

REKOMBINACE

Přestavby DNA \Rightarrow variace v kombinacích genů v genomu
 \Rightarrow adaptace
 \Rightarrow evoluce

1. Obecná rekombinace („General recombination“)

Genetická výměna mezi jakýmkoli párem homologních DNA sekvencí - často lokalizovaných na 2 kopiích téhož chromosomu.

Výměna úseků homologních chromosomů při meiose „crossing over“ \Rightarrow nové kombinace alel

2. Místně-specifická rekombinace („Site-specific recombination“) \Rightarrow není nutná DNA homologie

Rekombinace v krátkých specifických nukleotidových sekvencích \Rightarrow rozpoznávané místně specifickými rekombinačními enzymy

\Rightarrow Alterace posice nukleotidových sekvencí v genomu (integrace virů, transponovatelné elementy ..)

Specifická sekvence na jedné nebo na obou rekombinujících molekulách

1. Obecná rekombinace („General recombination“)

Základní mechanismus stejný u různých organismů \Rightarrow 2 homologní sekvence \Rightarrow vznik Hollidayovy struktury a heteroduplexního spojení (i 1000ce bp dlouhé)

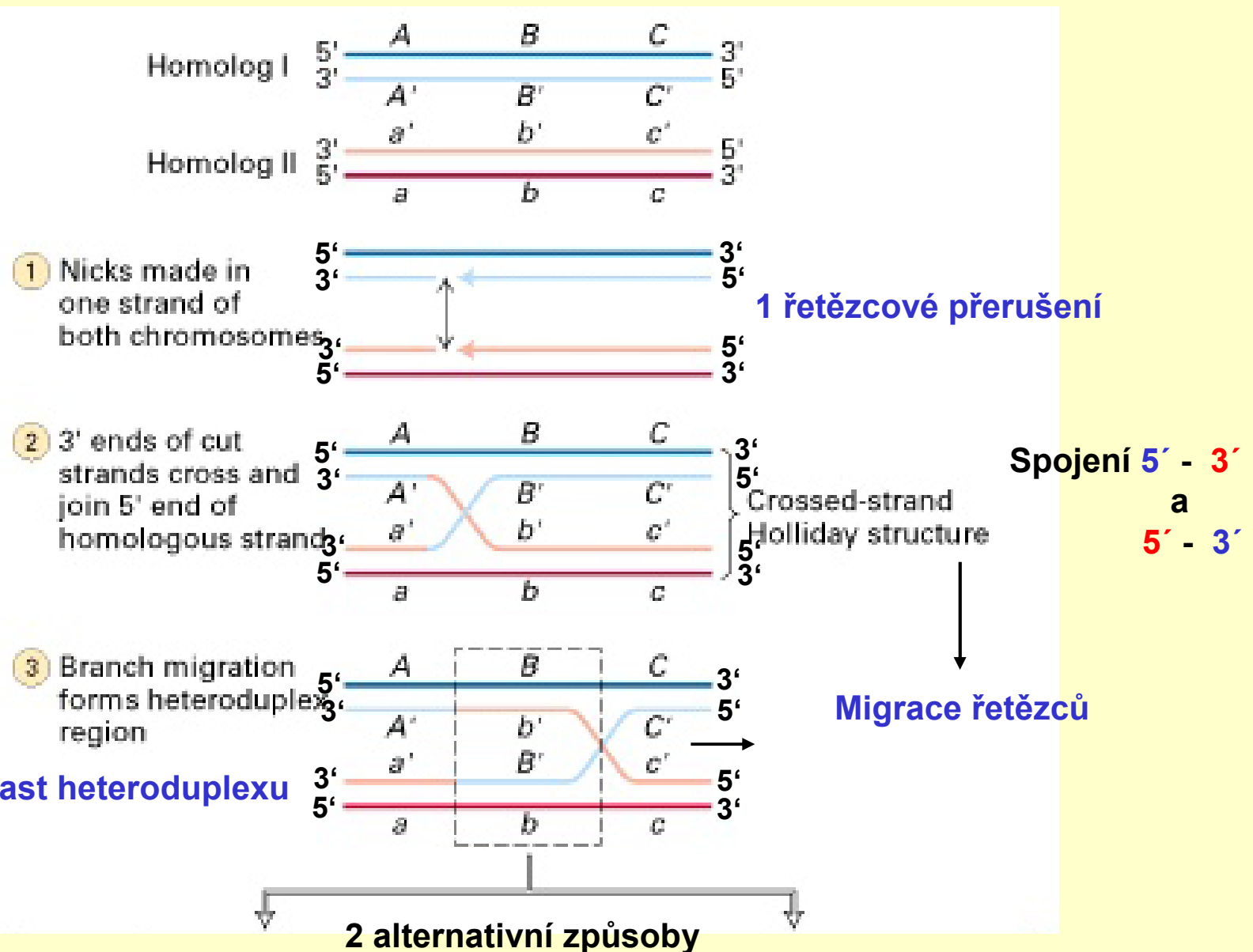
Nedochází ke změnám sekvencí (většinou)

HOLLIDAYův MODEL GENETICKÉ REKOMBINACE

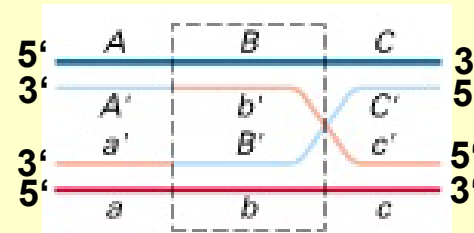
1964, Robin Holliday

Hollidayova
křížová
struktura

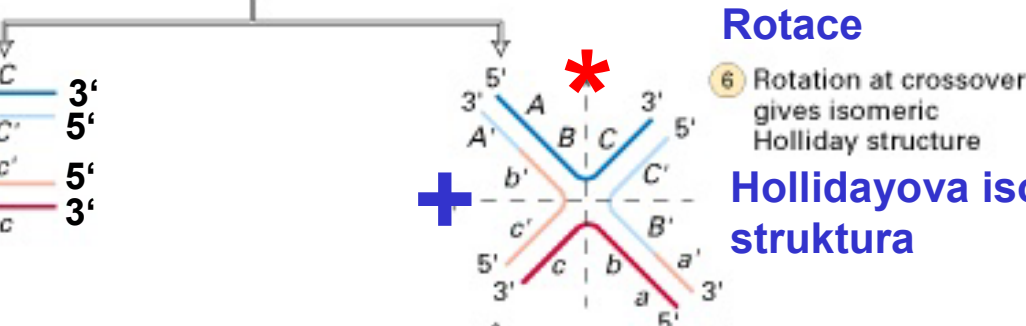
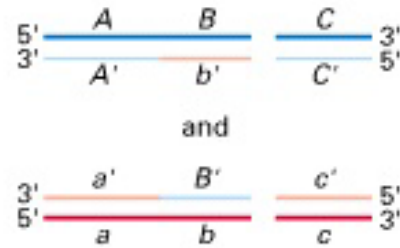
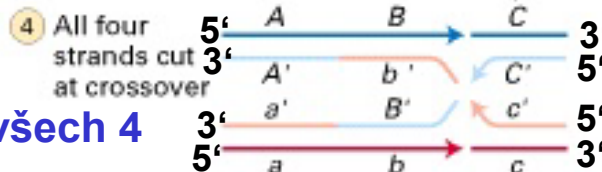
Oblast heteroduplexu



Oblast heteroduplexu



Štěpení všech 4 řetězců

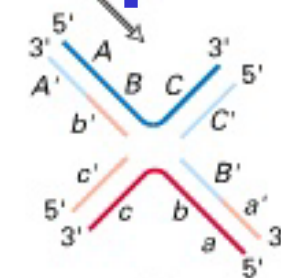
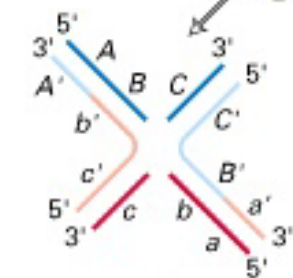


Rotace

Hollidayova isomerní struktura

štěpení *

+ štěpení



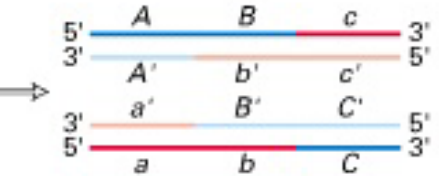
Reseal

Spojení

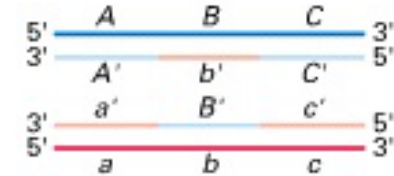
Reseal

5a

5b



Heteroduplexes and recombinants (Spliced products)



Heteroduplexes; no recombinants (Patched products)

