

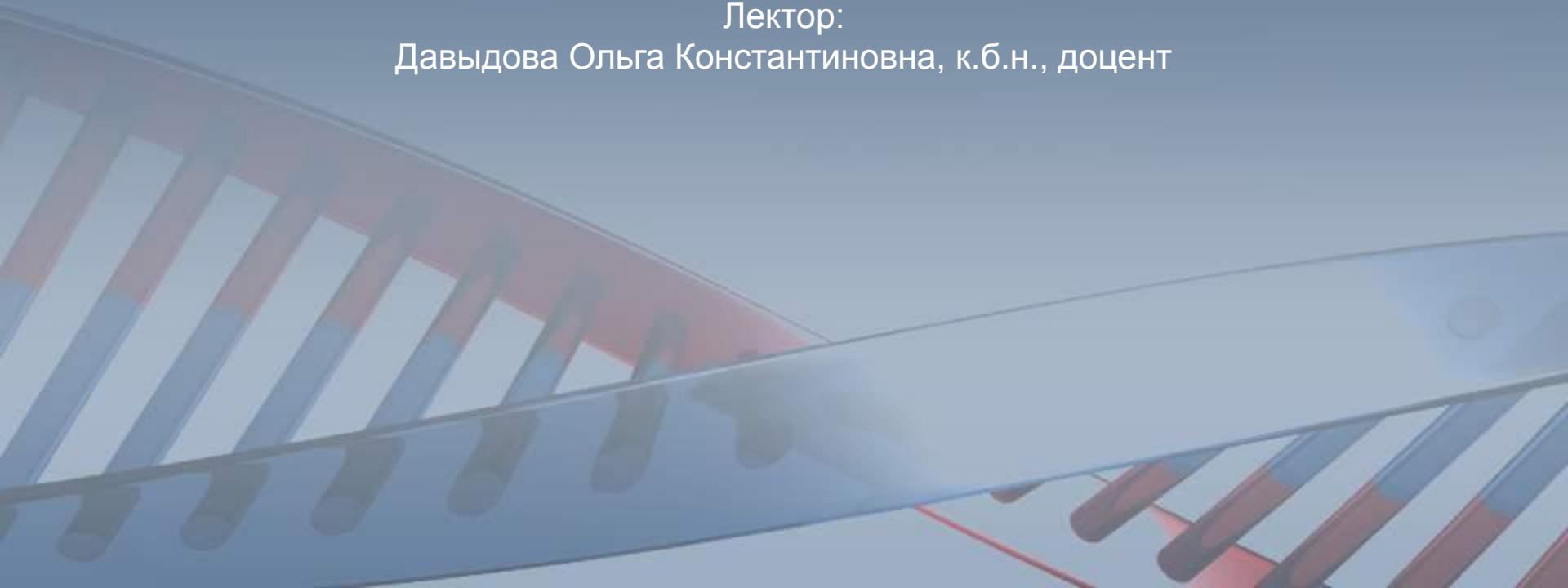
Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное бюджетное государственное образовательное учреждение
высшего образования «Оренбургский государственный университет»
Химико-биологический факультет
Кафедра биохимии и микробиологии

Механизмы рекомбинации

Лекция №6

Лектор:

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



План лекции:

