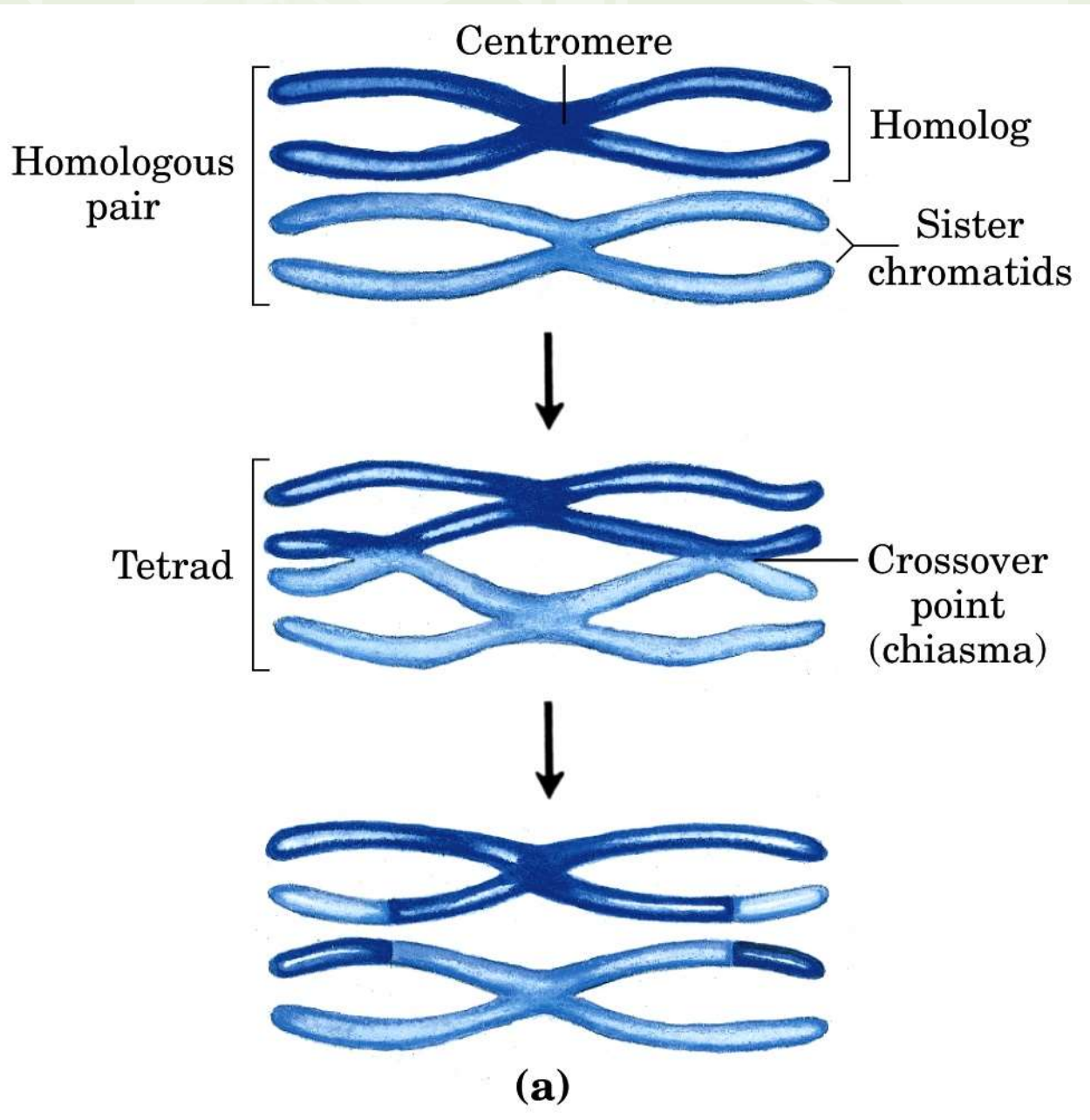


Рекомбинация на ДНК

Доц. Милена Атанасова, д.б.
Ръководител сектор “Биология”
МУ-Плевен

Рекомбинация

- Размяна на сегменти между различни молекули ДНК. Описани са три типа:
- **Хомоложна рекомбинация**
Размяна на на кореспондиращи части от две хомоложни хромозоми/ДНК молекули – ДНК кросинговър.
- **Сайт-специфична рекомбинация**
Осъществява се в специфични ДНК последователности между нехомоложни хромозоми.
- **Транспозиционална сайт-специфична рекомбинация**
Подвижни генетични елементи се включват на определени места в ДНК молекулата.



Механизъм

- Кросинговърът е открит и обяснен от Robin Holliday през 1964
- Поради значителна хомоложност на сегментите, райони с многократно повтарящи се последователности, може да не се сближат точно със съответстващия си участък в хомоложната хромозома или хроматида. Поради това може да се осъществи **неравен кросинговър**, за който се счита, че е в основата на вариация брой тандемни повторения - VNTR (variable number of tandem repeats).

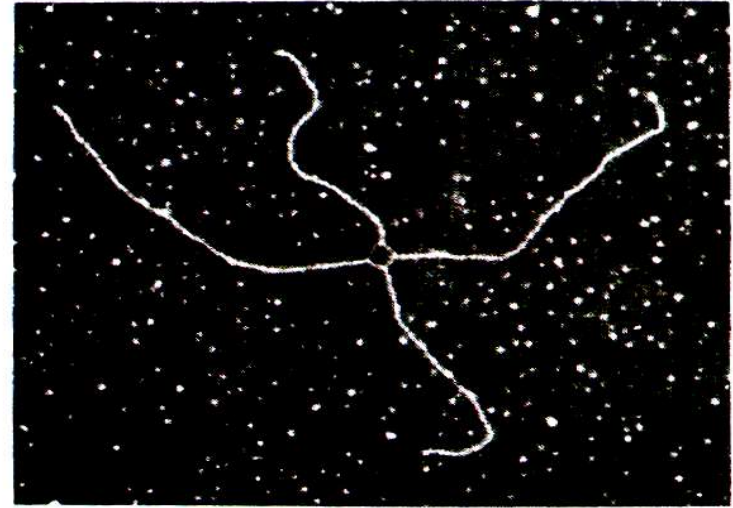
Митотична и мейотична рекомбинация

- Рекомбинация може да се осъществи по време на митоза и по време на мейоза
- Само мейотичната рекомбинация играе важна роля за **преподреждане на гените**
- Митотичната рекомбинация е важна за **поправка на мутациите** в една от сестринските хроматиди

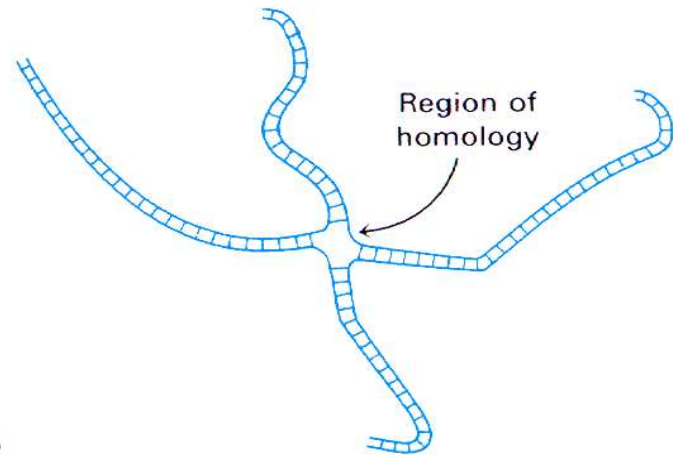
Механизъм

- Ензими наречени *рекомбинази* катализират размяната на генетичен материал.
- Схема за механизма на тази размяна – модел на Holliday 1964.
- Ключова структура - *Holliday junction*, образувана от 4 полинуклеотидни вериги. Такава структура се формира само ако двете молекули са много близки по състав и подреждане на нуклеотидите – високо ниво на хомоложност - в участъка на рекомбиниране.
- Установен отново от David Dressler и Huntington Potter през 1976 и те доказват съществуването му in vivo.

В действительность!