V obou případech oblast heteroduplexu

REKOMBINACE

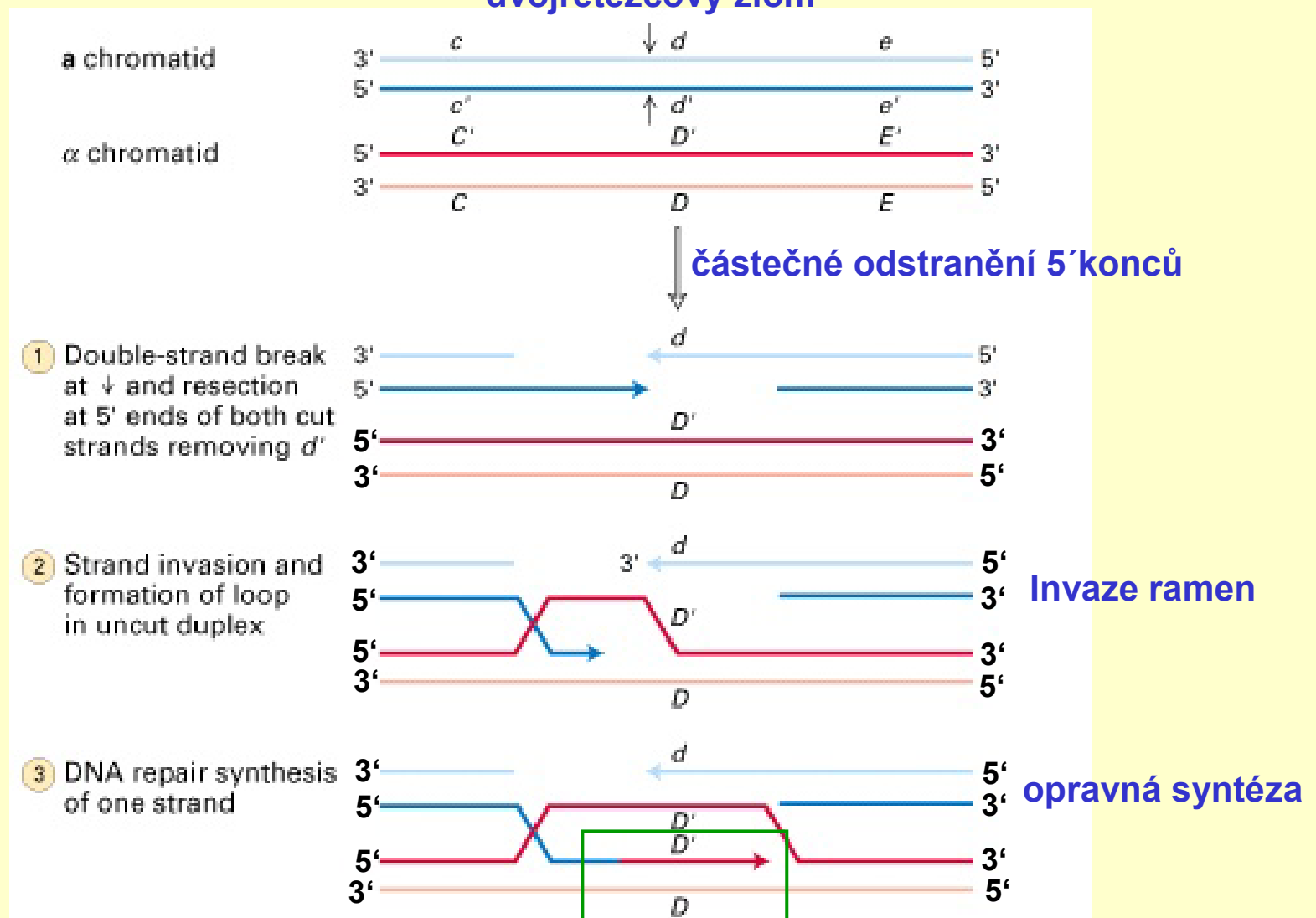
~~REKOMBINACE~~

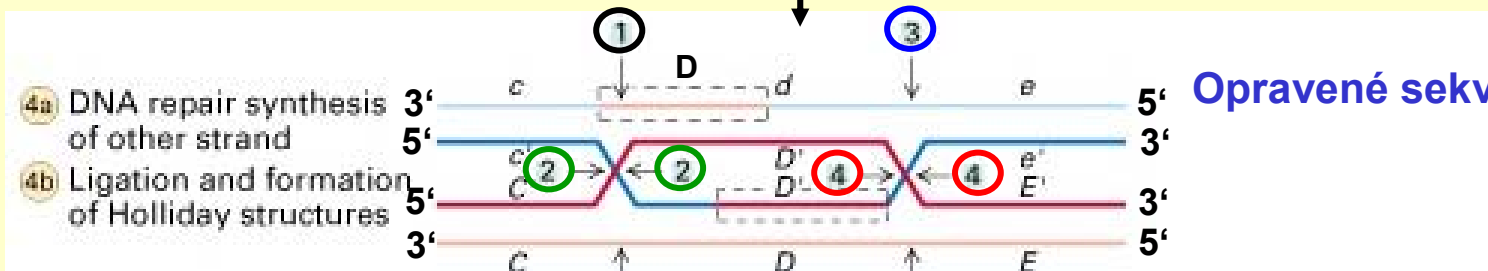
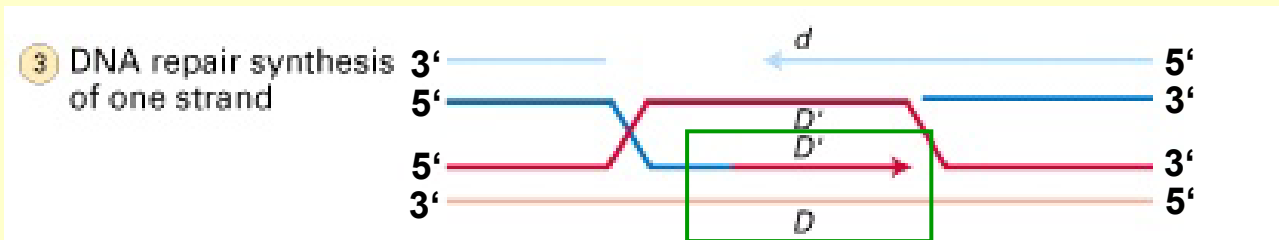


Holliday model - různé varianty

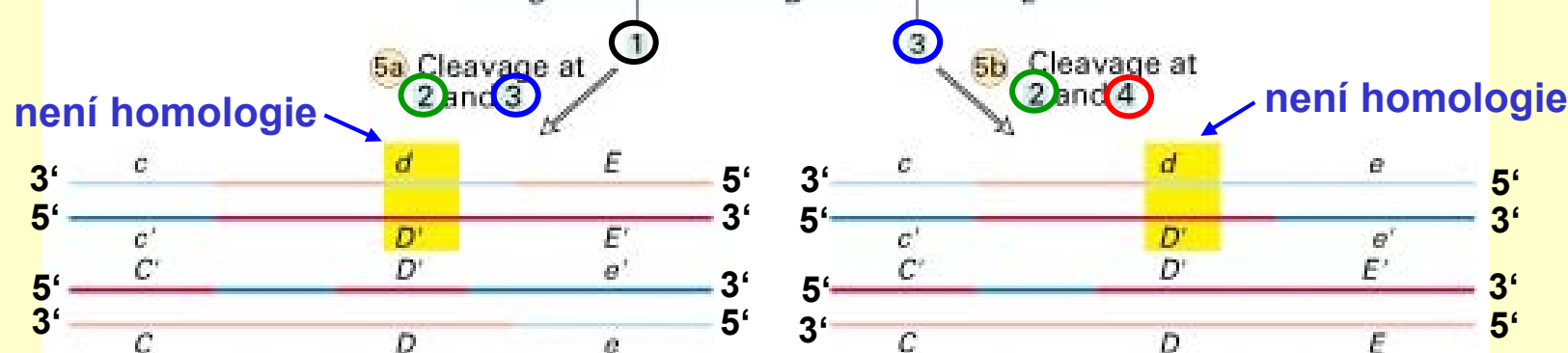
- homologní rekombinace - začíná 2 řetězcovým přerušením \Rightarrow 2 chromosom = předloha pro opravu

dvojřetězcový zlom

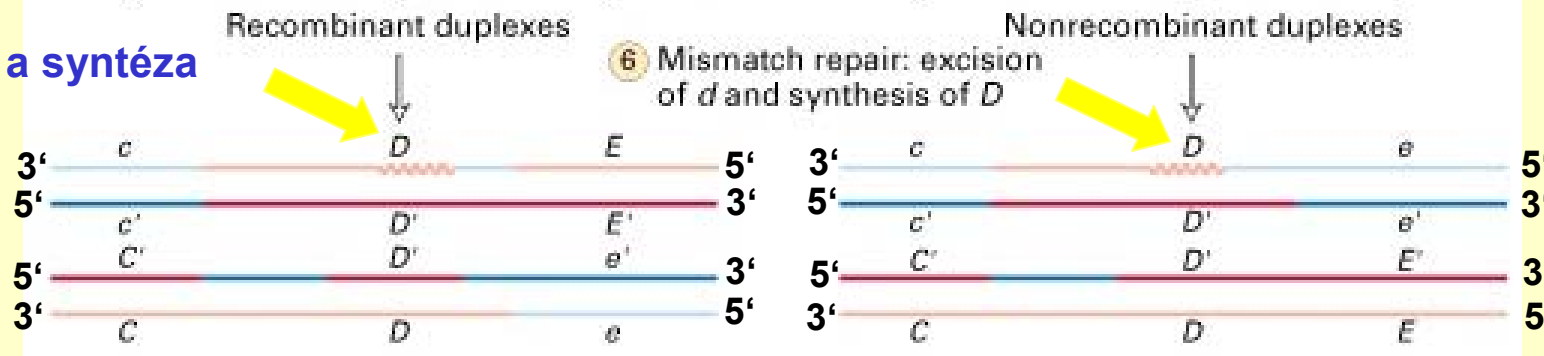




Opravené sekvence



Oprava a syntéza



REKOMBINACE

REKOMBINACE

GENOVÁ KONVERZE $d \rightarrow D$ (nebo $D' \rightarrow d'$)

REKOMBINACE - *E.coli* :

3 dráhy - využívají mechanismus 2 řetězcového přerušení \Rightarrow vytvoření Hollidayovy struktury \Rightarrow migrace ramen \Rightarrow štěpení a ligace

Rec BCD enzymy:

- \Rightarrow vytvoření rekombinantních 1 řetězcových oblastí DNA
- \Rightarrow helikázová a exonukleázová aktivita

Bakteriofág λ

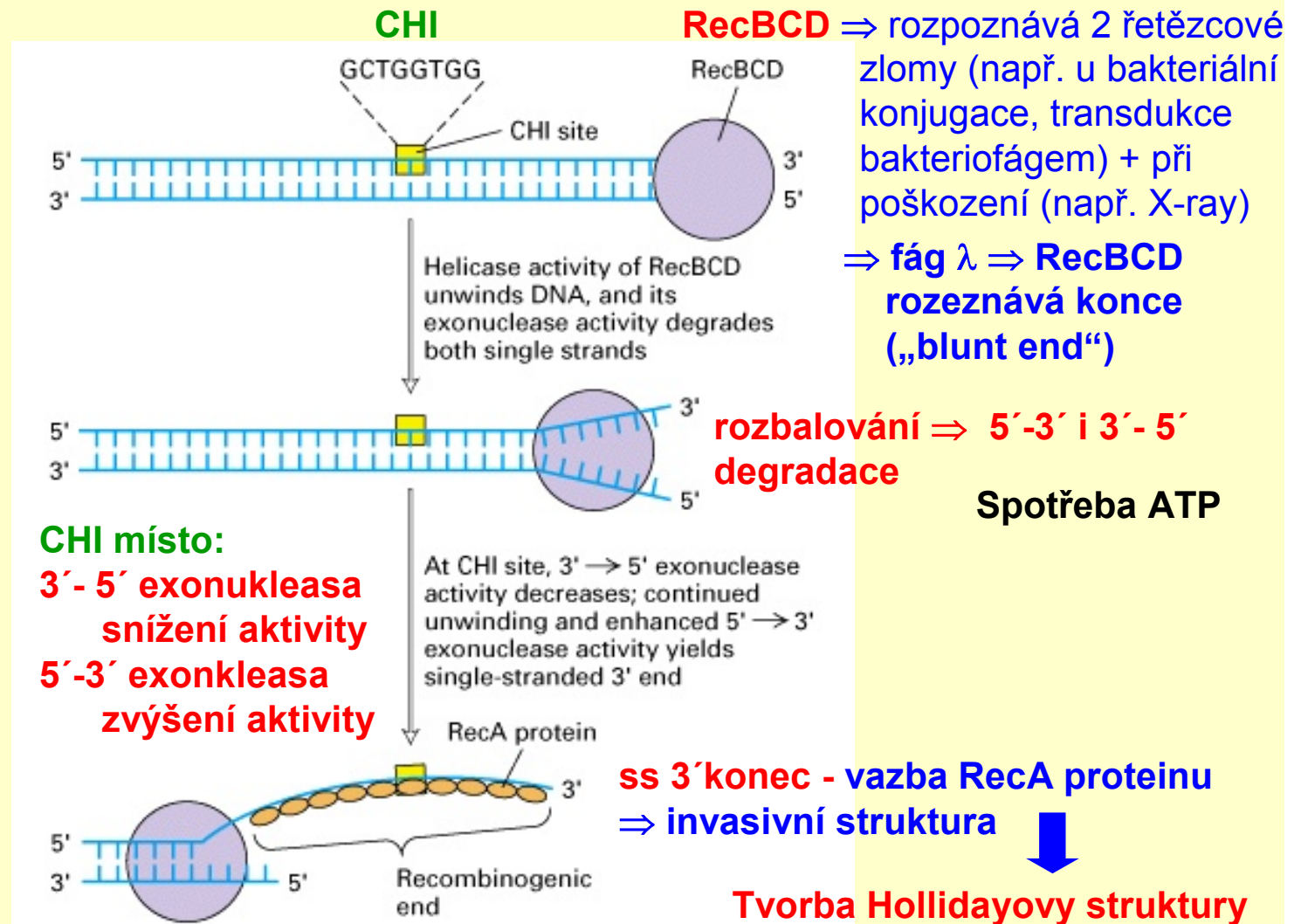
\Rightarrow **CHI** místa \Rightarrow vyšší frekvence rekombinace ve wt buňkách (x recBCD mutanty)