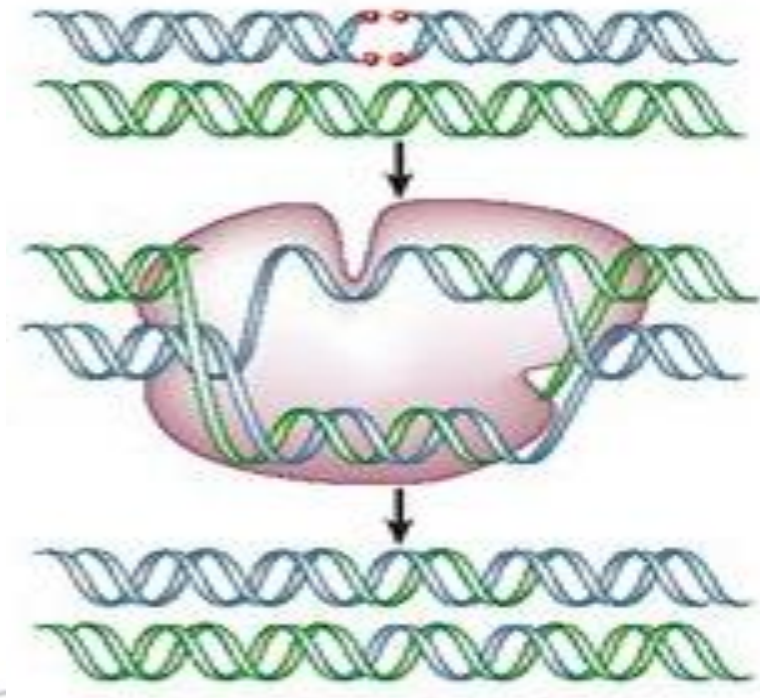
- Типы генетической рекомбинации.
- Общая (гомологичная) рекомбинация.
 - Разрыв и воссоединение нитей ДНК.
 - Ассимиляция нитей.
 - Образование гетеродуплексной области.
 - Структуры Холлидея.
 - Энзимология процесса рекомбинации.
 - Роль нуклеазы RecBCD
 - Белок RecA и условия рекомбинации.
 - Функция 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

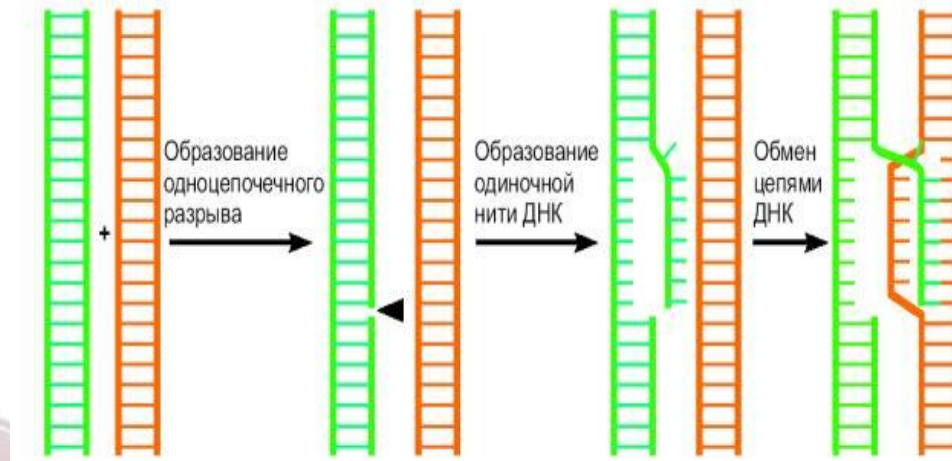
может происходить у эукариот, у бактерий и даже при размножении вирусов, в том числе таких, генетический материал которых состоит из РНК

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



Гомологичная рекомбинация (1903/1919)