A



B

Опростен модел

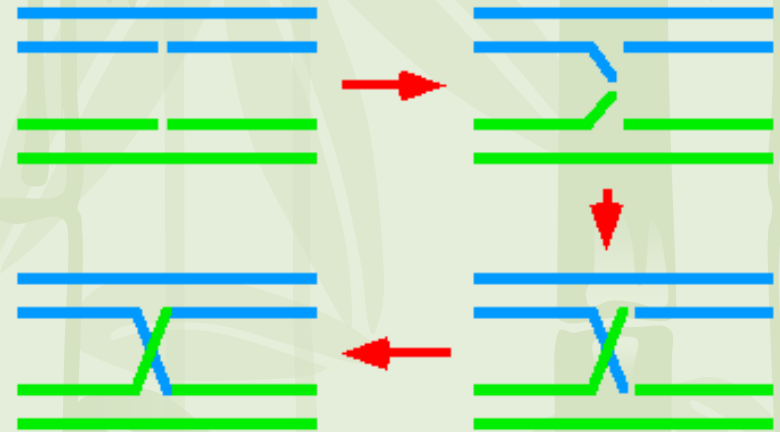
- Изравняване на две хомоложни молекули ДНК
- Разкъсване в една от двете вериги на всяка от молекулите. Те трябва да са с еднаква полярност.



Опростен модел

- Размяна на веригите и лигиране.

Формираната междинна структура се нарича структура на **Holliday**. In vivo наподобява гръцката буква χ , и затова е наречена хи форма.



Опростен модел

- Визуализацията на следващите стъпки е по-лесна, ако едната молекула се завърти на 180°C по отношение на втората. Има два начина това да се случи:
 1. Ако се скъсат веригите, които са се скъсали и в началото, се възстановяват преди съществуващите молекули.
 2. Ако се скъсат комплементарните им вериги, се появяват две нови рекомбинантни молекули.



1

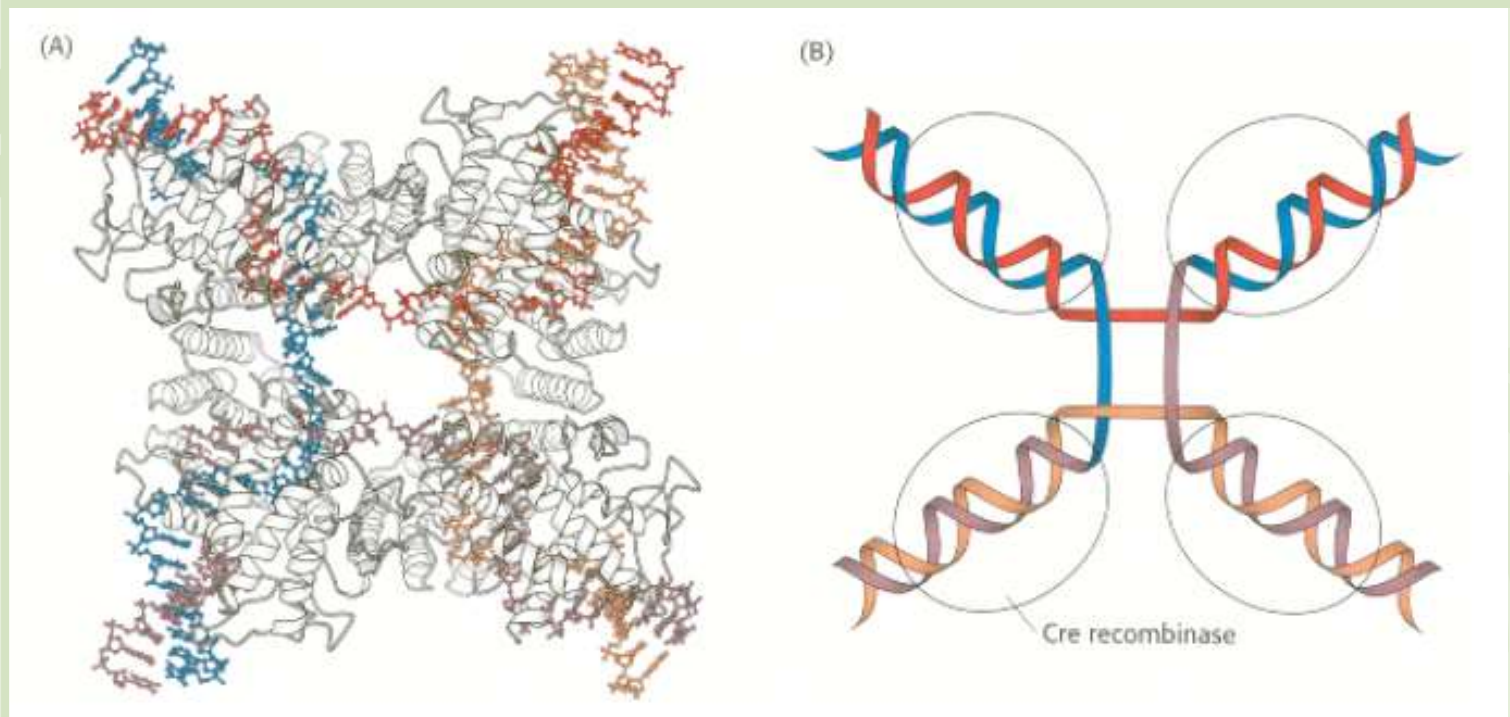


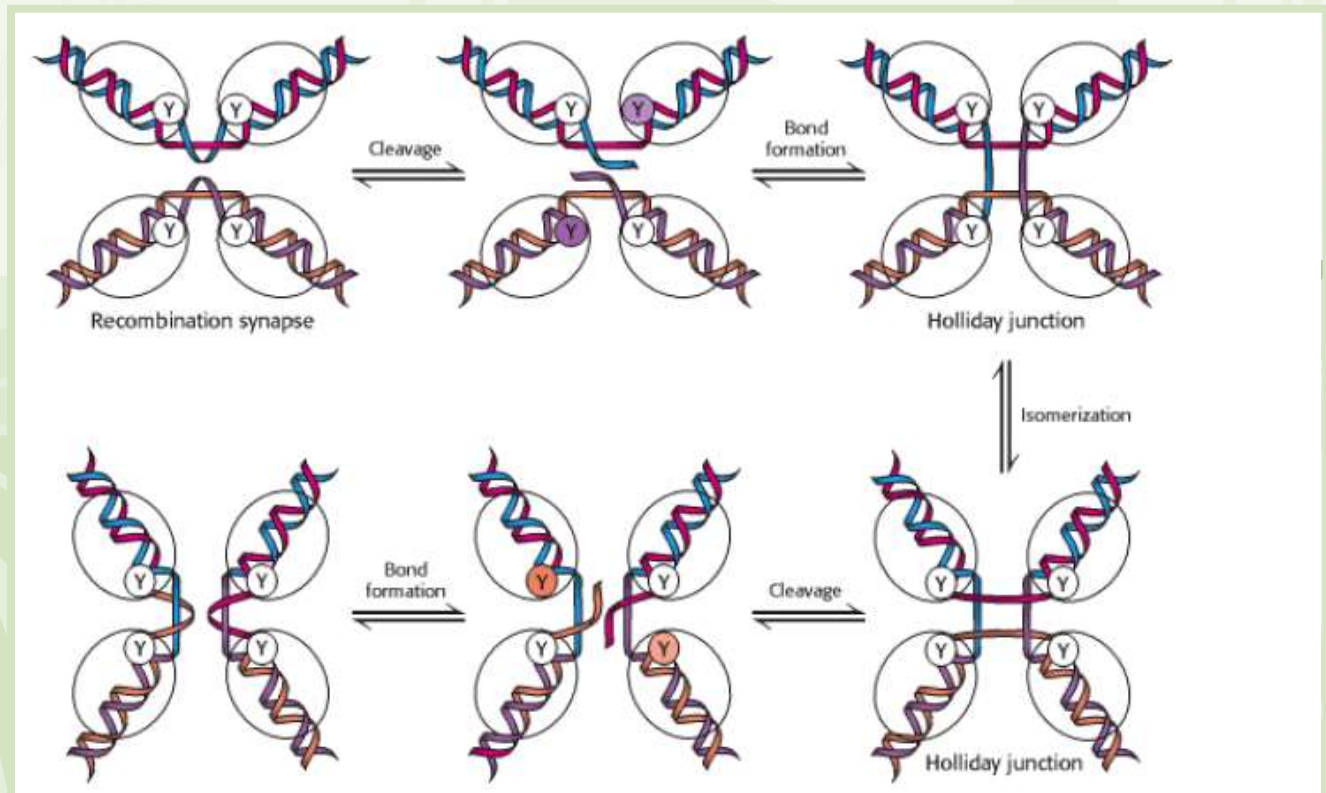
2



В действителност!