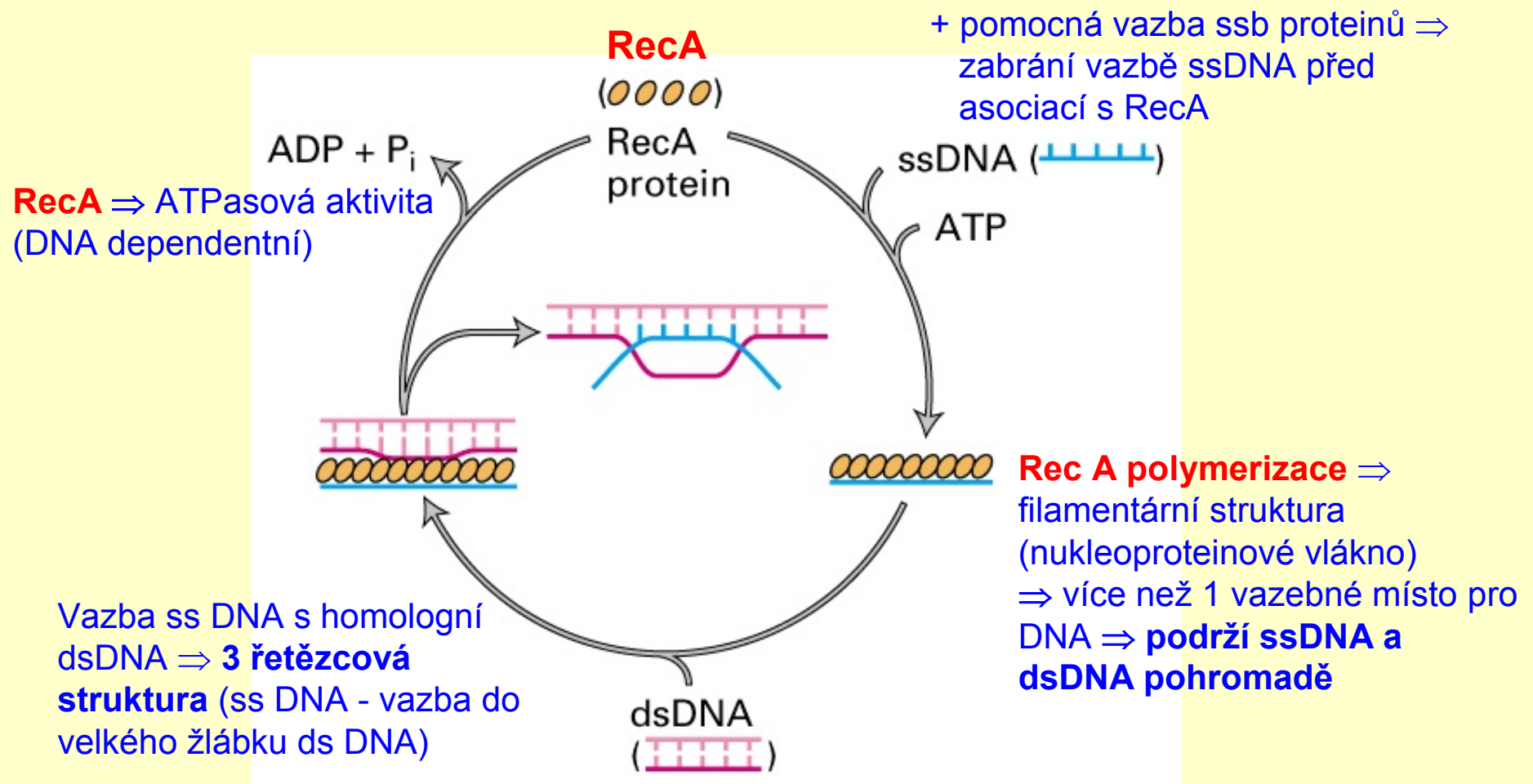
E.coli \Rightarrow

1009 CHI sekvencí (cca 1/5 genů), predikce 80 x

+/- degradace při rozvinování

degradace heterologní DNA bez CHI míst





Tvorba Hollidayovy struktury ⇒ závisí na Rec A

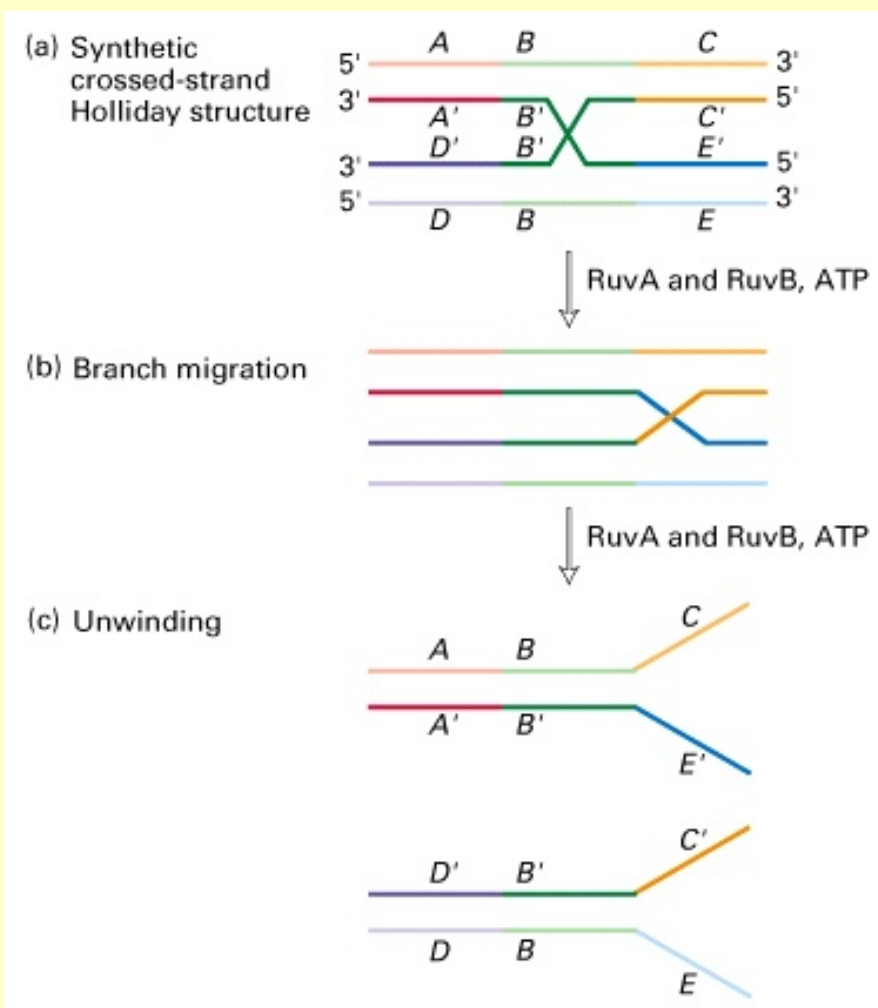
Udržení H-struktury ⇒ na Rec A nezávislé ⇒ další kroky Ruv proteiny

RUV PROTEINY

RuvA: specificky rozeznává Hollidayovu strukturu, tetramer

RuvB: helikázová aktivita \Rightarrow migrace ramen

Umělá Hollidayova struktura - syntetické oligonukleotidy - smíchání



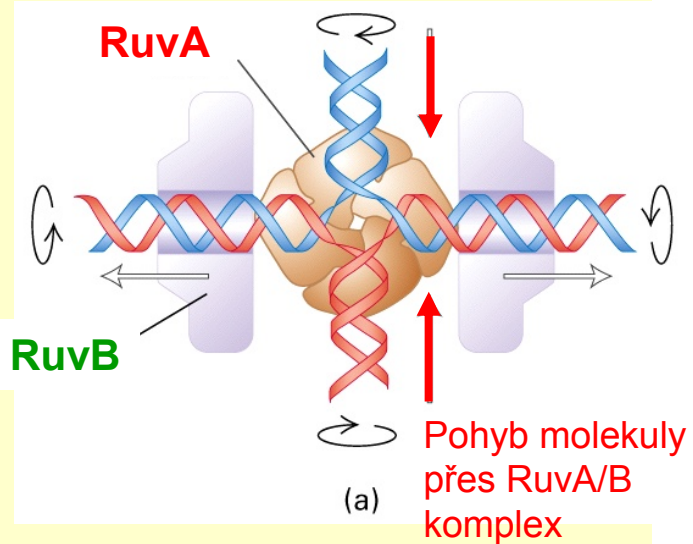
+ RuvA, + RuvB, + ATP

Migrace ramen

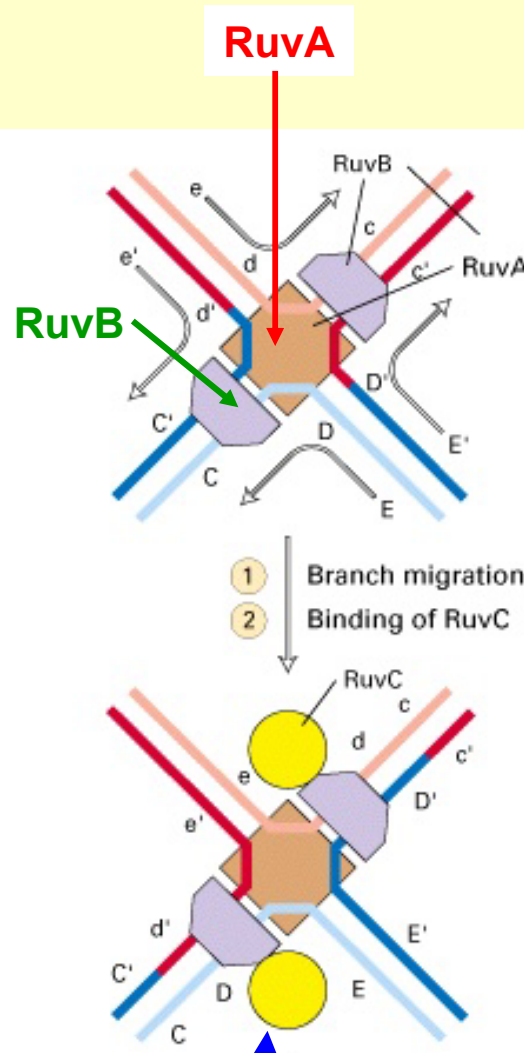
Nehomologní ss konce

Tetramer RuvA

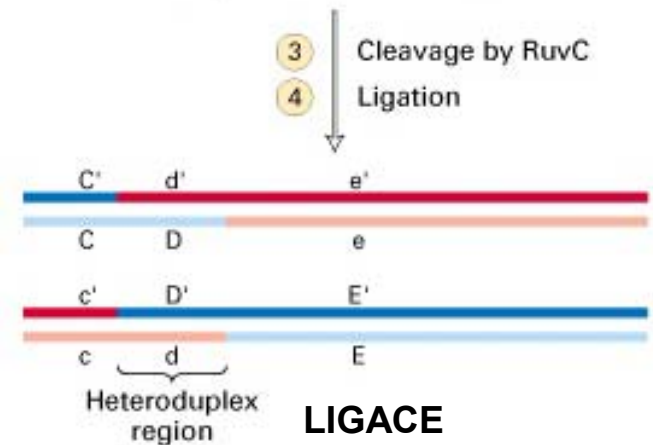
- ⇒ vazba do centra Hollid. struktury
- ⇒ indukce vazby **RuvB** - „kruhová struktura“ - hexamer - DNA uvnitř