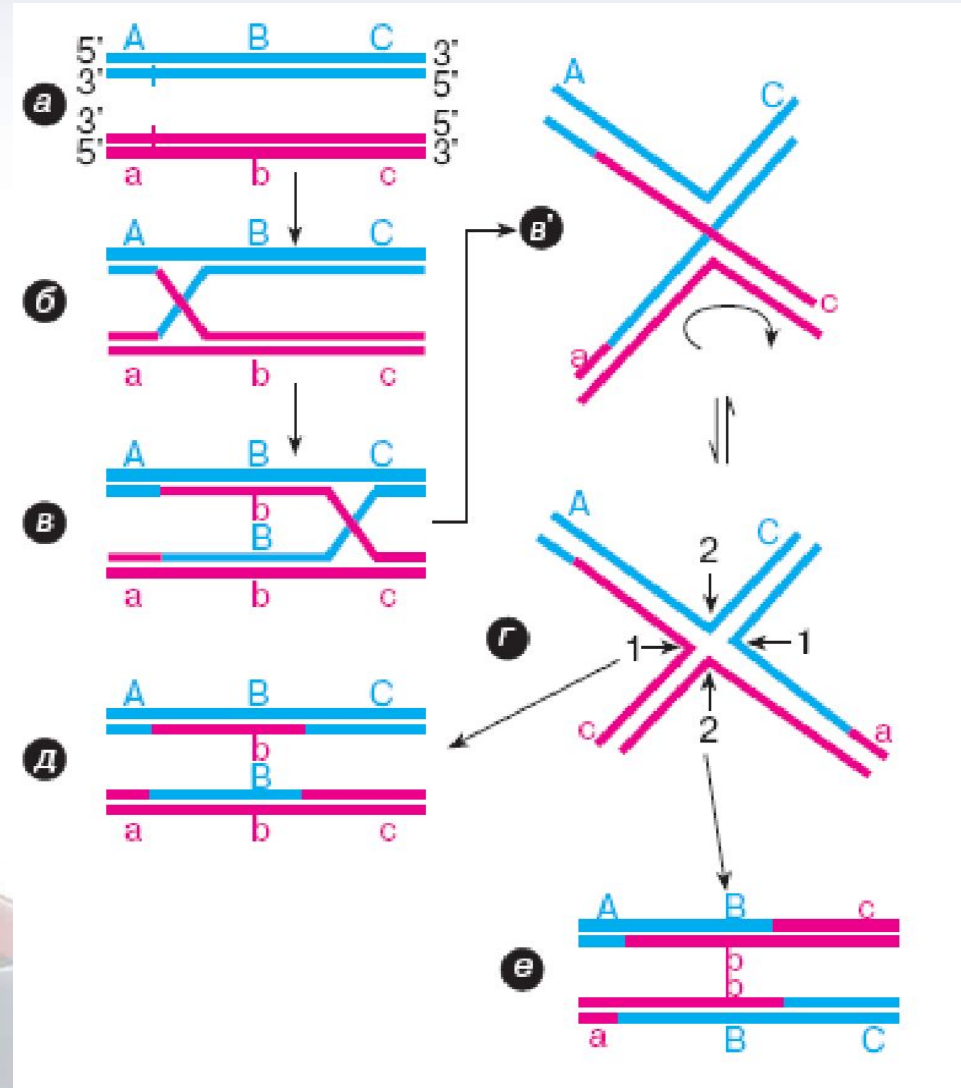
- - обмен участками между гомологичными молекулами ДНК
- Новых последовательностей не создаётся, а перетасовываются уже имевшиеся сходные варианты одной и той же последовательности при участии большого набора специальных белков



- 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.

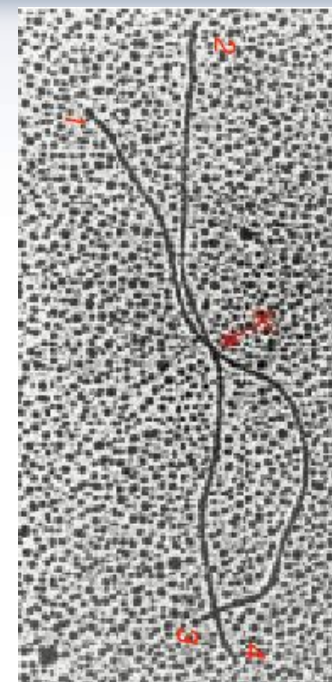
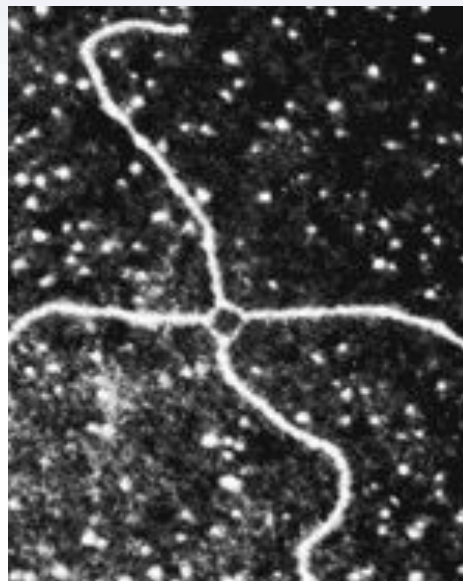