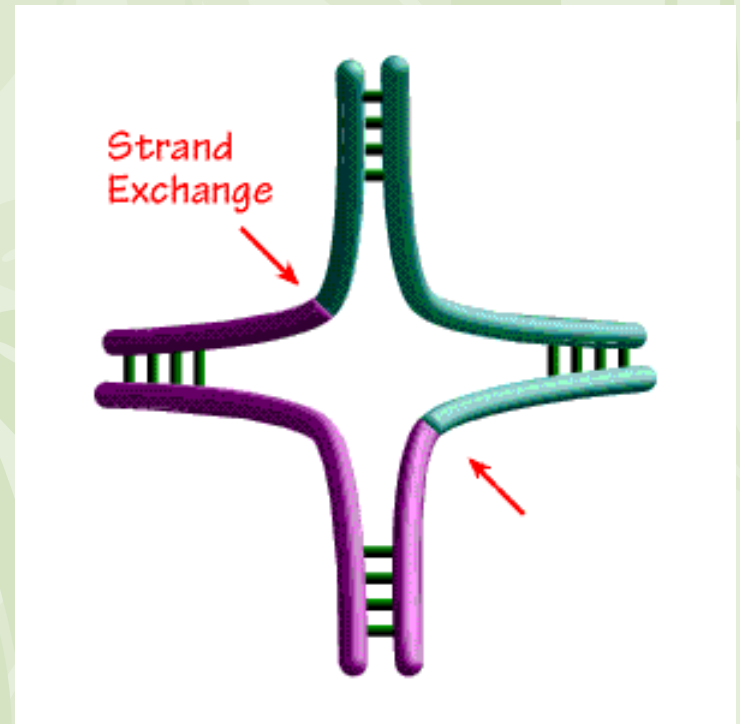
1. Рекомбинази (Cre) **се свързват** към ДНК молекулите. Четири молекули от ензима и 2 ДНК молекулите образуват **рекомбинантен синапс**.



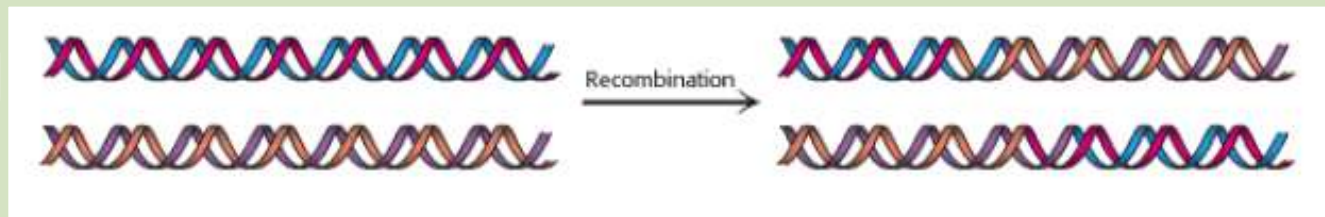


2. Реакцията започва с разкъсването на една верига във всяка от ДНК молекулите (с еднаква полярност!). 5'-ОН края на всяка разкъсана верига остава свободен, а 3'-фосфатната група се свързва с специфичен тирозинов остатък в рекомбиназата.
3. Свободният 5' край се вмъква между двете съседни вериги в областта на синапса и атакува връзката между фосфатната група и тирозина на рекомбиназата, като се образува нова фосфодиестерна връзка и свободни тирозинови остатъци. В резултат се формира структура на Holliday.

4. Структурата на Holliday може да изомеризира пространствено по два начина и да се възстановят старите молекули, или да се формират рекомбинантни молекули.



5. След формирането на тази структура разкъсването на веригите и възстановяването на фосфо-диестерните връзки се повтаря. Образува се синапс, съдържащ два рекомбинантни дуплекса.



Две ДНК молекули могат да се рекомбинират и да образуват нови такива, съдържащи сегменти от двамата родители.

Сайт–специфична рекомбинация

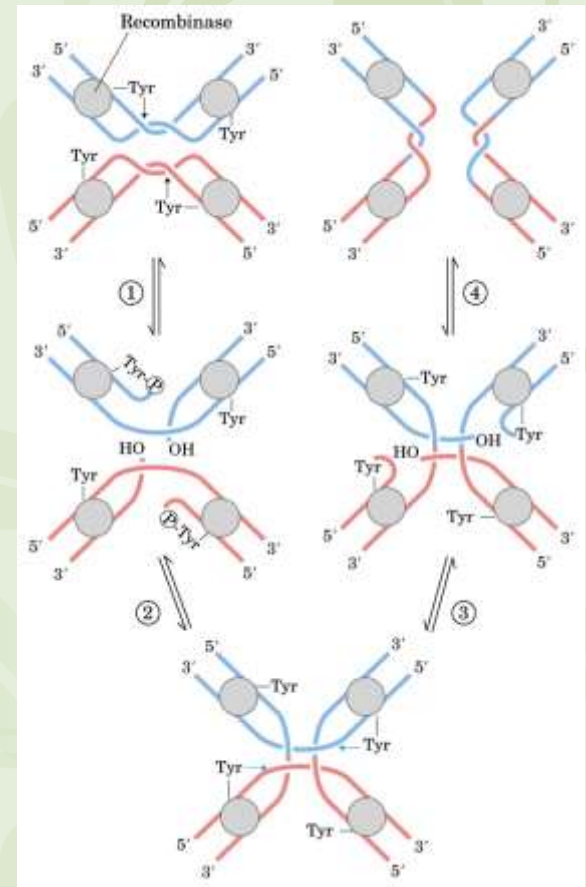
- Вмъкването на малка ДНК-молекула в хромозома
- Разменят се специфични ДНК последователности (подвижни генетични елементи) между нехомоложни хромозоми. Това довежда до значителни промени върху ДНК молекулите.
- Сайт-специфичната рекомбинация въвежда значителни преобразувания – въпросната малка (но не чак незабележима) молекула се вмъква в хромозомата, изрязва се от нея или се премества по дължината ѝ.

Сайт-специфична рекомбинация

- Вируси и транспозомни елементи често интегрират генома си в хромозоми.
- Сайт-специфичната рекомбинация е характерна за про- и еукариоти и има значение за регулацията на генната експресия и разнообразяване на генетичния репертоар на видовете.

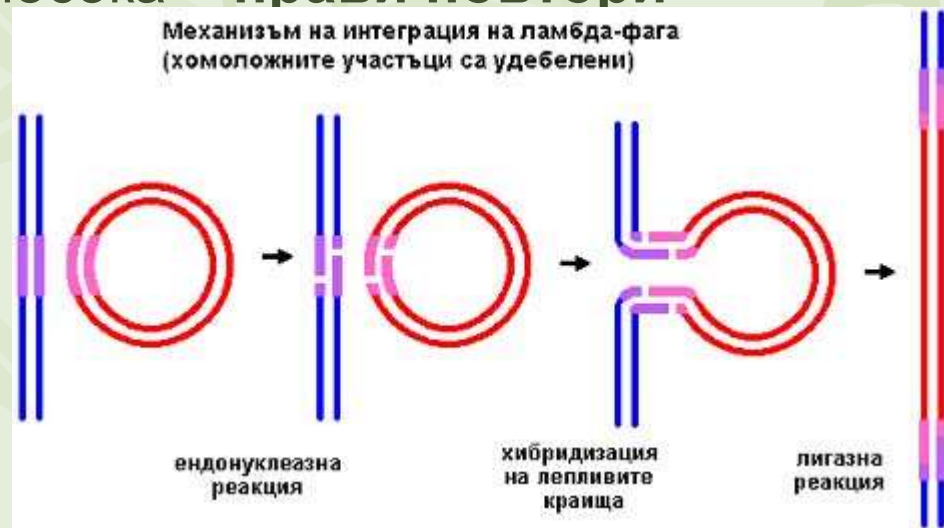
Сайт–специфична рекомбинация - ВИДОВЕ

- Транспозомна сайт-специфична рекомбинация. Преместване (транспозиция) на генетични елементи без пребиваване на сегмента в свободно състояние.
- Консервативна сайт-специфична рекомбинация.