- ⇒ ATP hydrolýza ⇒ **RuvB** molekuly otáčejí ds DNA uvnitř ⇒ obrácený pohyb obou konců



RuvC endonukleasa ⇒ štěpení - 180° proti sobě



Rekombinantní molekuly

x štěpení v druhém směru ⇒ není rekombinace

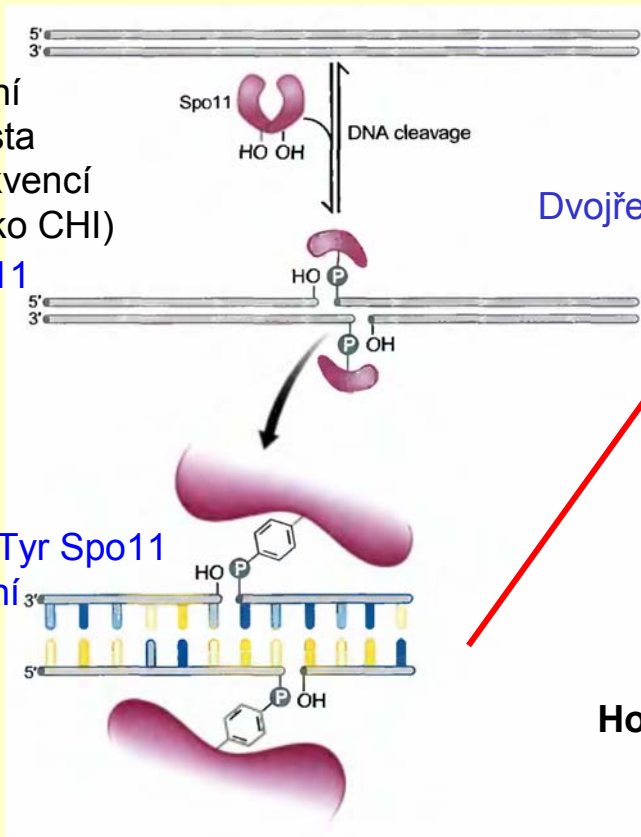
Eukaryota : Homologní rekombinace během meiosis

Spo11 protein

- ⇒ dsDNA štěpení
- ⇒ specifická místa se zvýšenou frekvencí rekombinace (jako CHI)

2 molekuly Spo11

Vazba P-Tyr Spo11
Kovalentní vazba na 5'konec

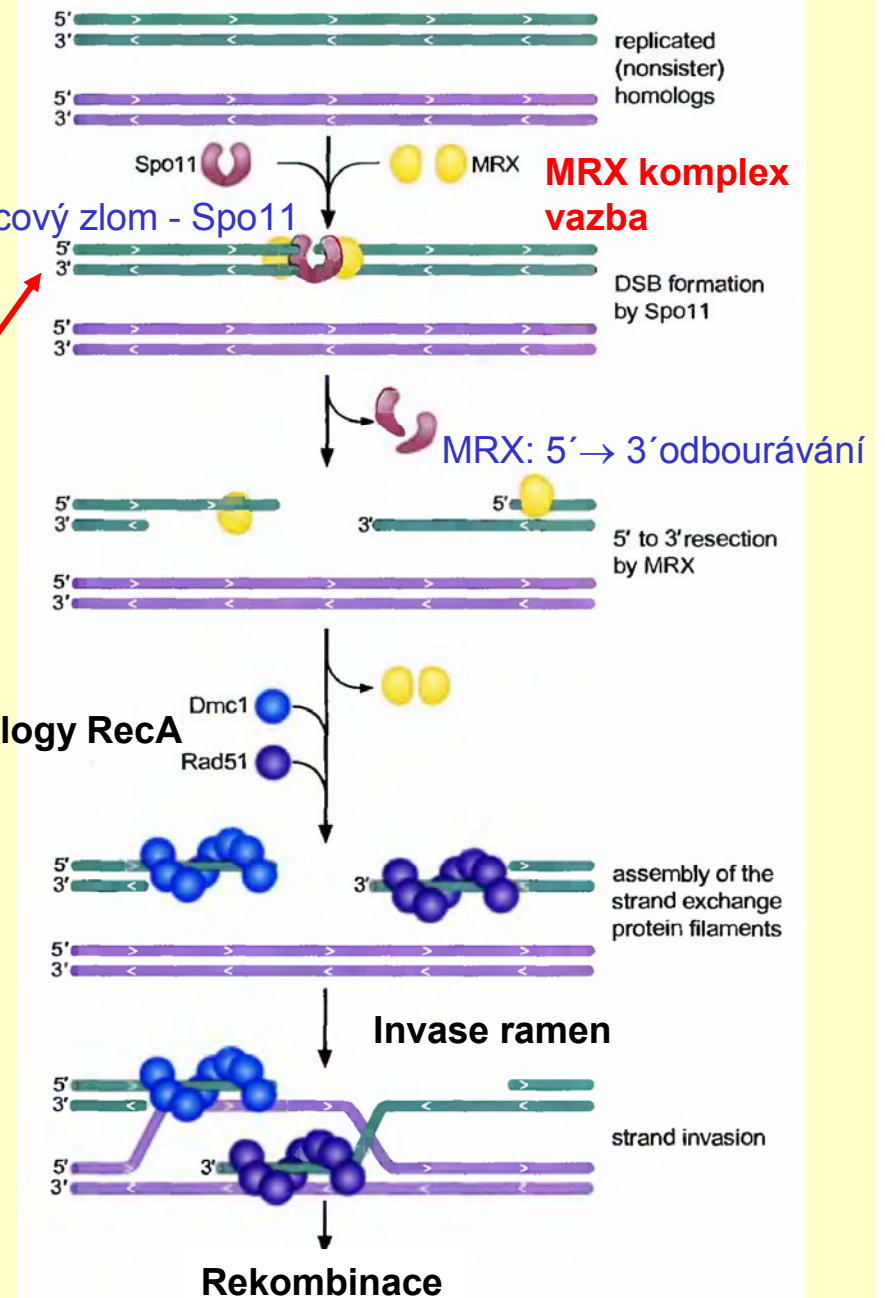


Dvojřetězcový zlom - Spo11

MRX komplex: Mre11, Rad50, Xrs2

- 5'-3' odbourávání, tj z konce s navázaným Spo11, odstranění i Spo11
- ⇒ 3'ss konec dlouhý ~ 1 kbp

Homology RecA: **Dmc1**, **Rad51**



Místně specifická rekombinace

Řízená rekombinačními enzymy rozpoznávajícími specifické nukleotidové sekvence přítomné na **jedné** nebo na **obou** rekombinujících molekulách

Konservativní místně-specifická rekombinace \Rightarrow specifické sekvence na obou DNA, funguje oběma směry (insece, vyštěpení), obnoví se sekvence obou původních molekul
např. **λ -integrace** \Rightarrow integrasa \Rightarrow katalyzuje rekombinaci, vazba na specifické DNA sekvence v genomu faga λ i v genomu bakterie, krátký úsek homologie - vznik heteroduplexu

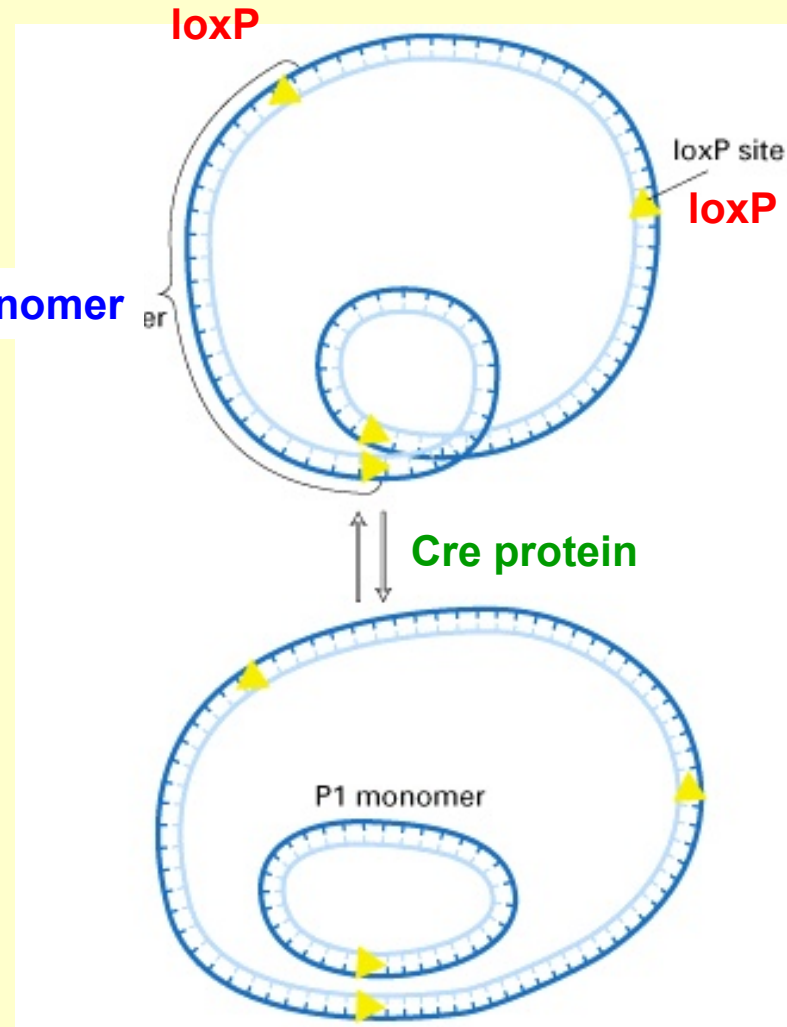
Transposiční místně specifická rekombinace \Rightarrow mobilní DNA sekvence \Rightarrow kódují integrasy
 \Rightarrow insece do genomu, rozpoznávají specifické sekvence mobilního elementu x nevyžadují specifické sekvence v genomu do kterého se integrují, netvoří heteroduplex, nejsou žádné homologie

Integrace bakteriofága P1 - kóduje Cre protein (podobný integrase fága λ)

