекулярные механизмы процесса.
- Незаконная рекомбинация

Типы рекомбинации

- **Рекомбинация** – возникновение новых последовательностей ДНК за счёт разрывов и перевоссоединения предшествующих молекул
- Рекомбинация также создает разнообразие комбинаций генов, обеспечивающих высокий уровень наследственной изменчивости, что, в свою очередь, позволяет популяции лучше адаптироваться в ходе эволюции

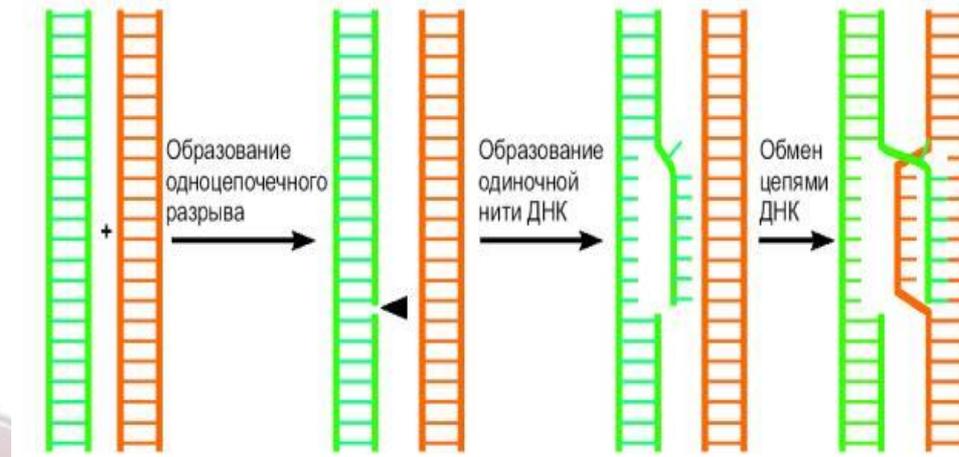
может происходить у эукариот, у бактерий и даже при размножении вирусов, в том числе таких, генетический материал которых состоит из РНК

- Общая или гомологичная
- Сайт-специфическая
- Случайная или незаконная



Гомологичная рекомбинация (1903/1919)