©

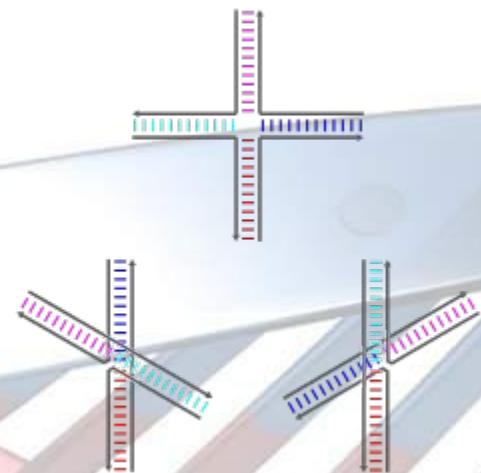
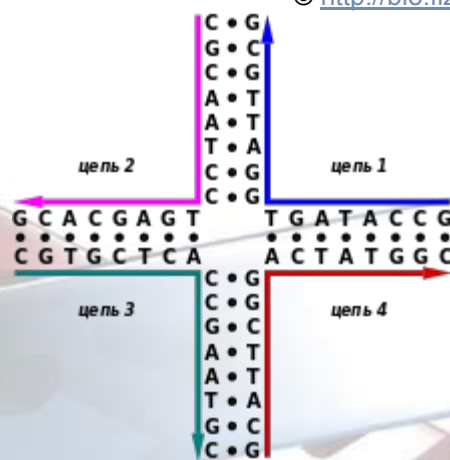
https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%82%D1%83%D1%80%D0%B0_%D0%A5%D0%BE%D0%BB%D0%BB%D0%B8%D0%B4%D0%B5%D1%8F