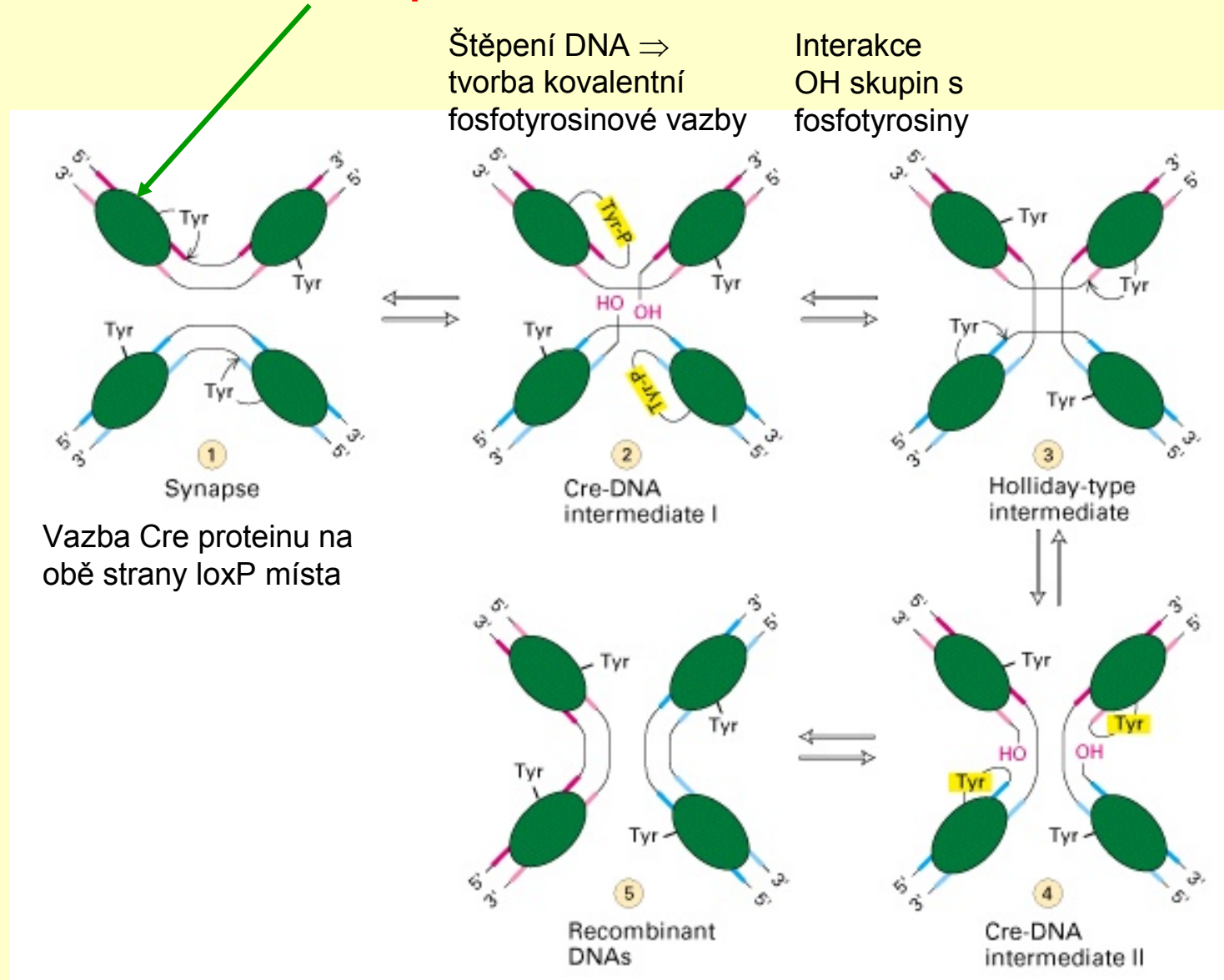
Integrace bakteriofága P1

Replikace fága \Rightarrow multimerní DNA \Rightarrow
rekombinace v **loxP** místech
 \Rightarrow monomery

P1 DNA monomer



Mechanismus funkce Cre proteinu



Využití pro specifické integrační systémy \Rightarrow mnohonásobné delece u kvasinek

MOBILNÍ GENETICKÉ ELEMENTY

Barbara McClintock (1940)

Základní kategorie

- 1) **Transposony** \Rightarrow transposice DNA
- 2) **Retrotransposony** \Rightarrow RNA intermediát

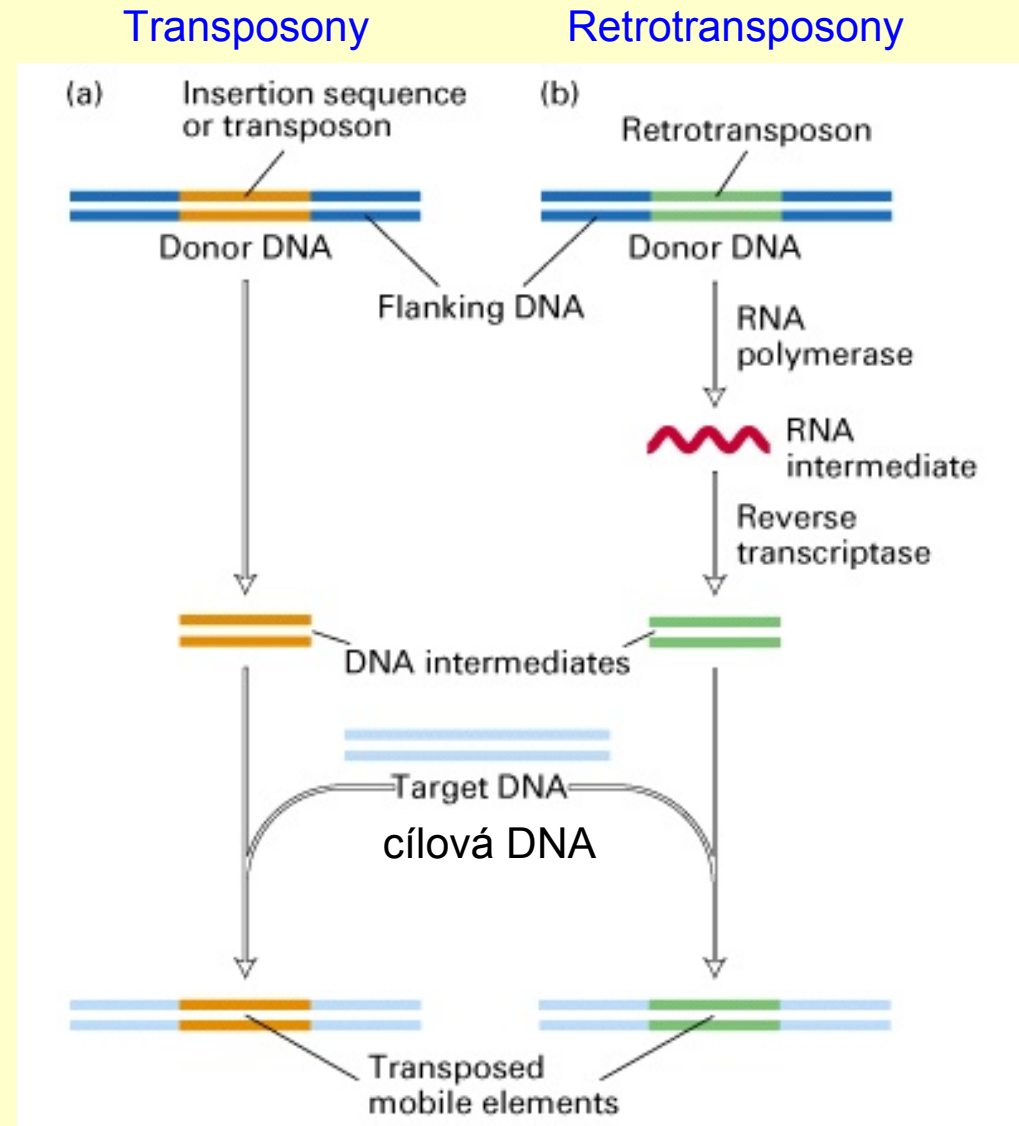
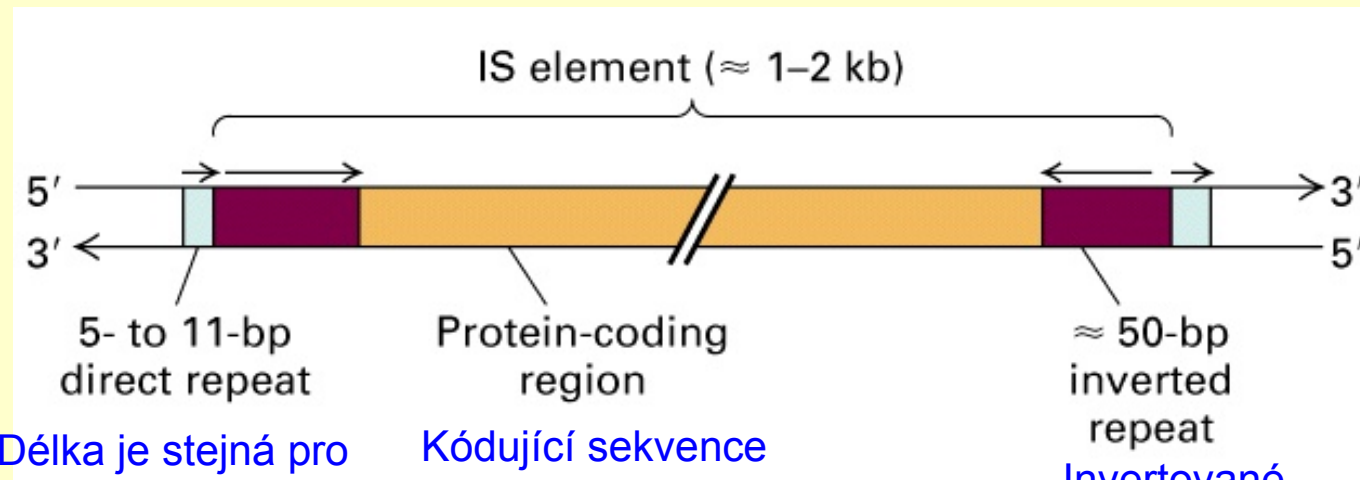


TABLE 9-3 Major Types of Mobile DNA Elements

Type	Structural Features	Mechanism of Movement	Examples
DNA-MEDIATED TRANSPOSITION častější u bakterií			
Bacterial insertion sequences (IS elements)	≈50-bp inverted repeats flanking region encoding transposase and, in some, resolvase	Excision or copying of DNA and its insertion at target site	IS1, IS10
Bacterial transposons	Central antibiotic-resistance gene flanked by IS elements	Copying of DNA and its insertion at target site	Tn9
Eukaryotic transposons	Inverted repeats flanking coding region with introns	Excision of DNA and its insertion at target site	P element (<i>Drosophila</i>) Ac and Ds elements (corn)
RNA-MEDIATED TRANSPOSITION častější u eukaryot			
Viral retrotransposons virové	≈250- to 600-bp direct terminal repeats (LTRs) flanking region encoding reverse transcriptase, integrase, and retroviral-like Gag protein	Transcription into RNA from promoter in left LTR by RNA polymerase II followed by reverse transcription and insertion at target site	Ty elements (yeast) <i>Copia</i> elements (<i>Drosophila</i>)
Nonviral retrotransposons nevirové	Of variable length with a 3' A/T-rich region; full-length copy encodes a reverse transcriptase	Transcription into RNA from internal promoter; folding of transcript to provide primer for reverse transcription followed by insertion at target site	F and G elements (<i>Drosophila</i>) LINE and SINE elements (mammals) <i>Alu</i> sequences (humans)