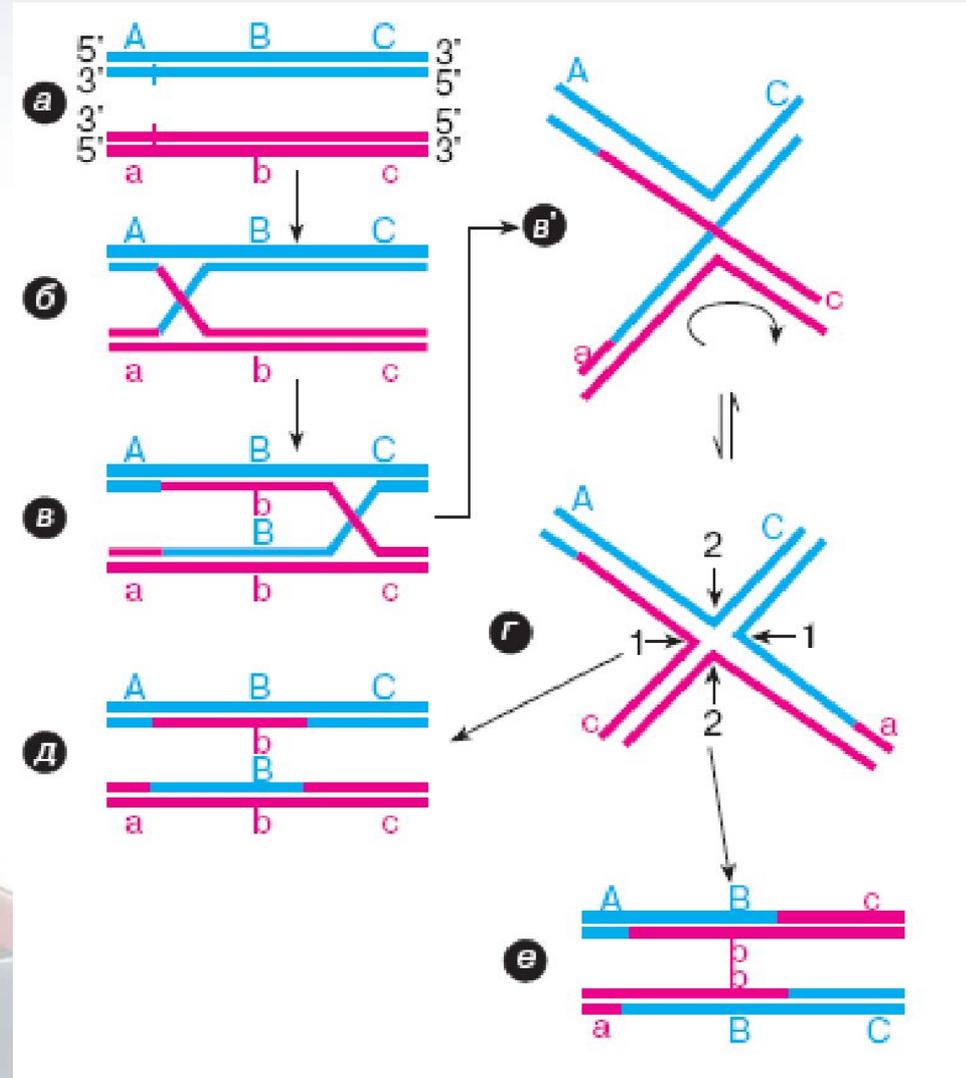
- - обмен участками между гомологичными молекулами ДНК
- Новых последовательностей не создаётся, а перетасовываются уже имевшиеся сходные варианты одной и той же последовательности при участии большого набора специальных белков



- Возникновение в одном или обоих дуплексах участков из одиночных цепей ДНК, которые затем с помощью специальных белков находят комплементарные последовательности в гомологичном дуплексе;
- Образование гетеродуплекса- ключевого промежуточного продукта (интермедиата) рекомбинации;
- Обмен равными частями гомологичных молекул

Структура Холлидея

- **Структура Холлидея** — структура из четырёх цепей нуклеиновых кислот, соединённых друг с другом водородными связями с образованием четырёх двуцепочечных ветвей
- Эти ветви могут принимать несколько различных конформаций в зависимости от концентрации солей в окружающем буферном растворе и последовательности нуклеотидов, располагающихся в непосредственной близости от точки соединения
- Структура названа в честь английского молекулярного биолога Робина Холлидея, который предположил её существование в 1964 году



Структура Холлидея

- Робин Холлидей (1932—2014) предположил структуру соединения, как часть своей модели гомологичной рекомбинации, разработанной на его исследованиях *Saccharomyces cerevisiae*.
- Холлидей понял, что в ходе кроссинговера должны образовываться гетеродуплексы ДНК с некоторыми неспаренными основаниями ввиду небольших различий между вариантами (аллелями) одного гена.
- В 1975 году Метью Мезельсон и Чарли Рэддинг обновили модель и ввели идею миграции цепей.
- Первое экспериментальное доказательство существования соединений Холлидея было получено в конце 1970-х годов при помощи электронной микроскопии, где на изображениях ДНК плазмид и бактериофагов были отчётливо видны структуры из четырёх цепей.
- В 1980-е годы были идентифицированы ферменты, отвечающие за инициацию образования соединений Холлидея и связывание с ними.
- В 1983 году Надриан Симэн впервые получил искусственные структуры Холлидея из синтетических олигонуклеотидов.