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

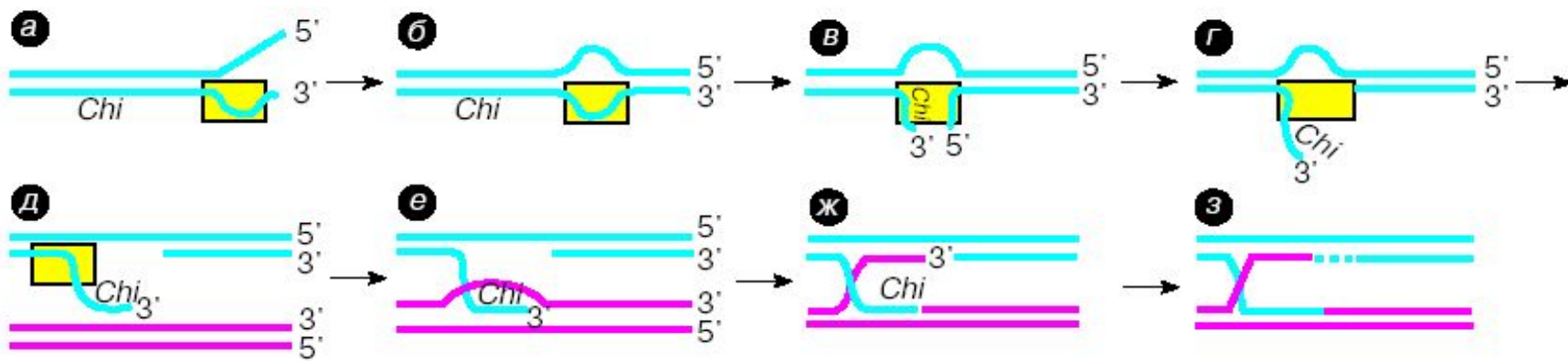


© http://bio.fizteh.ru/student/files/biology/bioarticles/f_5ai2



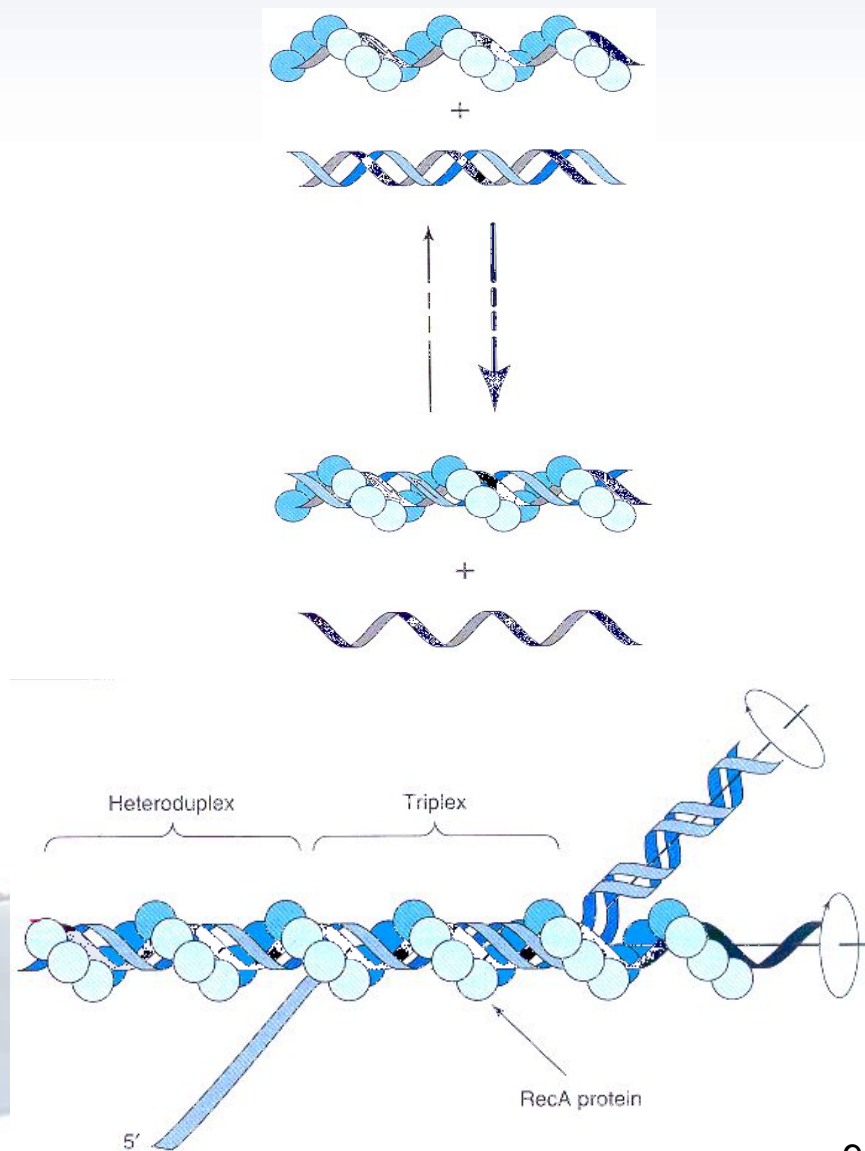
Ферменты рекомбинации

- **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.