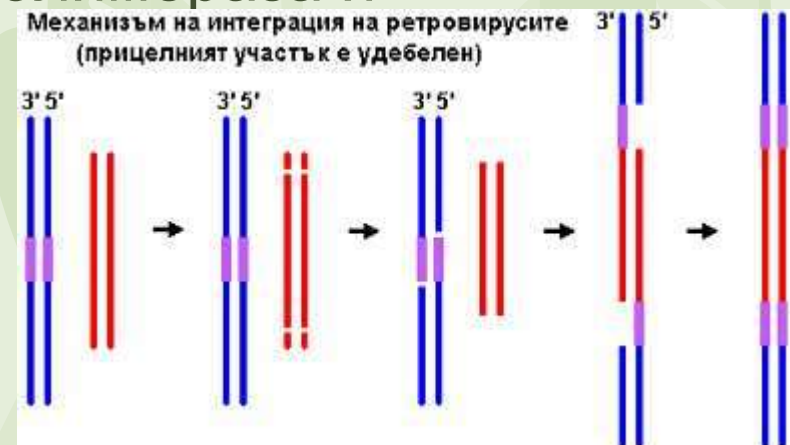
Механизми на сайт-специфичната рекомбинация - Интеграция

- Вмъкването на малка ДНК-молекула в хромозома се нарича **интеграция**. Общо име за ензимите, участващи в сайт-специфичната рекомбинация – **интегрази**
- 1. Изисква се **къс хомоложен участък**
- Ендонуклеаза прави никове с лепливи краища
- Лигаза съшива краищата на двете молекули
- Повтори с еднаква посока – **прави повтори**



Механизми на сайт-специфичната рекомбинация – Интеграция (2)

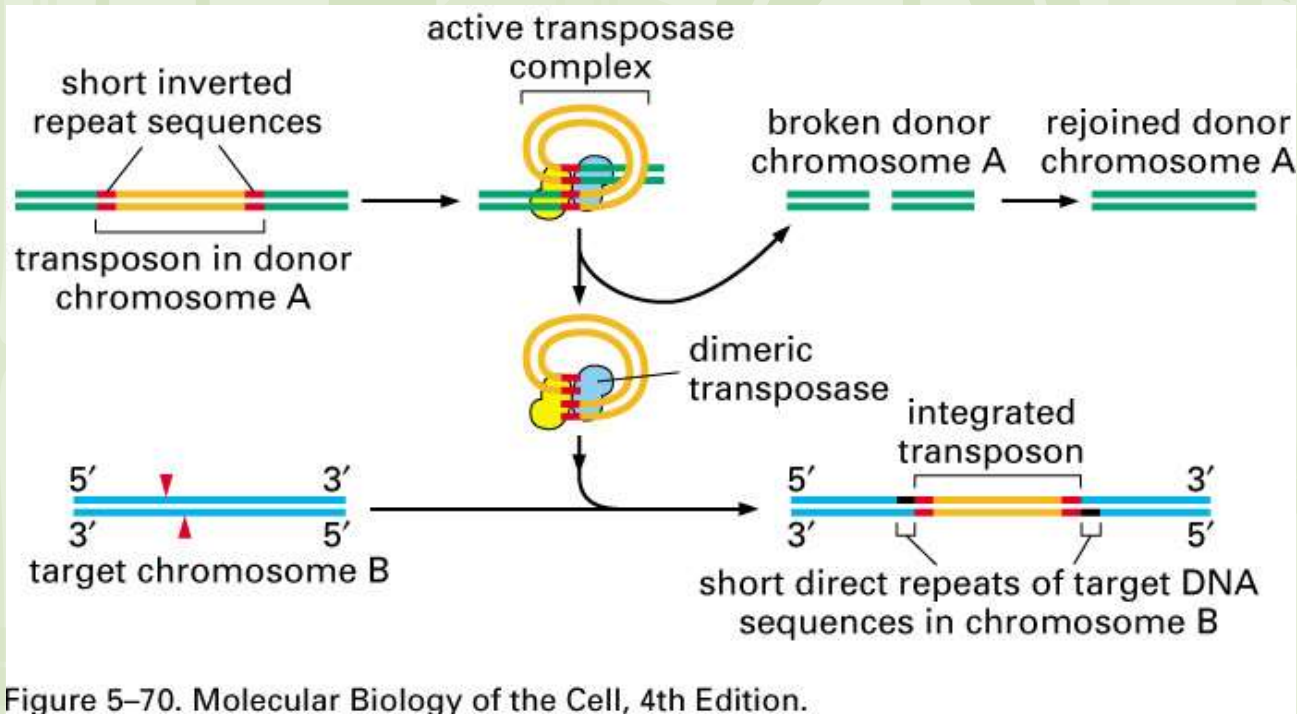
- 2. Вмъкване без хомология
- Ендонуклеаза изрязва срещуположни никове в малката молекула, която ще се вмъква - получават се тъпи краища.
- Лигаза “пришива” сегмента към лепливите краища на молекулата “гостоприемник”
- Получават се едноверижни празнини, които се запълват от ДНК-полимераза и лигаза



Фигура - Мая Маркова,
МУ-София

Механизми на сайт-специфичната рекомбинация – Транспозиция и дупликация

Cut and Paste
транспозиция.
Само за ДНК



Транспозиция - преместване на елемент от едно място в генома на друго, без да е пребивавал самостоятелно

Транспозаза (ензим) отрязва мобилни генетични елементи и ги вмъква в специфични места.

Консервативна сайт-специфична рекомбинация

Интеграция срещу вмъкване

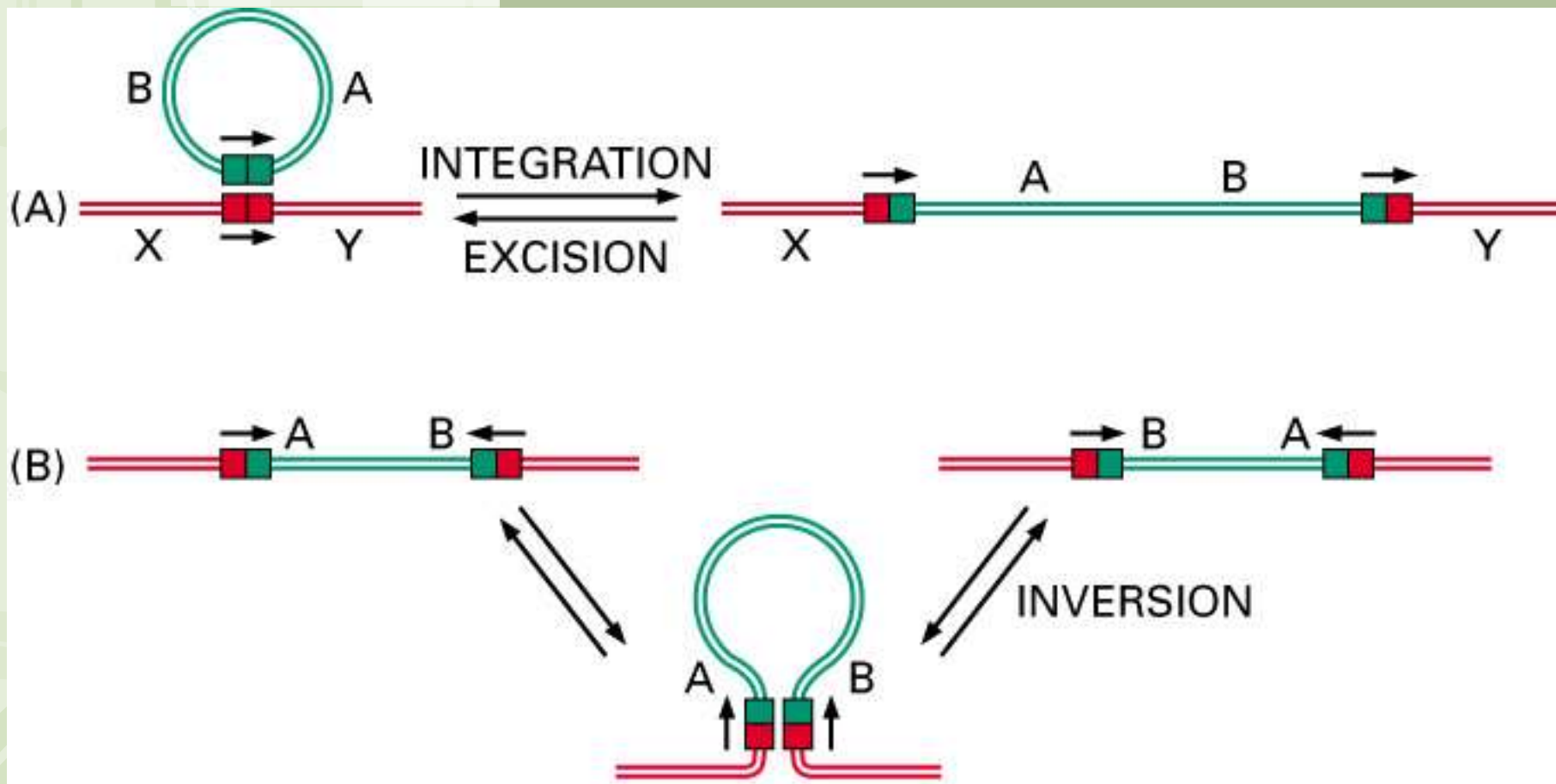
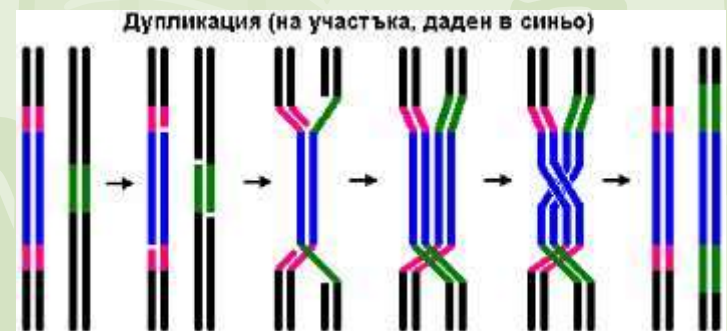