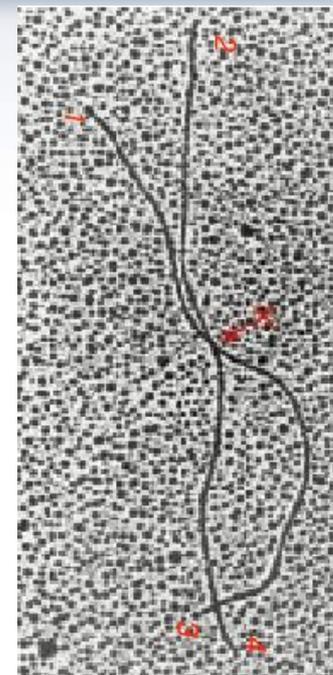
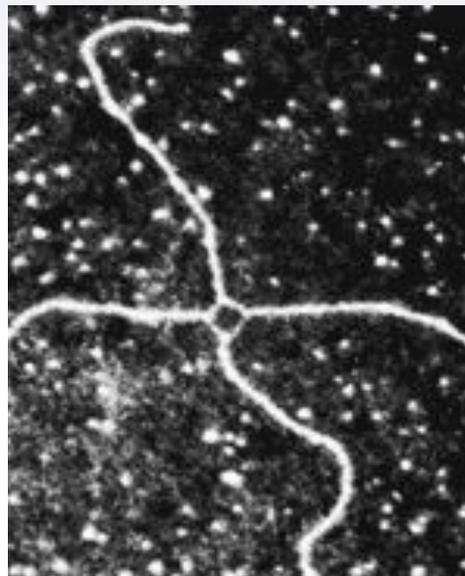


©

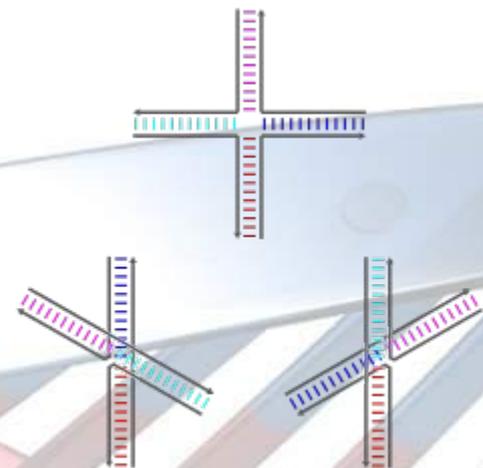
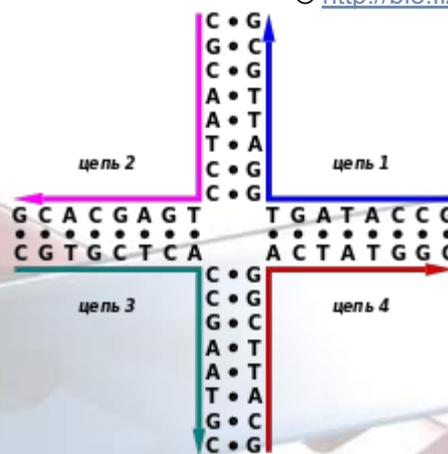
https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%82%D1%83%D1%80%D0%B0_%D0%A5%D0%BE%D0%BB%D0%BB%D0%B8%D0%B4%D0%B5%D1%8F

Структура Холлидея или полухиазма

- - промежуточное соединение, где происходит комплементарное спаривание между одноцепочечными участками, принадлежащими разным родительским цепям ДНК.
- Образуются гетеродуплексные районы.
- Полухиазма может перемещаться вдоль цепи ДНК.
- Изображения полухиазм получены в электронном микроскопе