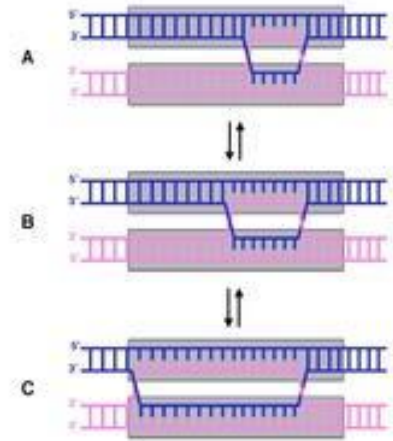
Стадии рекомбинации

- 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

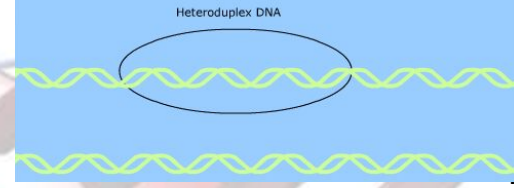
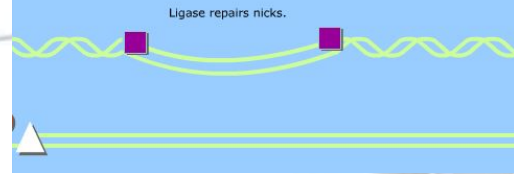
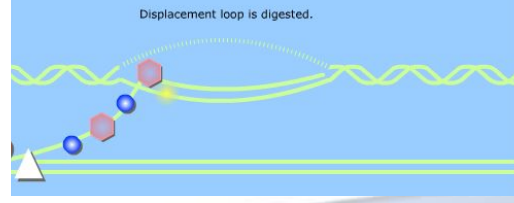
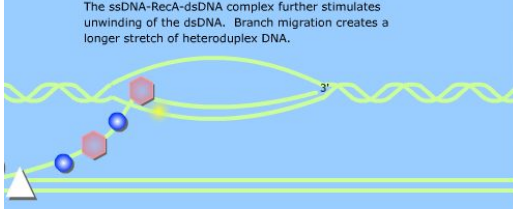
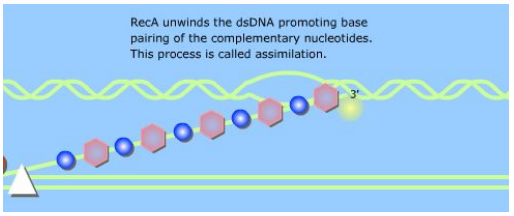
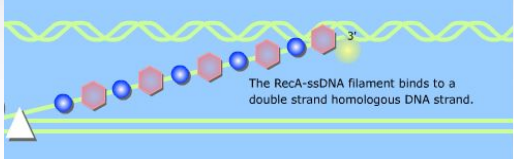
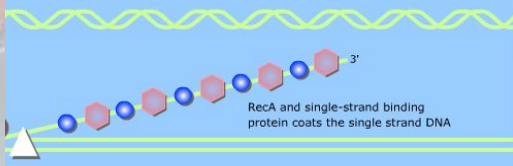
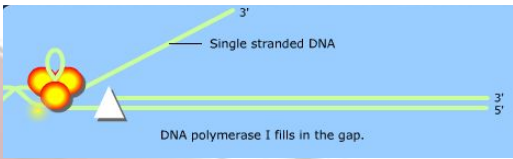
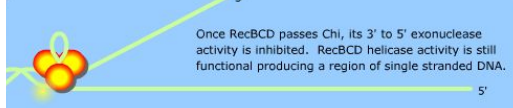
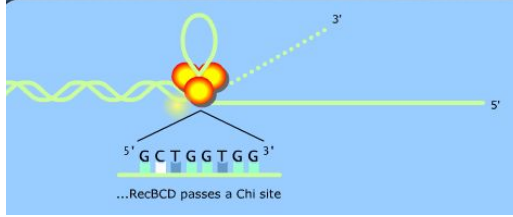
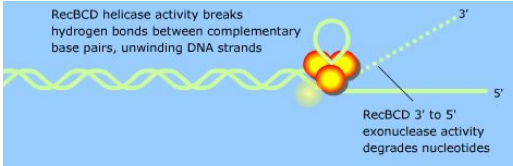
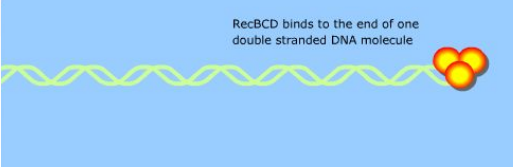
Стадии рекомбинации