Figure 5-79. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Механизми на сайт-специфичната рекомбинация – Дупликация или репликационна транспозиция

- **Дупликация** – малки последователности не се местят а се дуплицират на други, отдалечени в генома места – предполага се, че така са възникнали разпръснатите повтори.
- Ако дупликацията се повтори многократно явлението се нарича **амплификация**



Репликационна транспозиция

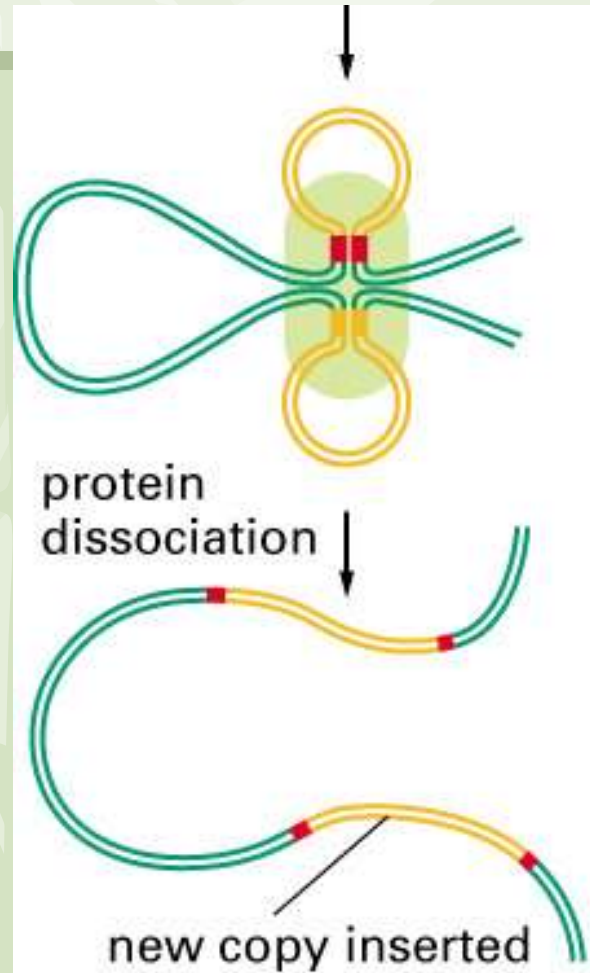
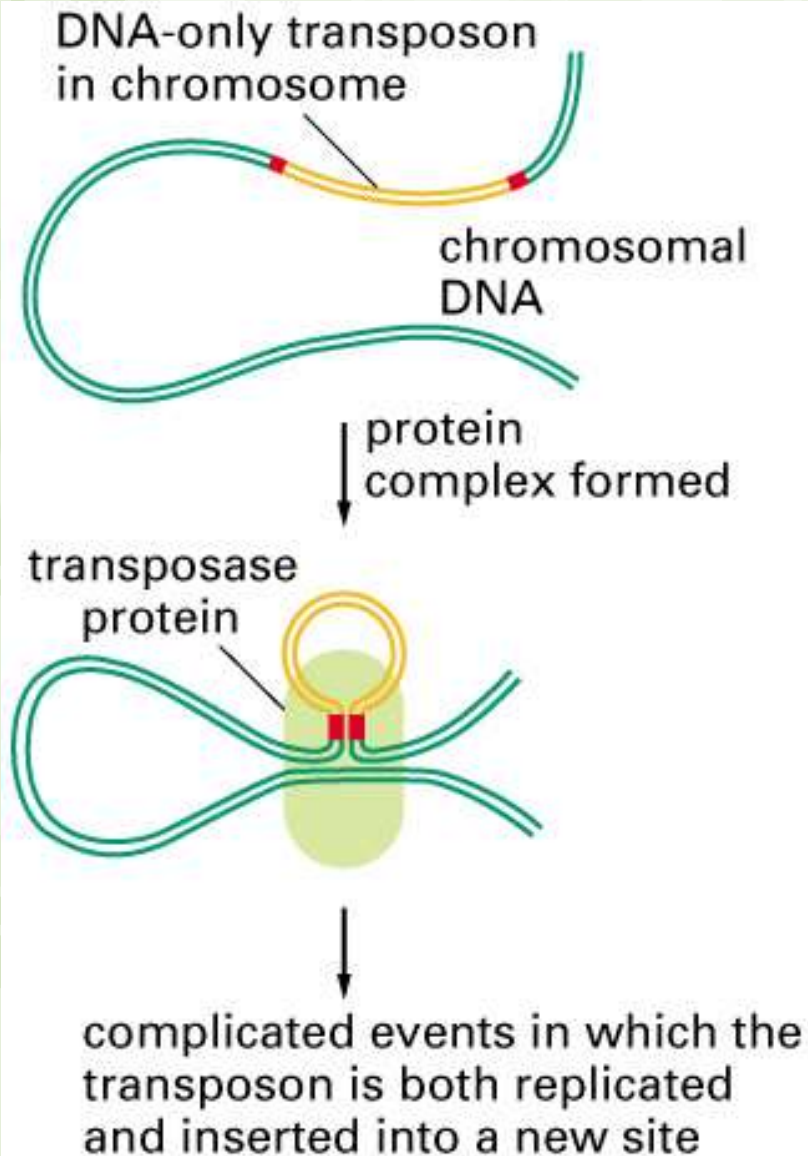


Figure 5-72 part 2 of 2. Mole

Класове елементи, осъществяващи сайт-специфична рекомбинация

- Епизоми
- Транспозони
- Онкогенни ДНК вируси
- Лизогенни фаги
- Ретротранспозони
- Ретровируси

ДНК сайт-специфична рекомбинация - Епизоми

- Плазмидоподобна ДНК с IS елементи
- IS (insertion sequences) 800 – 1000 nbp, съдържащи последователности за транспозиция и вграждане
- Епизомата може да съществува самостоятелно, може и да се вгражда.
- Редица малки ДНК в прокариотната клетка могат да съществуват и като плазмиди, и като съставни части на бактериалната хромозома.
- Способни са да се интегрират в хромозомата и да се изрязват от нея.
- Някои от тях като **F-фактора** (полов фактор при някои бактерии) имат любимо място за включване в хромозомата, т.е. определена последователност винаги им служи като прицелен участък.
- Когато е вграден в хромозомата, клетката се означава като Hfr (съкр. от англ. high frequency recombination – висока честота на рекомбинация).

Транспозони

- Или **подвижни генетични елементи**
- Рядко са подвижни. Не се знае какво ги активира.
- не са склонни да пребивават в свободно състояние, но често променят местоположението и броя си в хромозомата.
- Кодират ензимите, които катализират важните за тях процеси – интеграция, транспозиция, дупликация, изрязване.
- Най-малките транспозони могат да не кодират нищо. Те разчитат на ензими, кодирани от др. транспозони или дори от гени на клетката.
- Влияят като **мутагени**: могат да дават материал за еволюцията, но в локален план имат негативно действие.