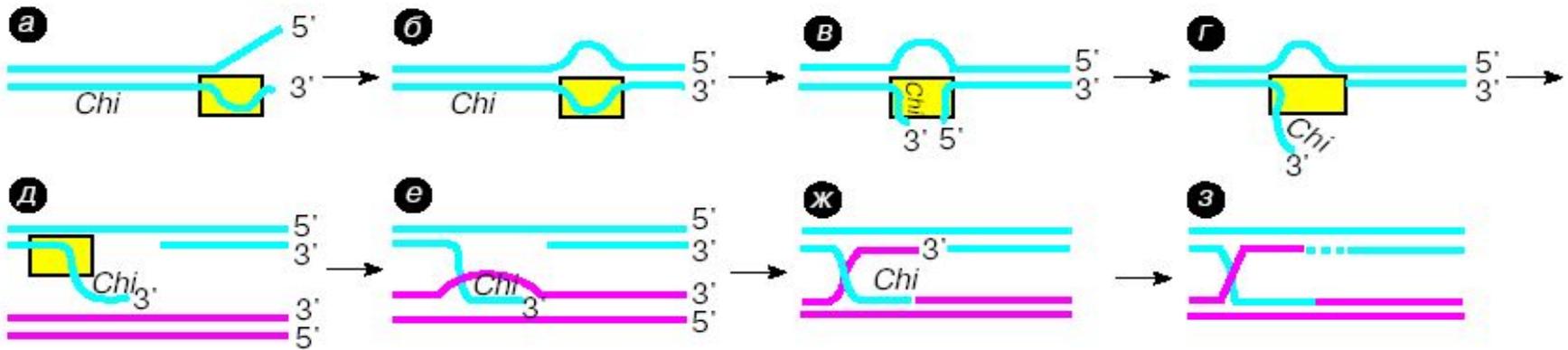


© http://bio.fizteh.ru/student/files/biology/bioarticles/f_5ai2



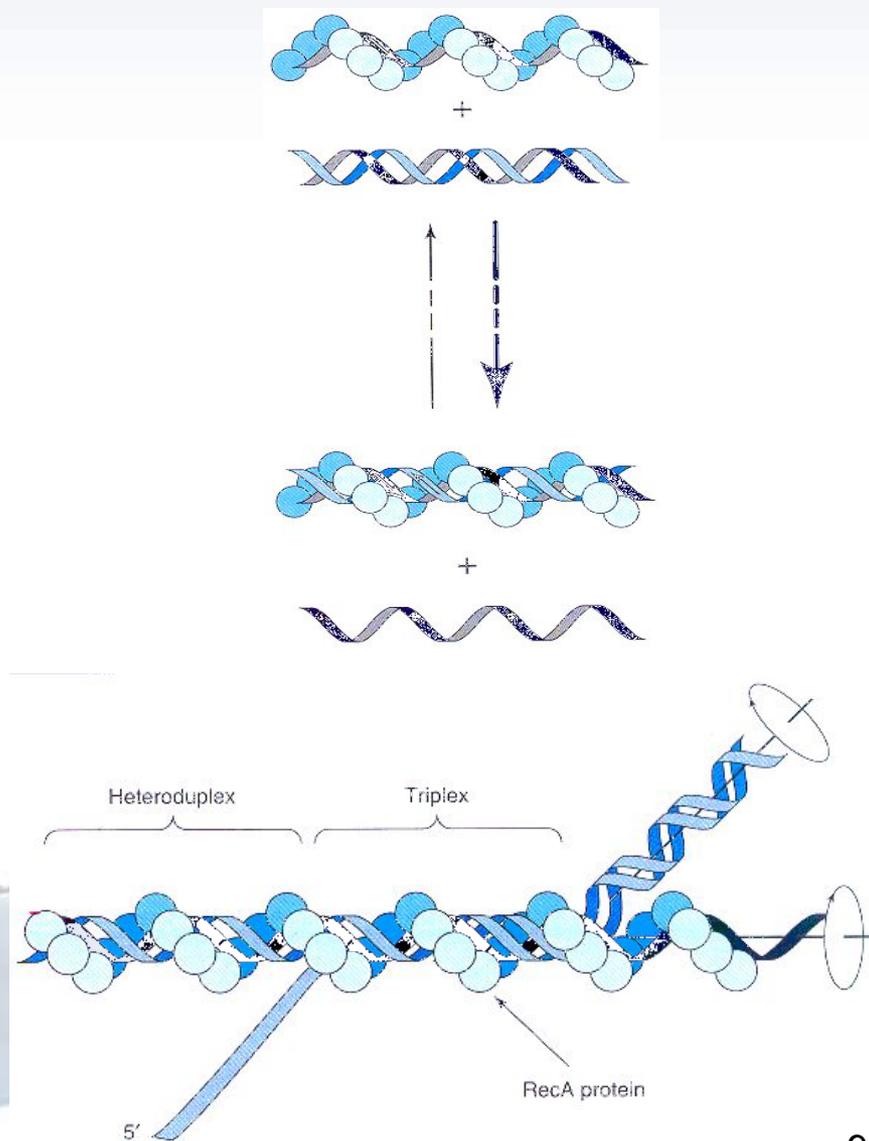
Ферменты рекомбинации

- **RecBCD-нуклеаза**, состоящая из 3 субъединиц (RecB, RecC и RecD), связывается с концом двухцепочечной ДНК и «расстёгивает» ее
- RecBCD может гидролизовать одно- и двухцепочечную ДНК, имеет также хеликазную активность: RecD — быстрая хеликаза, сидящая на 5'-цепи, а хеликаза RecB медленнее и сидит на 3'-цепи
- Продвигается вдоль ДНК до **Chi-сайта** - особой 8-нуклеотидной последовательности (5'-GCTGGTGG-3'), разрывает 3'-цепь
- Образуется одноцепочечная ДНК (D-петля)
- **RecA** формирует филамент, **SSB-белок** выпрямляет одноцепочечную ДНК
- D-петля разрезается с помощью одной из эндонуклеаз *E. coli*, что приводит к полухиазме Холлидея
- RecBCD удаляет 5'-конец
- **ДНК-полимераза и ДНК-лигаза** застраивают бреши и разрывы.



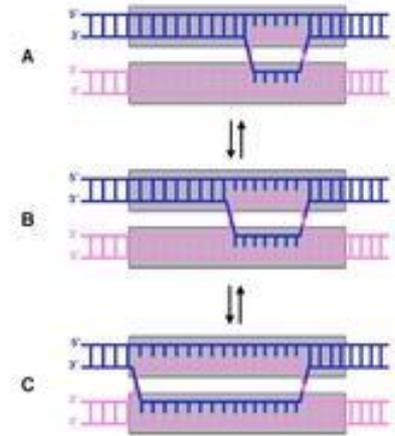
Стадии рекомбинации

- RecA-белок связывается с одноцепочечной ДНК, образуя RecA-ДНК-филамент.
- Приводит во взаимодействие одноцепочечную ДНК с гомологичными дуплексами.
- Наличие двух сайтов связывания с ДНК.
- Удаление гетеродуплекса путём миграции ветвления



Стадии рекомбинации

- Последующие этапы - миграцию ветвления и разрешение полухиазмы осуществляют белки: RuvA, RuvB и RuvC - продукты генов *ruvA*, *ruvB* и *ruvC*.
- **RuvA узнает** крестообразную полухиазму и нацеливает на нее RuvB.
- **RuvB** узнает комплекс RuvA-полухиазма и, используя энергию АТФ и работая как ДНК-хеликаза, осуществляет **миграцию** полухиазмы в том же направлении, что и RecA-белок *in vitro*.
- Резолваза **RuvC** узнает комплекс RuvB-полухиазма, связывается с ним. На этом **миграция** полухиазмы **прекращается**.



Процесс миграции ветвей сопровождается перемещением точки ветвления

https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%82%D1%83%D1%80%D0%B0_%D0%A5%D0%BE%D0%BB%D0%BB%D0%B8%D0%B4%D0%B5%D1%8F

Стадии рекомбинации

Homologous recombination
Necessary ingredients

RecA protein
Binds to single stranded DNA

RecBCD protein
Separates double strands of DNA (helicase activity)
Degrades nucleotides (exonuclease activity)