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

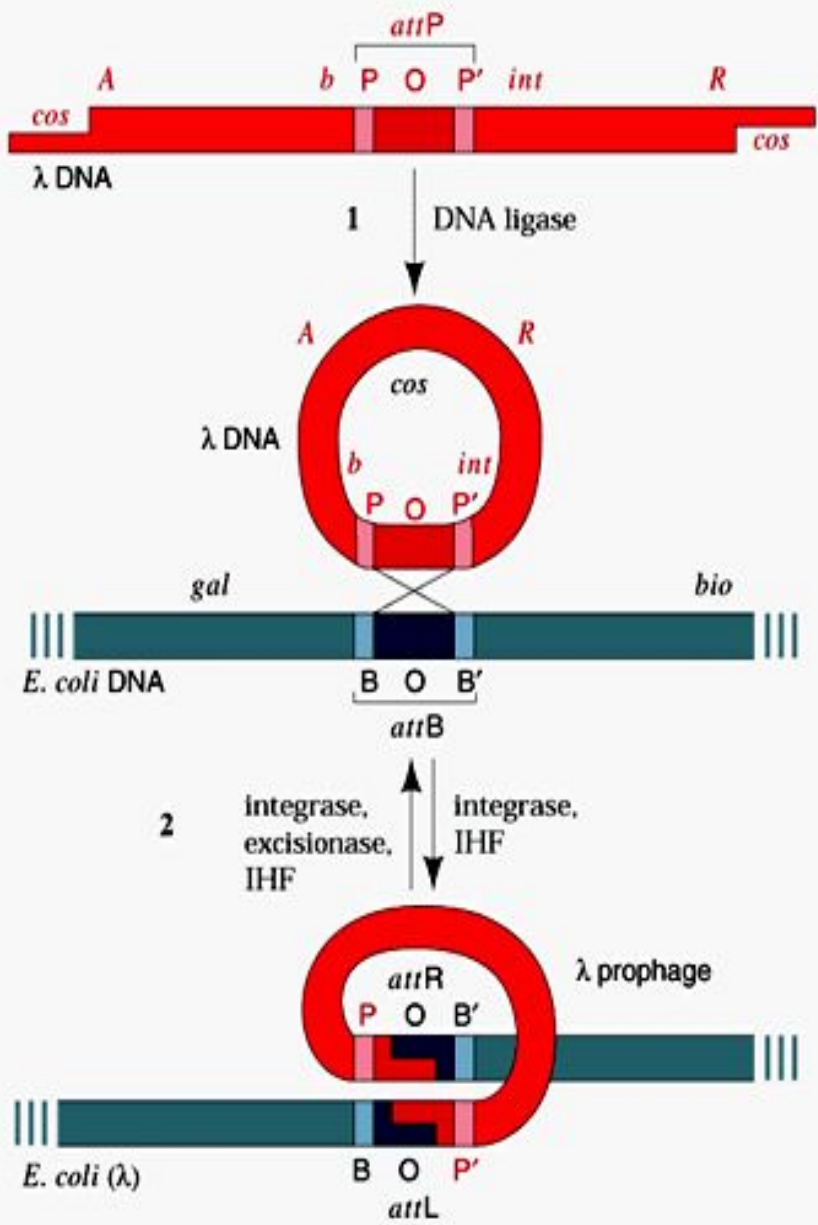
Continue

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**.



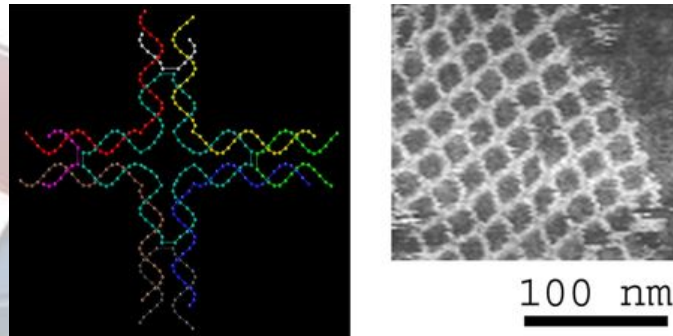
Рекомбинация происходит в пределах специфической нуклеотидной последовательности ДНК фага λ (*attP*-сайт) и уникальной последовательности ДНК *E. coli* (*attB*-сайт). Нуклеотидные последовательности *attP*- и *attB*-сайтов совершенно различны, хотя имеют общее ядро (*O*) протяженностью в 15 нуклеотидных 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