1. Bakteriální IS elementy (Insertion sequence)

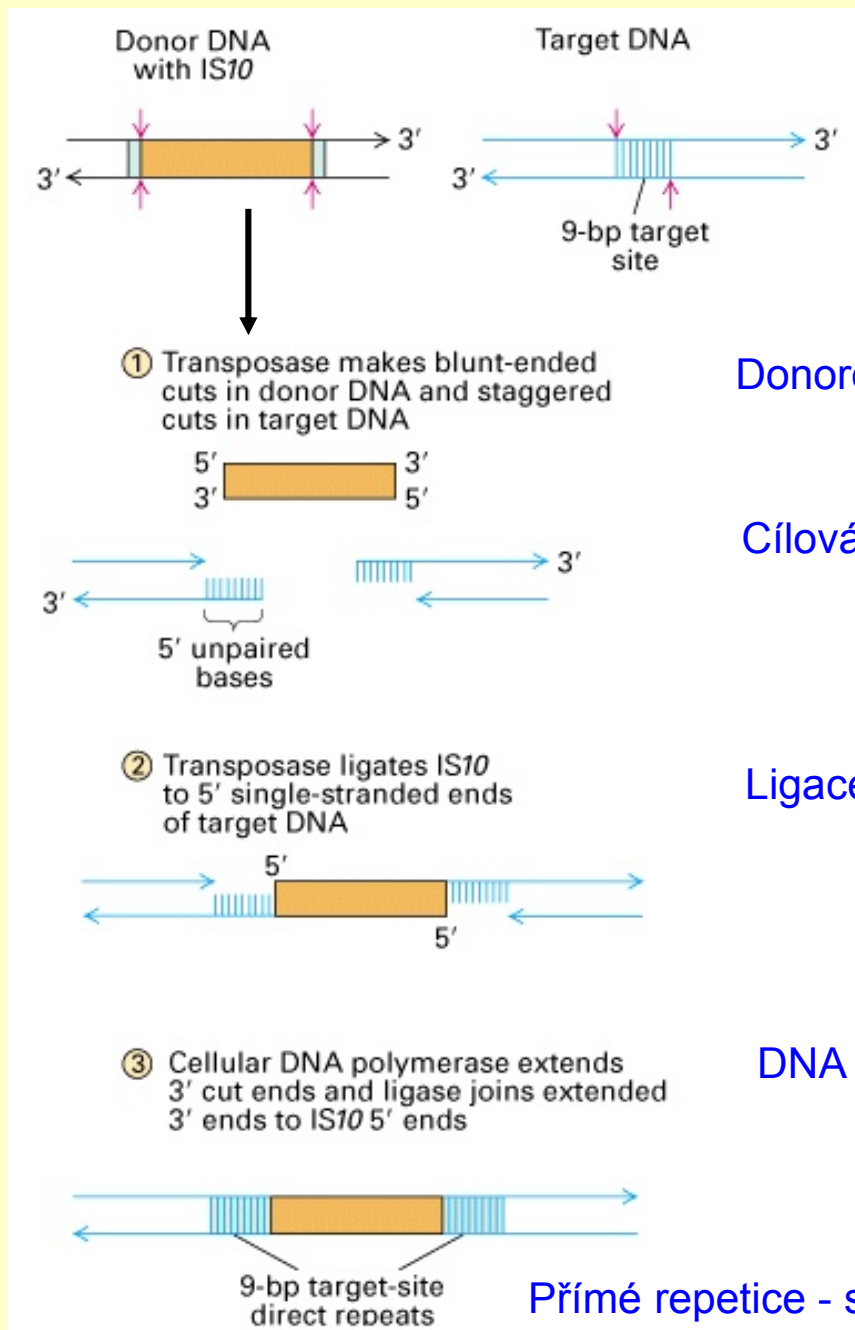
- ⇒ identifikovány elektronovou mikroskopií ⇒ hybridní molekuly DNA wt kmenů a kmenů nesoucích mutace
- > 20 různých IS elementů u *E.coli* a dalších bakterií
- ⇒ transposice IS elementů $1/10^5$ - 10^7 buněk, transposice do náhodného místa, přenos přes plasmidy nebo viry



Délka je stejná pro
daný element x
sekvence různé

Kódující sekvence
⇒ kóduje 1-2 enzymy nutné
pro transposici - nízká hladina
exprese - **TRANSPOSASA**
nereplikativní transposice IS
elementů

Invertované
repetitivní
sekvence



TRANSPOSASA

Donorová DNA \Rightarrow vyštěpení IS („tupé“ konce)

Cílová DNA \Rightarrow štěpení - „kohesivní“ konce

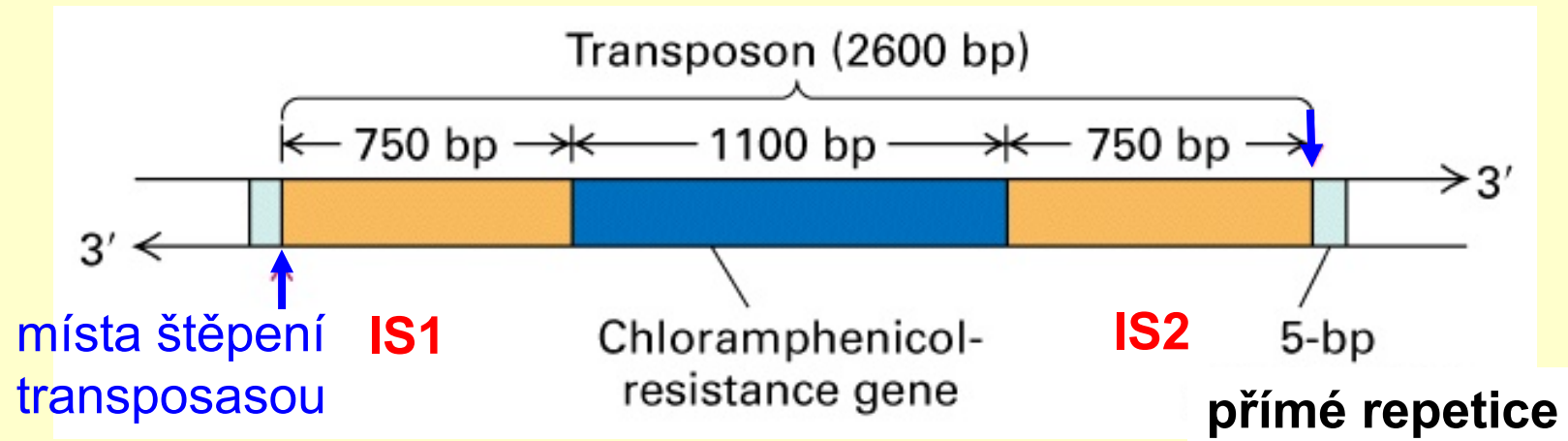
Ligace IS k 5'ss konci cílové DNA \Rightarrow

DNA polymerasa \Rightarrow opraví porušenou sekvenci

Přímé repetice - sekvence cílového místa

2. Bakteriální transposony:

větší než IS elementy, nesou další proteiny, např. resistance k antibiotikům



3. Eukaryotické transposony:

Ac, Ds elementy (kukuřice) ⇒ nerekativní transposice

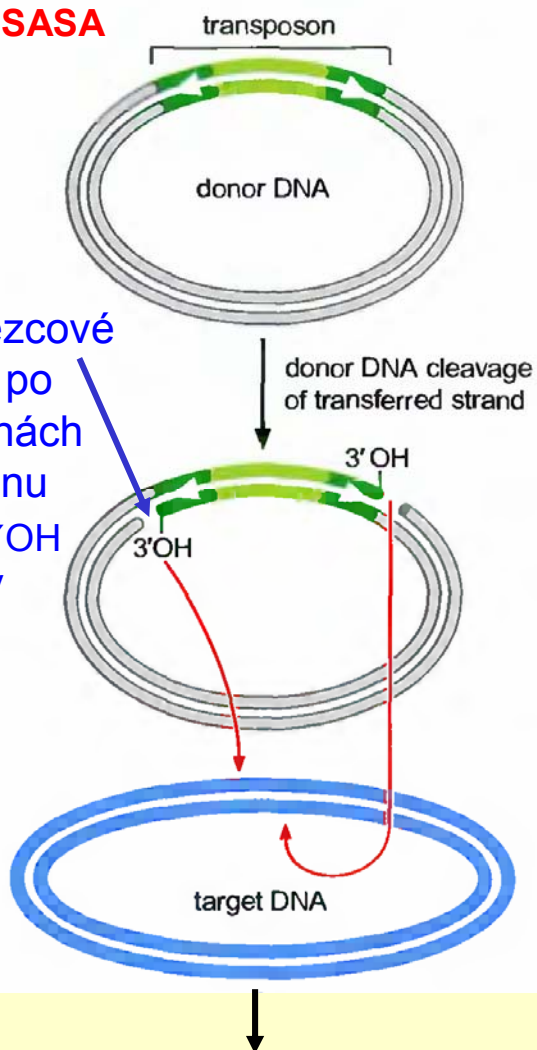
P elementy (Drosophila) ⇒ nerekativní transposice

4. REPLIKATIVNÍ DNA TRANSPOSICE

Bakteriofág Mu (mutator)