Три от множеството мобилни генетични елементи при бактерии:

Ген за транспозаза: Кодира ензими, които разкъсват ДНК, а после съединяват получените сегменти

Червените сегменти: ДНК последователности, които се разпознават от ензимите

Жълтите сегменти: гени за антибиотици

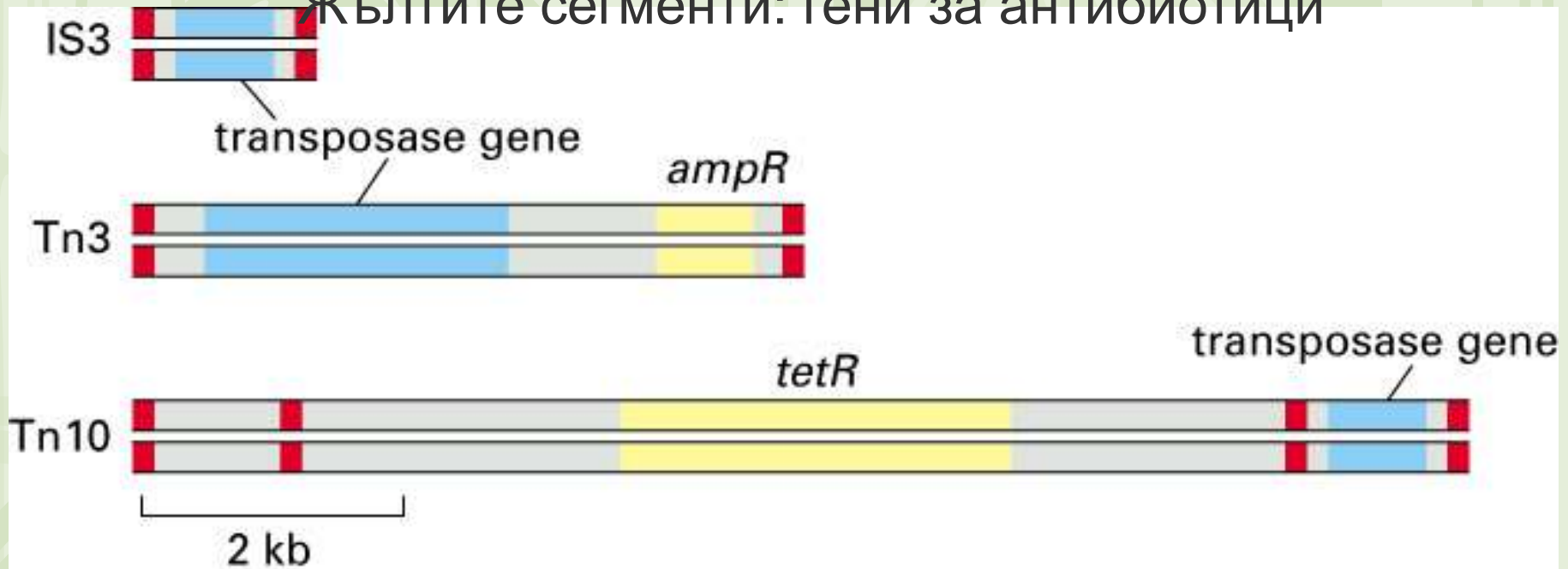


Figure 5-69. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Лизогенни фаги

- Част от вирусите се размножават в цитоплазмата и не взаимодействат с клетъчната ДНК (едра шарка)
- Други интегрират генома си в клетъчния геном чрез сайт-специфична рекомбинация - в интегрирано състояние провируси и профаги:
- Два пътя литичен и лизогенен цикъл
- Лизогенните фаги могат да пренесат сегмент от клетъчната ДНК в друга бактерия - **трансдукция**

Онкогенни ДНК-вируси

- Рекомбинацията не е предвидена в развитието на вирусите. При обикновени условия тя е много рядка.
- **Провирус** - вирус, включен в генома на клетката гостоприемник без да я разруши
- Интеграцията на провирус може да трансформира клетката, т.е. да я накара да се дели неограничено
- В организма същите вируси могат да предизвикат **рак**, затова се наричат **онкогенни**.
- Онкогенност се наблюдава при представители от групата на полиома вируси, папилома-, адено- и херпес вируси

INTEGRATION OF DNA COPY INTO HOST CHROMOSOME



integrated DNA



TRANSCRIPTION

many RNA copies



TRANSLATION

capsid protein
+
envelope protein
+
reverse transcriptase



ASSEMBLY OF MANY NEW VIRUS PARTICLES, EACH CONTAINING REVERSE TRANSCRIPTASE, INTO PROTEIN COATS

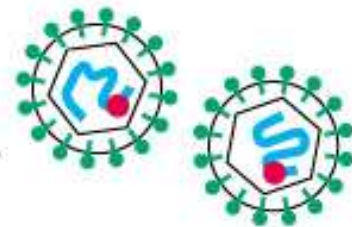


Figure 5-73 part 2 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

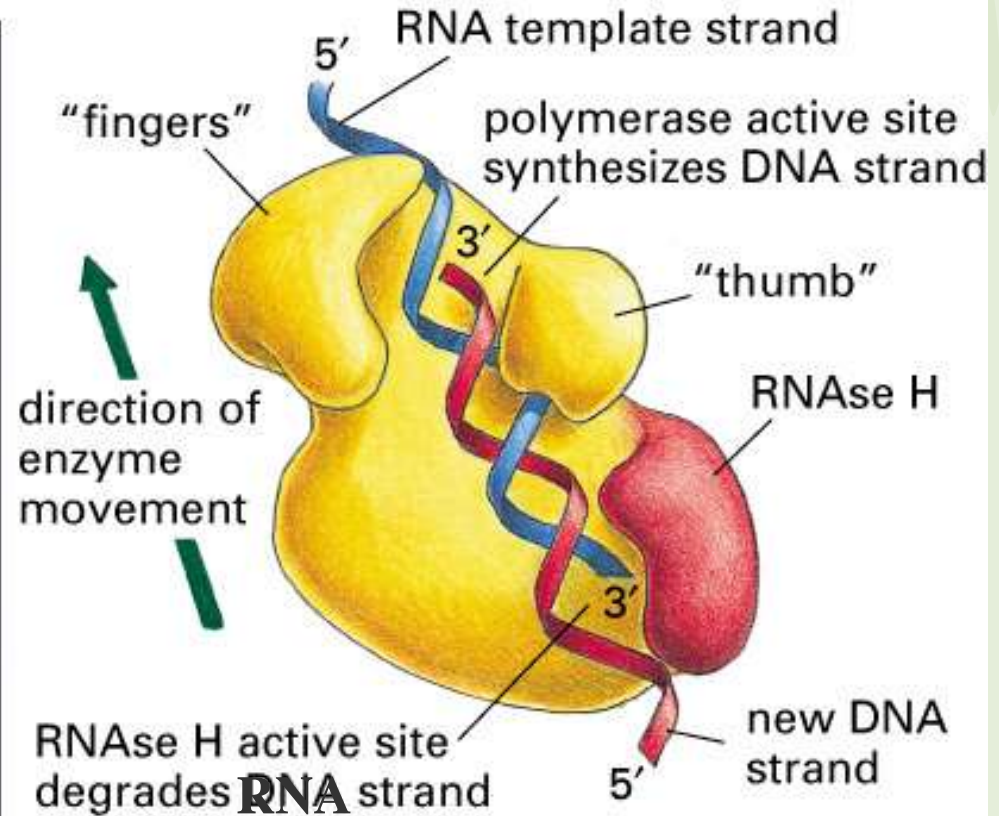
Ретротранспозони

- Група подвижни елементи, които при транспозиция и амплификация минават през **РНК** (ретропозони, ретрони)
- Те кодират ензима **обратна транскриптаза** (РНК-зависима ДНК-полимераза), който синтезира ДНК върху матрица РНК.
- Двуверижната кДНК се интегрира на случайно място в генома. Това се извършва от **транспозаза**, също кодирана от ретротранспозона.
- **Псевдогени** – участъци в еукариотните клетки, наподобяващи зряла иРНК, но в ДНК форма. Липсват им не кодиращите части (регулаторни гени и интрони), но имат поли-А опашка. Това вероятно са интегрирани обратни транскрипти.