DNA ligase
Repairs nicked DNA

ATP

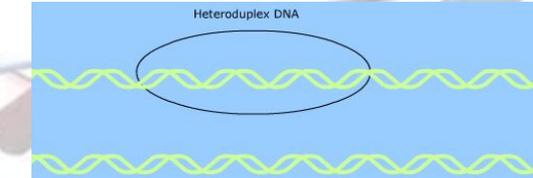
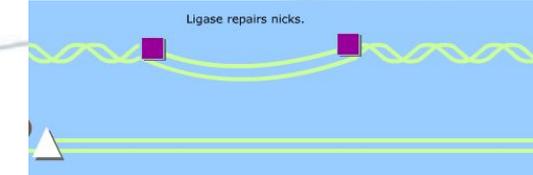
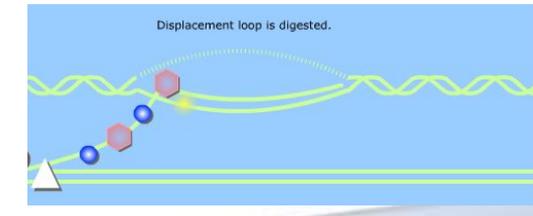
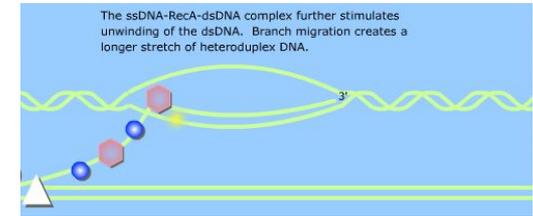
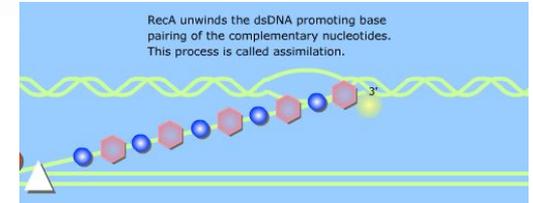
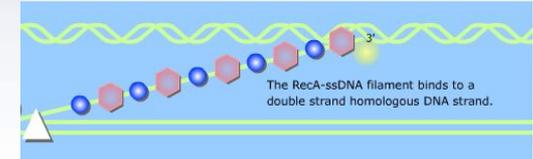
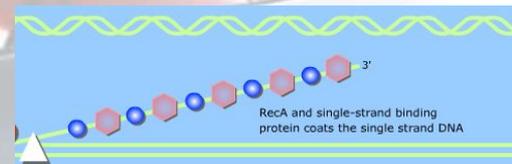
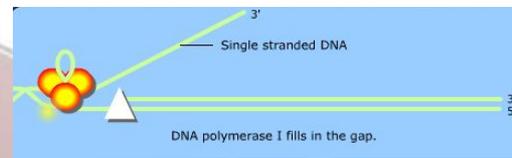
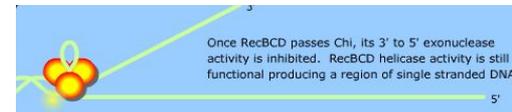
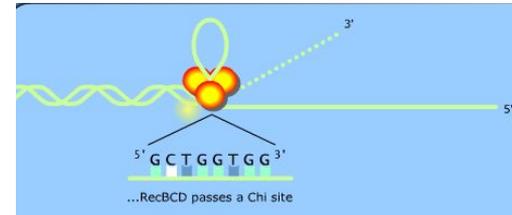
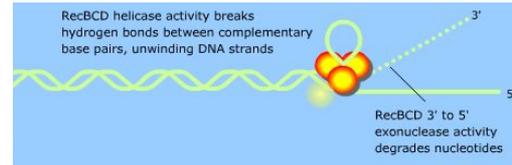
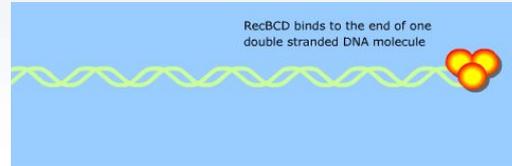
DNA polymerase I
Repairs gaps in DNA