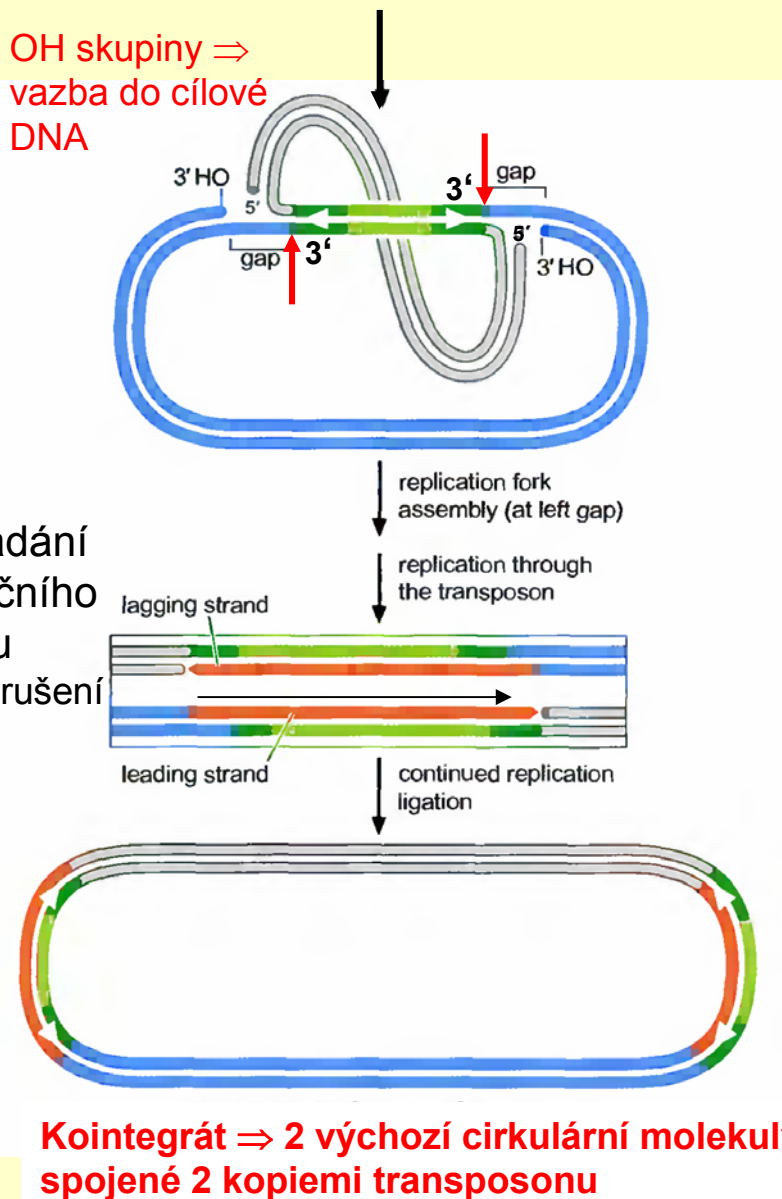
TRANSPOSASA

Jednořetězcové
přerušení po
obou stranách
transposonu
⇒ volné 3'OH
skupiny



OH skupiny ⇒
vazba do cílové
DNA

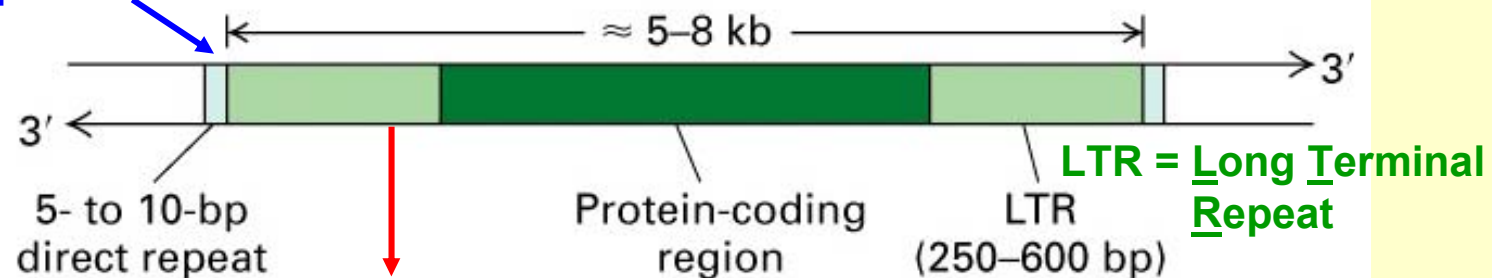
Uspořádání
replikačního
aparátu
levé přerušení



Často reorganisace chromosomu, delece, ? Selektivní nevýhoda replikativní transposice

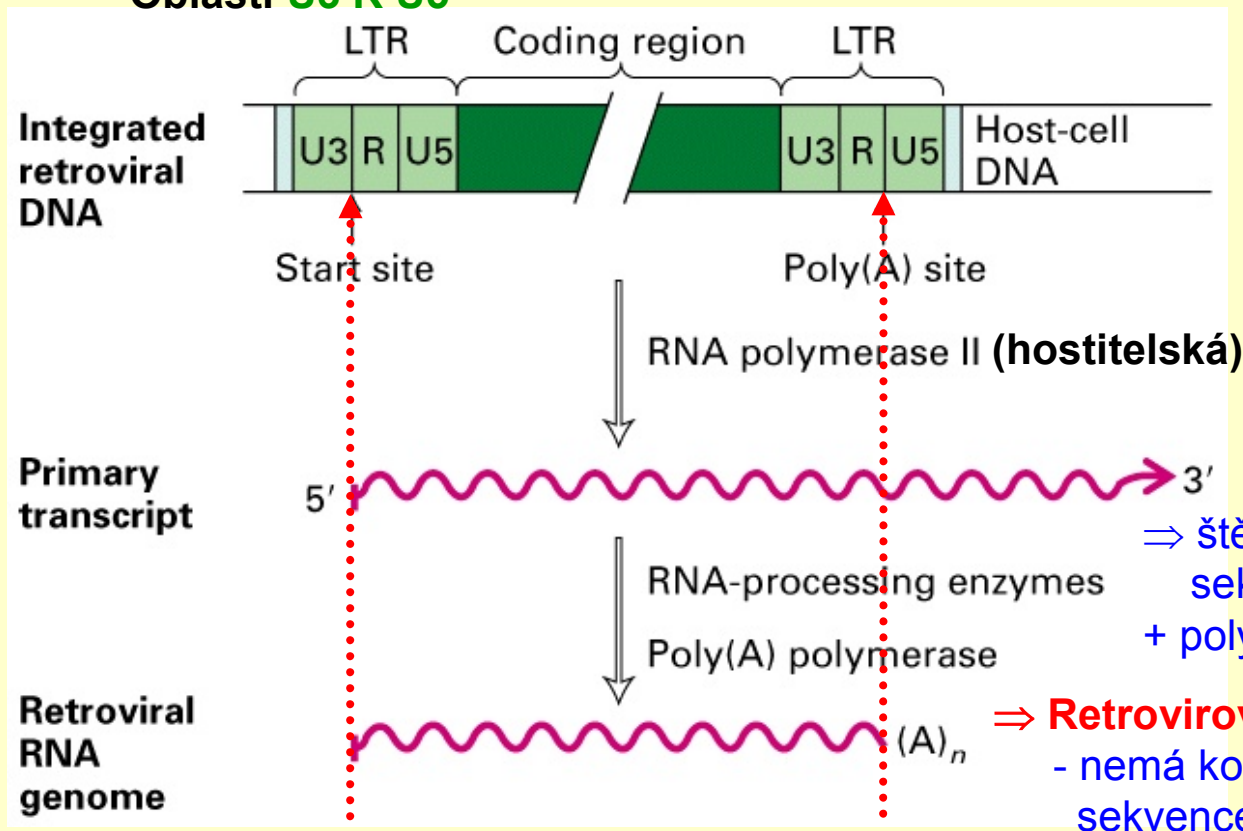
5. Virové retrotransposony: - využití reversní transkriptasy - cca 4 % lidské DNA

Přímé repetice



Obsahuje promotor pro hostitelskou RNA polymerasu II

Oblasti U3 R U5



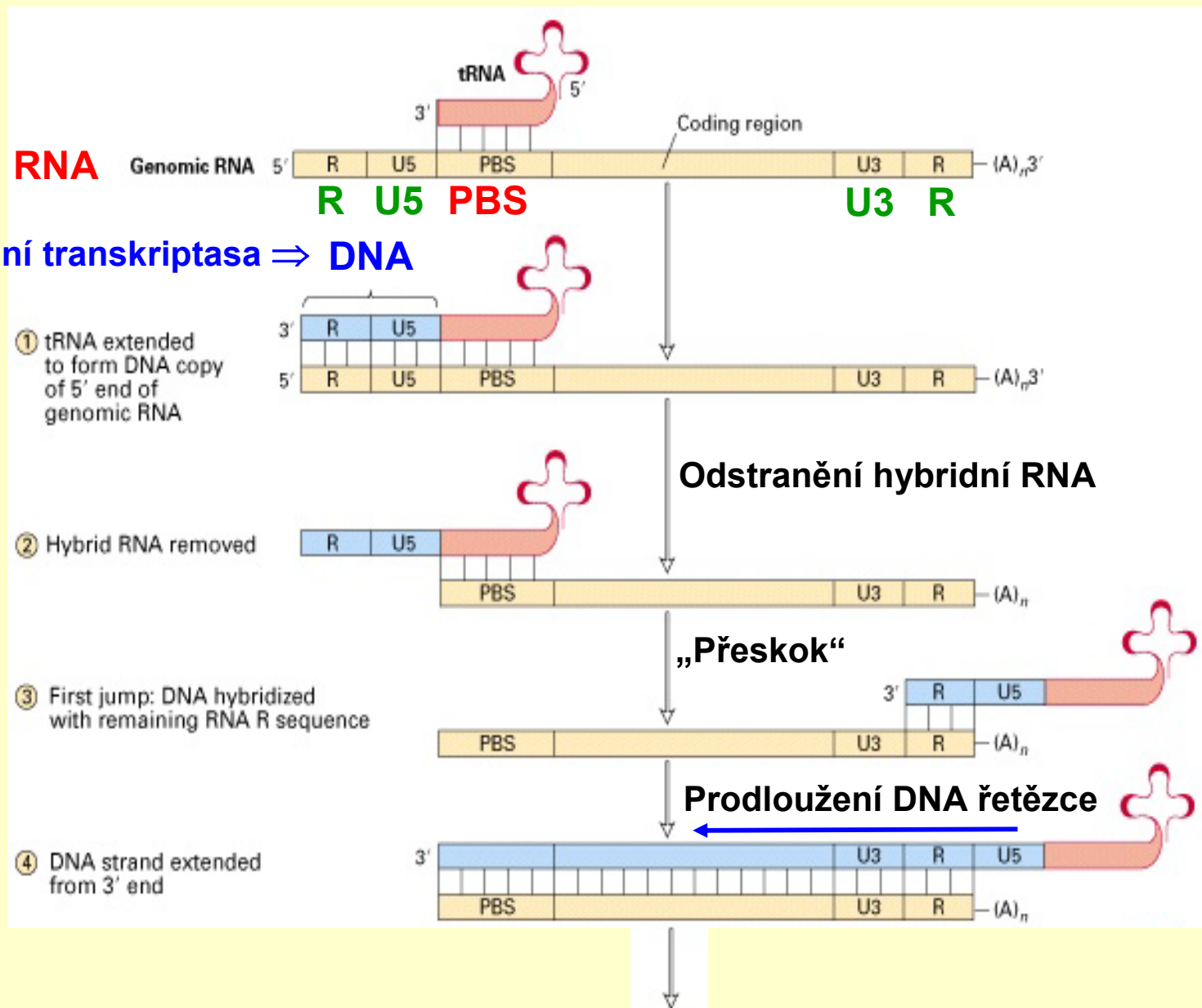
⇒ štěpení vedle pravé R sekvence
+ poly A ocásek