Обратна транскриптаза



(A)



(B)

Figure 5-74. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Ретровирусно базирана транспозиция

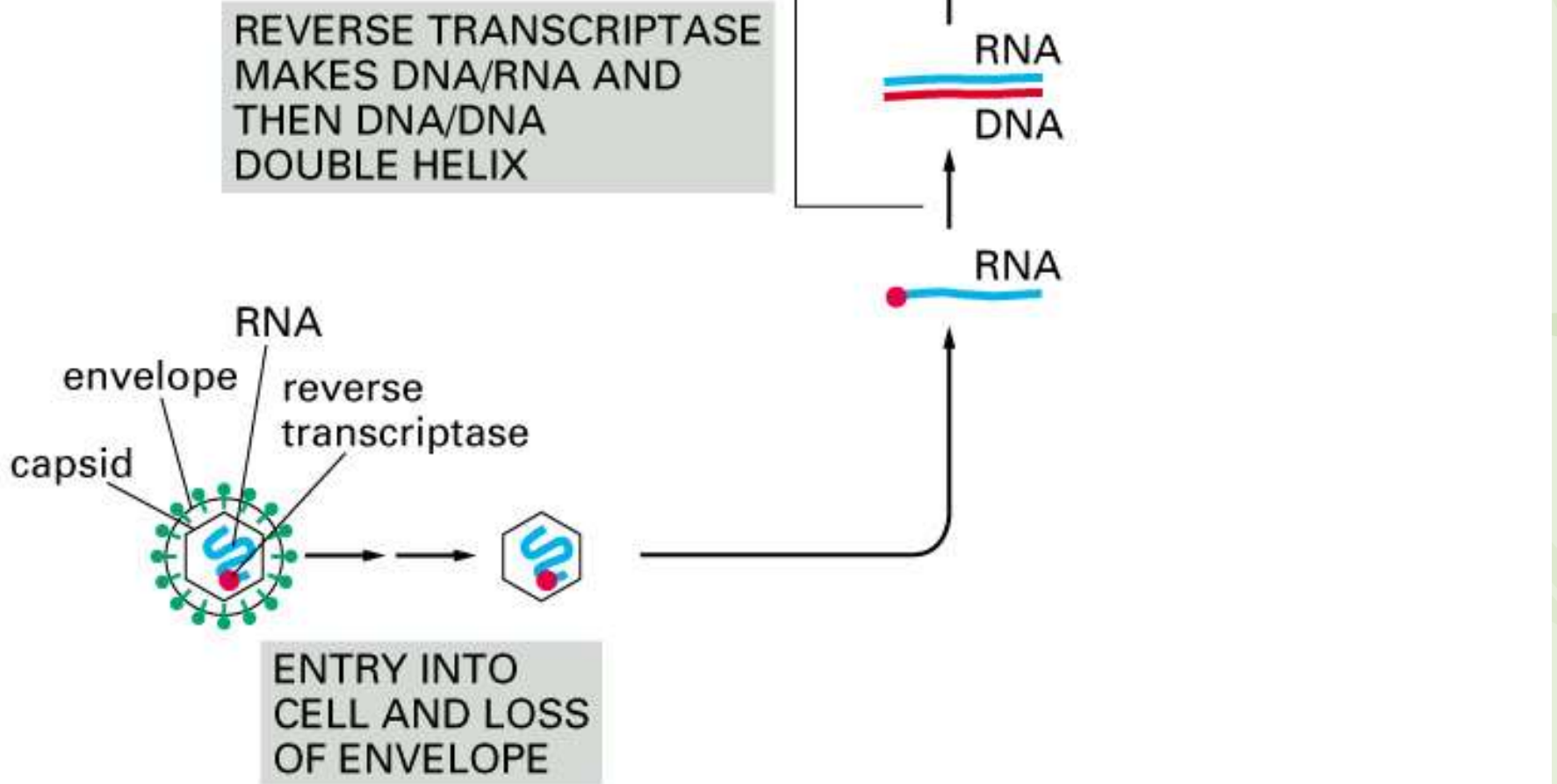


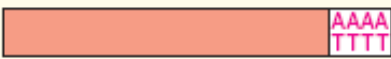


Figure 5-73 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

TABLE 5-3 Three Major Classes of Transposable Elements

CLASS DESCRIPTION AND STRUCTURE	GENES IN COMPLETE ELEMENT	MODE OF MOVEMENT	EXAMPLES
<p>DNA-only transposons</p>  <p>short inverted repeats at each end</p>	encodes transposase	moves as DNA, either excising or following a replicative pathway	P element (<i>Drosophila</i>) Ac-Ds (maize) Tn3 and IS1 (<i>E.coli</i>) Tam3 (snapdragon)
<p>Retroviral-like retrotransposons</p>  <p>directly repeated long terminal repeats (LTRs) at ends</p>	encodes reverse transcriptase and resembles retrovirus	moves via an RNA intermediate produced by promoter in LTR	Copia (<i>Drosophila</i>) Ty1 (yeast) THE-1 (human) Bs1 (maize)
<p>Nonretroviral retrotransposons</p>  <p>Poly A at 3' end of RNA transcript; 5' end is often truncated</p>	encodes reverse transcriptase	moves via an RNA intermediate that is often produced from a neighboring promoter	F element (<i>Drosophila</i>) L1 (human) Cin4 (maize)

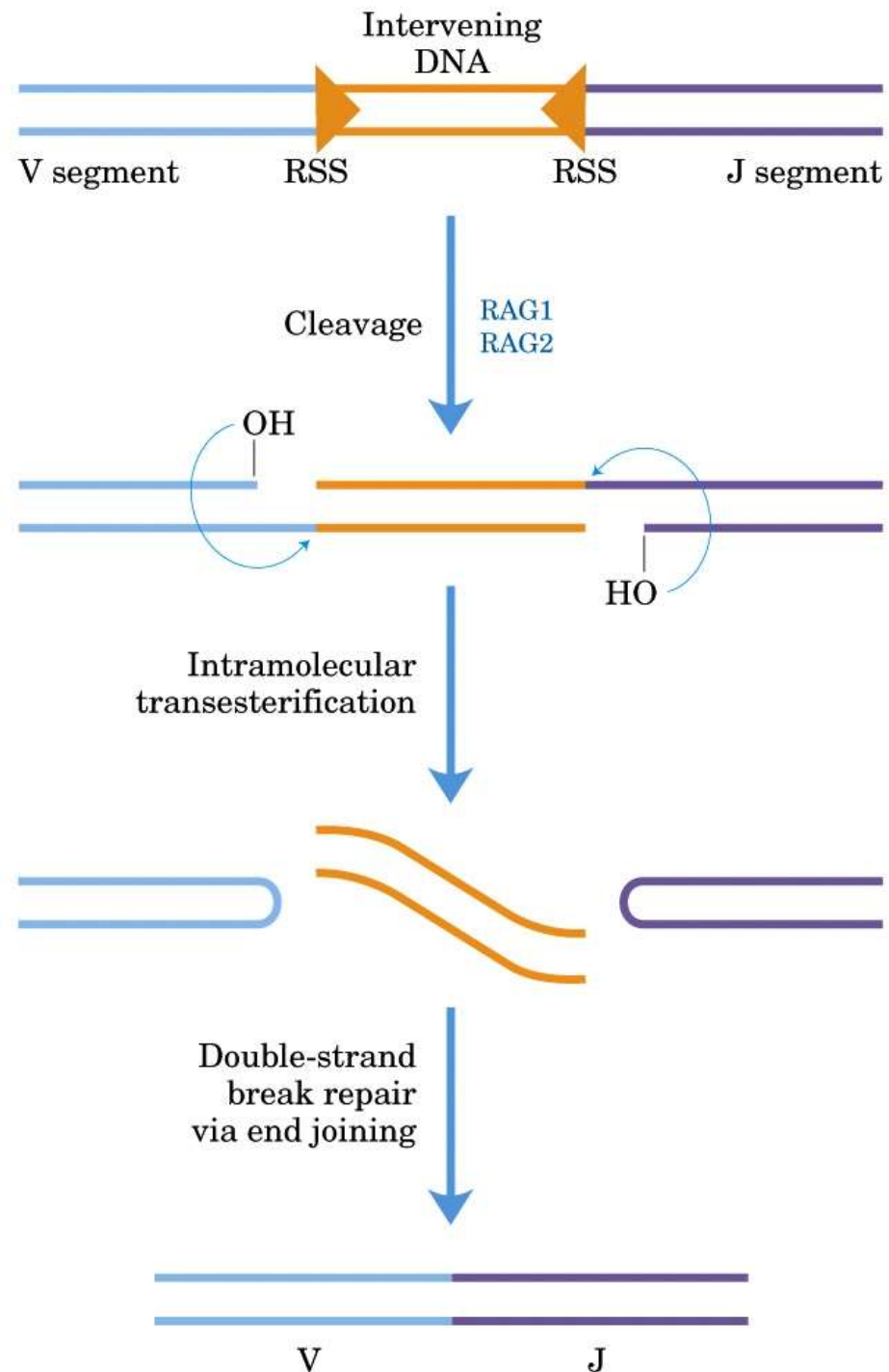
These elements range in length from 1000 to about 12,000 nucleotide pairs; each family contains many members, only a few of which are listed here. In addition to transposable elements, there are selected viruses that can move in and out of host cell chromosomes; these viruses are related to the first two classes of transposons.