Single stranded DNA binding protein (SSB)
Protects single stranded DNA

Chi sequence
5' GCTGGTGG 3'
Recognized by RecBCD protein

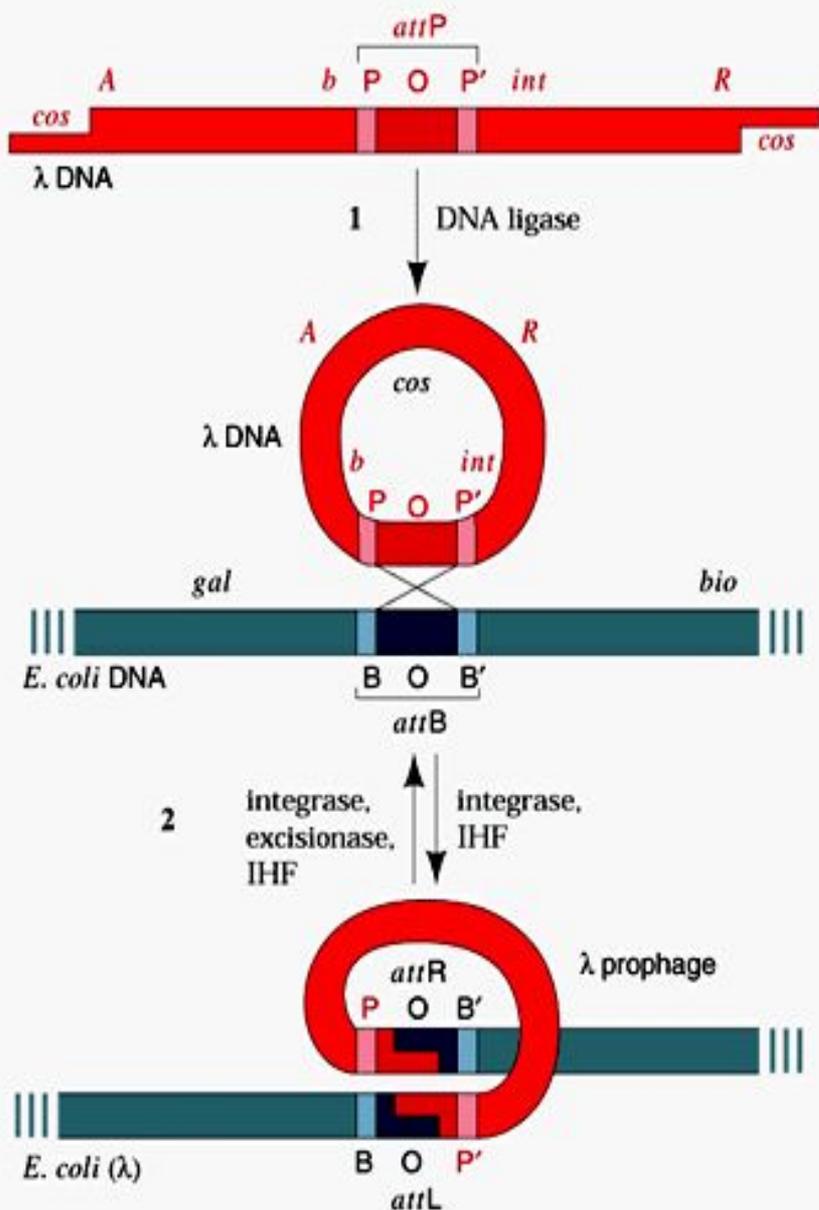
Continue

Fundamental Bacterial Genetics
Trun & Trempey
Blackwell Science Publishers



Сайт-специфическая рекомбинация бактериофага λ

- Происходит между специфическими сегментами дуплексов ДНК, не имеющими протяженных гомологичных участков.
- Фермент распознает специфические последовательности ДНК, чья рекомбинация катализируется. Эти интегразы не формируют сочленения гетеродуплекса. Вместо этого они образуют надрезы с обоих концов линейной последовательности и затем катализируют взаимодействие этих концов ДНК с ДНК – мишенью, разрывая в ней фосфодиэфирные связи.
- Характерным примером такой рекомбинации служит встраивание кольцевой ДНК фага λ в хромосому *E. coli* и ее обратное выщепление.
- При интегрировании ДНК фага лямбда в хромосому *E. coli* в случае лизогенного пути развития фага происходит образование сложно структурированного нуклеопротеинного комплекса, т.н. **интасомы**.