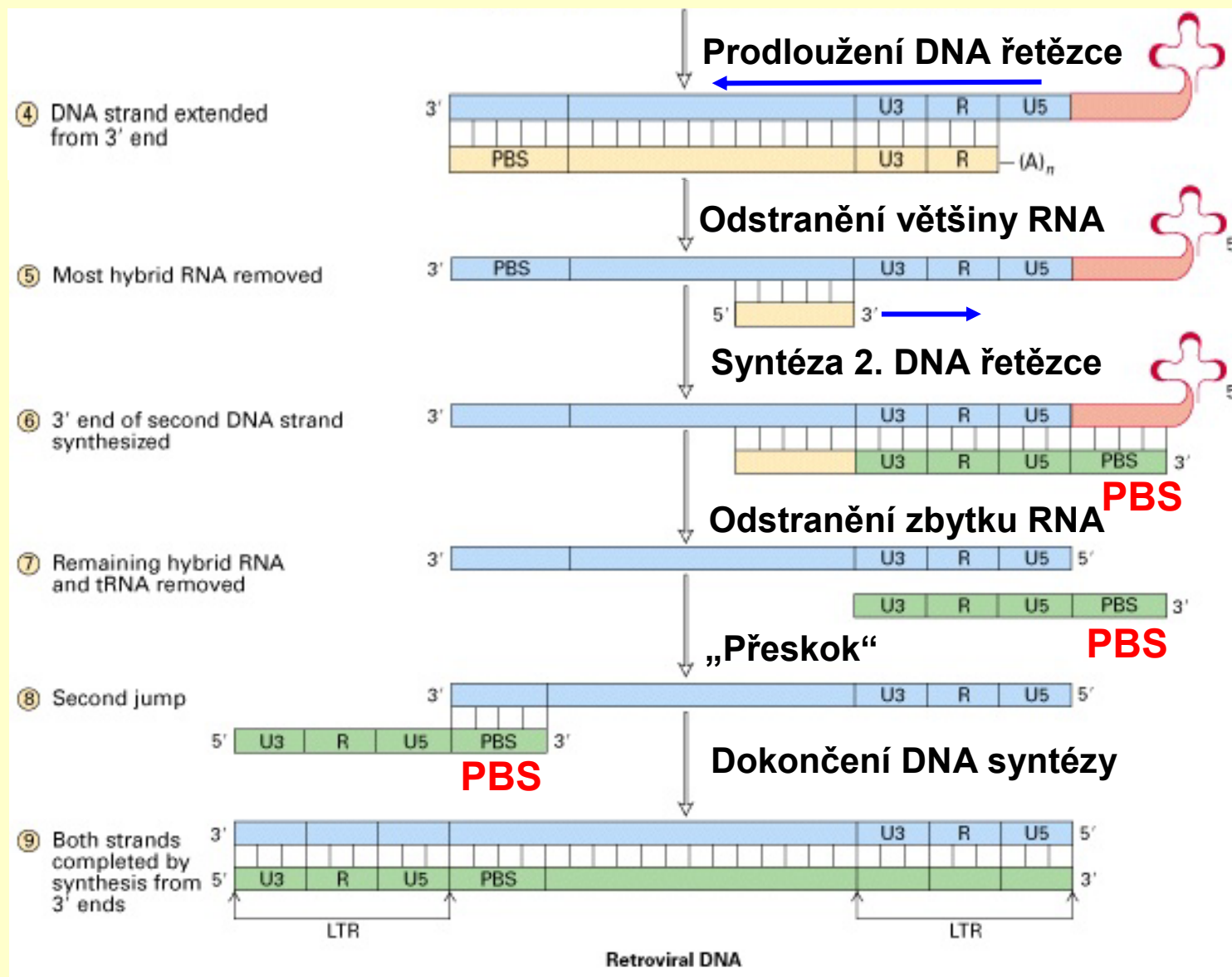
⇒ **Retrovirový RNA genom**
- nemá kompletní LTR sekvence

Úpravy retrovirové genomové RNA ⇒ přidání LTR sekvencí

Buněčná tRNA - vázána na PBS („primer binding site) sekvenci

Reversní transkriptasa ⇒ DNA



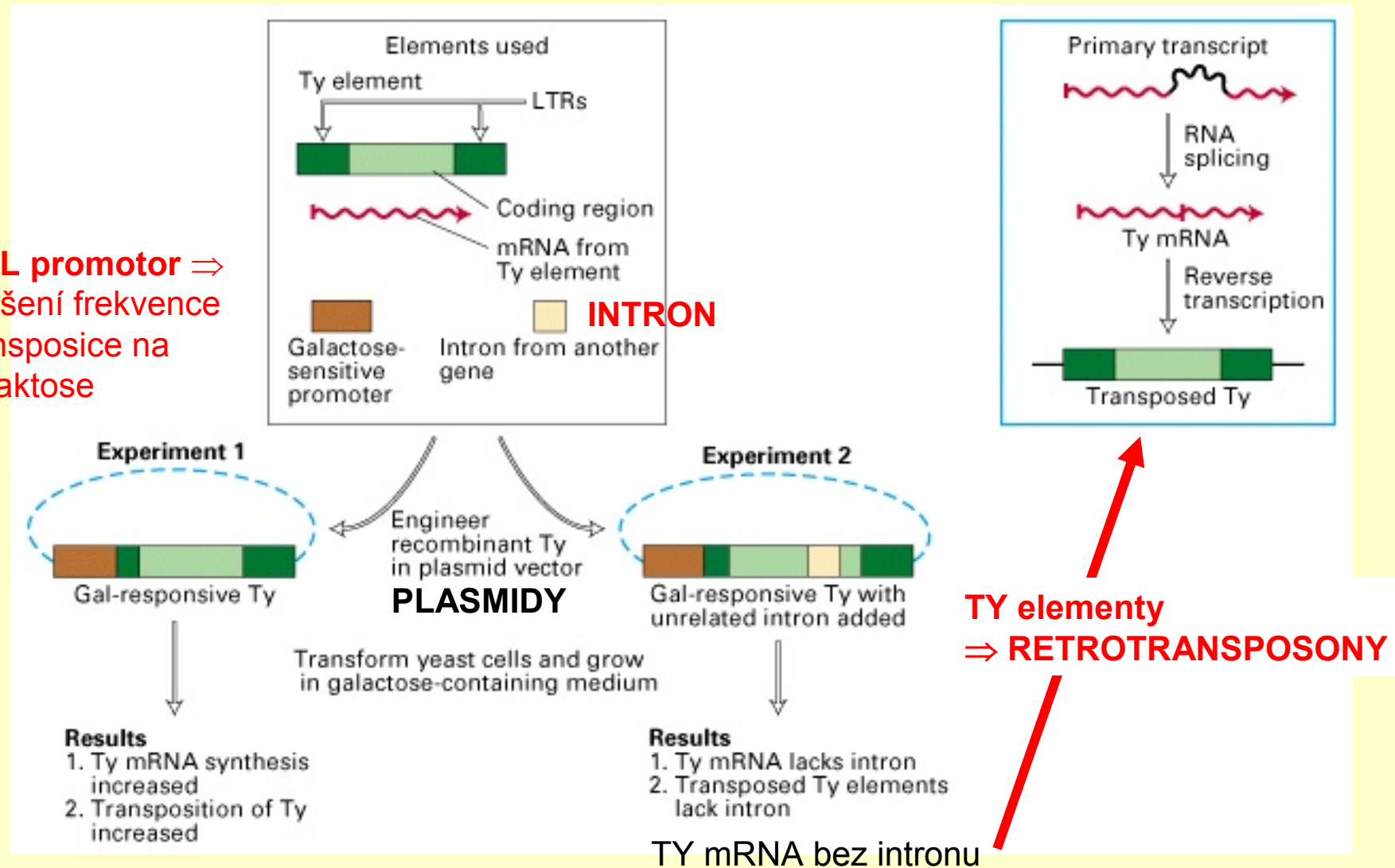


INTEGRACE - enzym **INTEGRASA**, krátké přímé repetice

Retrovirová DNA, Ty elementy kvasinek, Copia elementy *Drosophila* → kódují reversní transkriptasu a integrasu

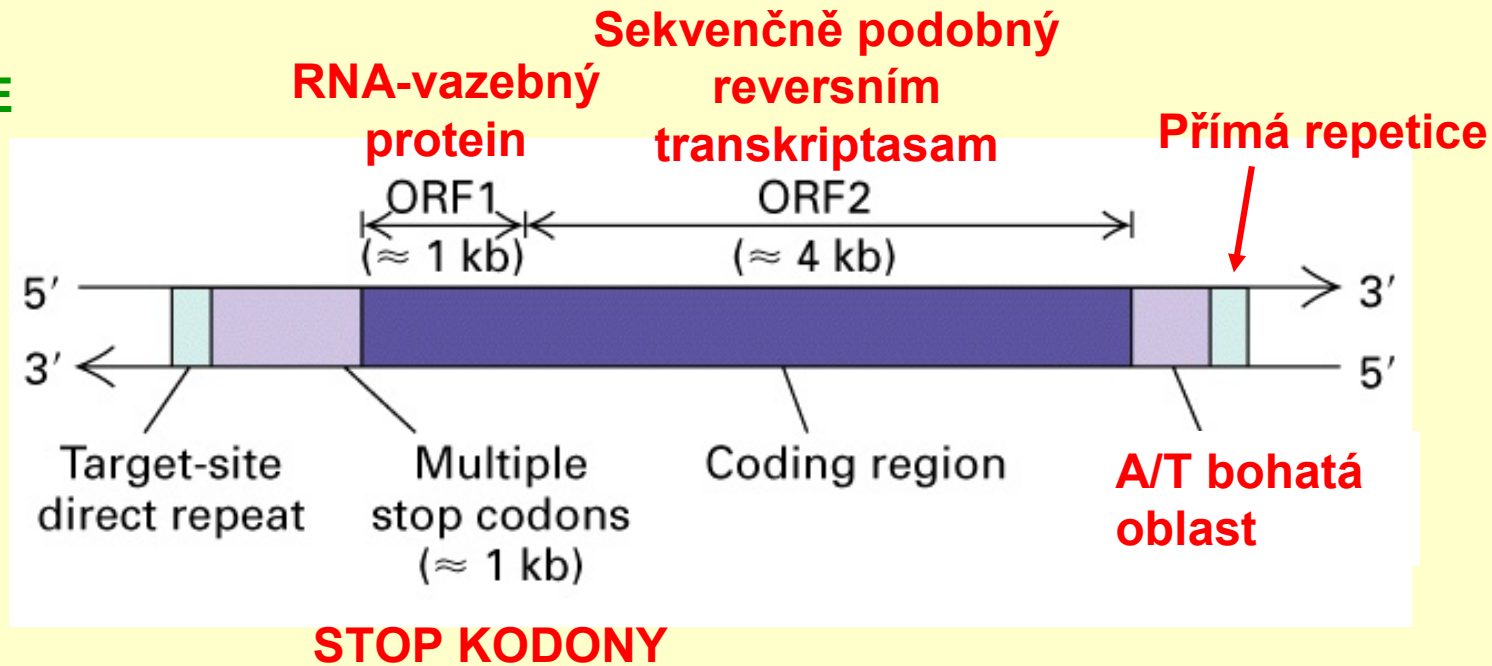
TY ELEMENTY KVASINEK

GAL promotor ⇒
zvýšení frekvence
transposice na
galaktose



6. Nevirové retrotransposony bez LTR:

L1 LINE



LINE 3 (Long Interspersed Elements) ~ 6-7 kbp

SINES (Short Interspersed Elements) ~ 300 bp

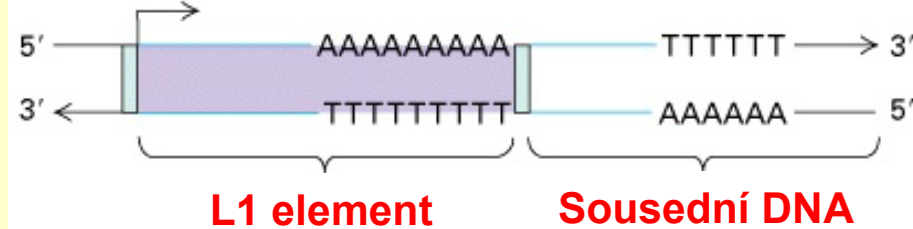
Lidské buňky: ~ 10 skupin LINES
~ 1 skupina SINES

L1 LINE ~ 600 000 kopií / lidský genom, 15 % genomu
- průkaz RNA intermediátu

SINES - Alu sekvence (Alu1) ~ 1 milion míst / lidský genom

Promotor v levé
části L1 elementu

AT bohatá oblast sousední DNA



Transkripce dolního řetězce

An RNA polymerase
transcribes bottom strand



Tvorba vlásenky

RNA folds back on itself with
Us and As hybridizing

③

3' end primes synthesis of DNA
from RNA template by L1
reverse transcriptase



? Syntéza 2. řetězce
? Integrace do genomu

Inserce mobilních elementů:

⇒ mutace (inserce do genů)

⇒ změny exprese (inserce do regulačních oblastí)

⇒ genové duplikace, reorganisace chromosomů

⇒ pseudogeny

.....