Биологична роля на ДНК-рекомбинацията

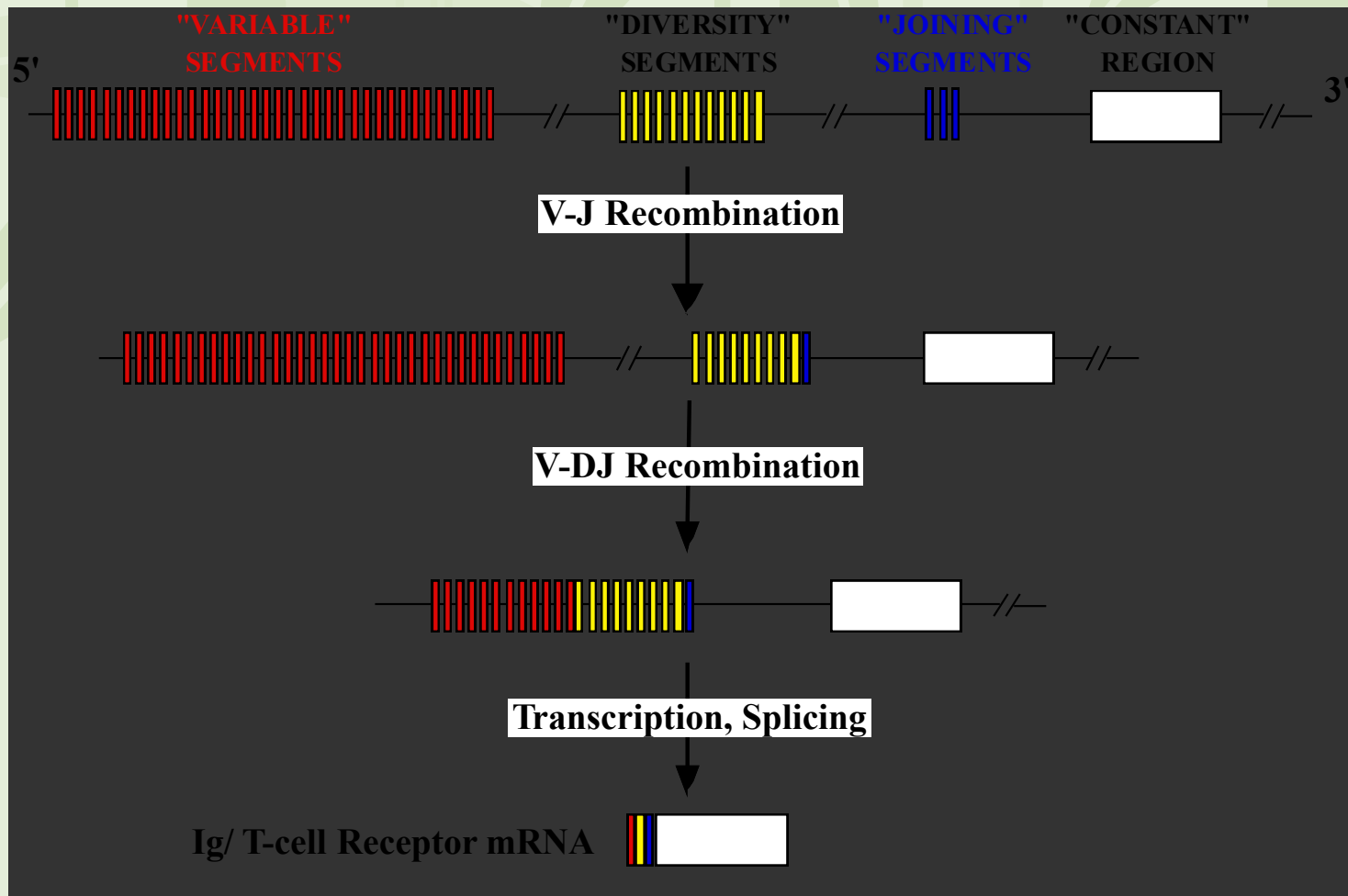
- Образуват се нови генни /алелни комбинации (кросинговър) при развитието на яйцеклетките и сперматозоидите при половото размножаване.
- ДНК рекомбинацията може да даде възможност за поправка на увредени хромозоми, като се използва неувредената за матрица.
- Възникват нови комбинирани гени (напр. Пренареждане на гените за имуноглобулини)
- Интегриране на специфични ДНК елементи.

Механизъм на генно пренареждане

- **Придобит имунитет** - най-ефективните средства за защита от патогени се основава на сайт-специфична рекомбинация.
- **Генно пренареждане** - антиген-специфичните рецептори на В- и Т-лимфоцитите



V(D)J рекомбинация пренаареждане на гените за Ig



RESOURCE MATERIAL

VOET, VOET & PRATT Chapter 24, DNA Replication, Repair and Recombination, pages 802 - 803

STRYER Chapter 32, Gene Rearrangments, pages 820-822

LEHNINGER Chapter 24, DNA Metabolism, pages 842 - 843

TAMARIN Chapter 16, pages 480 - 483.

WEB SITES:

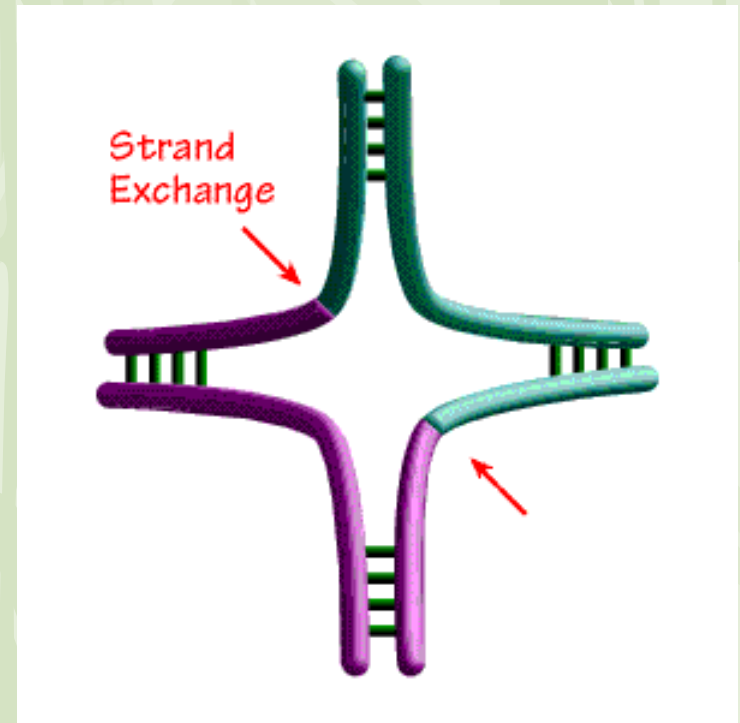
<http://www.sinauer.com/cooper/4e/animations0602.html>

http://www.mun.ca/biology/scarr/DNA_Recombination_animation.htm

!

<http://www.usask.ca/biology/genetics/recombination/recom.htm>

http://www.biostudio.com/d_%20Meselson%20Radding%20Model%20Crossing%20Over.htm



RESOURCE MATERIAL

- There is a nice [Animated Model of a Holliday Junction](#) and you can also [view a 3D Model of a Holliday Junction](#) prepared by [Dr. Bill Engels](#) at the University of Wisconsin.
- [Charles M. Radding](#), Professor of Genetics, and Molecular Biophysics and Biochemistry at Yale University, is still working on the mechanism of recombination and in particular on the mechanisms by which E. coli RecA protein promotes homologous pairing and strand exchange. You can [read about his current research](#) on his web page.
- Matt Meselson has worked on many aspects of recombination over the years. His current research interests are focused on the bdelloid rotifers. These organisms appear to have evolved without any form of sexual reproduction and genetic recombination for millions of years. The [Meselson Laboratory Homepage](#) has more information about this research.
- There are some terrific animated models showing branch migration at the Holliday junction in complex with the **RuvA** protein as proposed in [Rafferty et al.](#) available on the Web at <http://www.shef.ac.uk/mfmbb/ruva.html> in the United Kingdom and at <http://www.sdsc.edu/journals/mbb/ruva.html> in the United States. Notice particularly in the first animation how the bases are able to unpair and re-pair with one another at the Holliday junction. Notice also that only one base is ever unpaired on each strand.
- [General Homologous Recombination](#) at the University of Saskatchewan