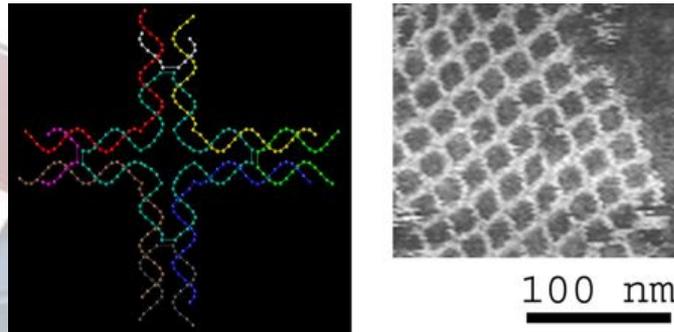
Рекомбинация происходит в пределах специфической нуклеотидной последовательности ДНК фага λ (*attP*-сайт) и уникальной последовательности ДНК *E. coli* (*attB*-сайт). Нуклеотидные последовательности *attP*- и *attB*-сайтов совершенно различны, хотя имеют общее ядро (*O*) протяженностью в 15 нуклеотидных пар. *AttP* (*POP'*) простирается на 150 нуклеотидов влево (*P*) и на 75 нуклеотидов вправо (*P'*) от общего ядра, а *attB* (*BOB'*) – это сегмент длиной всего около 25 нуклеотидов, включая и ядро. Поскольку нуклеотидные последовательности, фланкирующие *attP*- и *attB*-сайты слева (*attL*) и справа (*attR*), для этих сайтов различаются, механизм рекомбинационного выщепления ДНК фага λ из ДНК *E. coli* должен отличаться от механизма их рекомбинационной интеграции. Для рекомбинации между *attL* и *attR* при исключении фаговой ДНК помимо белка *Int* необходимы фаговый белок *xis* и клеточный белок *HF*. Процесс рекомбинационного выщепления, по-видимому, имеет некоторое сходство с процессом интеграции, но роль указанных трех белков, особенно белка *xis*, все еще изучается.

Незаконная рекомбинация

- - рекомбинация между негомологичными нуклеотидными последовательностями происходит в клетках прокариот и дрожжей достаточно редко, а в клетках млекопитающих – весьма часто.
- К негомологичной рекомбинации можно отнести процесс случайного встраивания вирусной или плазмидной ДНК в ДНК клеток животных, в результате чего в реплицирующихся геномах появляется множество делеций и дупликаций.

Заключение

- Микроорганизмам свойственны генетические рекомбинации, которые определяются прежде всего способом размножения и закономерностями передачи генетического материала. В связи с тем, что прокариотам не присуще половое размножение, рекомбинация у них происходит в результате внутригеномных перестроек, заключающихся в изменении локализации генов в пределах хромосомы, или при проникновении в клетку реципиента части ДНК донора
- Таким образом, генетическая рекомбинация – это перераспределение материала между молекулами или внутри молекулы ДНК, приводящее к появлению новых комбинаций генов или других нуклеотидных последовательностей
- Неподвижные структуры Холлидея с несимметричными последовательностями, которые фиксируют структуру в строго определённом положении, были созданы искусственно с целью изучения их структуры. Позднее такие структуры нашли применение в качестве основных строительных структурных блоков в ДНК-нанотехнологиях: несколько структур Холлидея могут быть собраны в единую конструкцию с определённой геометрией



Слева: модель плитки из ДНК, используемая для создания другой двумерной периодической решётки. Справа: микрофотография собранной решётки https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9D%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D1%82%D0%B5%D1%85%D0%BD%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D0%B8_%D0%BD%D0%B0_%D0%BE%D1%81%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B5_%D0%94%D0%9D%D0%9A