



ВОЛГОГРАДСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

Сущность и механизмы генотипической изменчивости. Генетические рекомбинации.

Лектор – доцент кафедры биологии, к.м.н. Сахарова Э.Ю.



ИЗМЕНЧИВОСТЬ

- универсальное свойство биологических систем существовать в различных структурно-функциональных состояниях. Изменчивость проявляется на всех уровнях организации жизни: молекулярно-генетическом, клеточном, организменном, популяционно-видовом и экосистемном, включая биосферу.

Исходной причиной всех видов изменчивости является изменчивость на молекулярно-генетическом уровне – изменчивость структуры и функций генетического материала или других макромолекул.



ИЗМЕНЧИВОСТЬ

Традиционно выделяют два вида изменчивости – фенотипическую и генотипическую.

Фенотипическая изменчивость не связана с изменением в структуре генетического материала и, в подавляющем большинстве случаев, имеет адаптивное значение.

Генотипическая изменчивость в своей основе имеет генетические рекомбинации и мутации.



ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ

– это перераспределение генетического материала (ДНК), приводящее к возникновению новых комбинаций генов.

Механизмы рекомбинации существуют у прокариот и эукариот.

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

Выделяют следующие виды рекомбинаций:

- **Гомологичная**
- **Сайт-специфическая**
- **Транспозиция**
- **Незаконная рекомбинация**



ГОМОЛОГИЧНАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ

Требует протяженной гомологии между рекомбинирующими последовательностями.

Приводит к обмену равными частями гомологичных молекул.

Имеет место:

- при кроссинговере,
- репарации двухцепочечных разрывов хромосом у прокариот, архей и эукариот,
- при горизонтальном переносе генов (у прокариот в ходе конъюгации, трансдукции или трансформации).

В процессе гомологичной рекомбинации между участками ДНК происходят перестройки, но порядок генов остается неизменным.



Изменение же положения различных генов в хромосоме имеет место в ходе сайт-специфической рекомбинации и транспозициях.

Сайт-специфическая рекомбинация происходит между специфическими последовательностями ДНК в пределах очень коротких участков гомологии, обычно 15–30 п.н.

Транспозиция – рекомбинационные процессы, происходящие при перемещении транспозонов – мобильных генетических элементов.



ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ У ПРОКАРИОТ

- **Естественная рекомбинация.** У бактерий естественная генетическая рекомбинация осуществляется путем переноса фрагментов ДНК из одной клетки в другую при трансформации, конъюгации или трансдукции.
- **Рекомбинация путем транспозиции** характеризуется вставкой новых последовательностей ДНК в молекулу хозяина без наличия гомологичности между данными последовательностями.
- **Сайт-специфическая рекомбинация** реализуется между специфическими последовательностями нуклеотидов бактериальной ДНК и ДНК фагов.



КОНЪЮГАЦИЯ

(от лат. conjugatio — соединение) — однонаправленный перенос части генетического материала при непосредственном контакте двух бактериальных клеток.

Посредством конъюгации бактерии обмениваются генетическим материалом, поддерживая своё генетическое разнообразие.

Феномен открыт в 1946 году Джошуа Ледербергом и Эдвардом Татумом у кишечной палочки (*Escherichia coli*).





КОНЪЮГАЦИЯ

Физический контакт между двумя бактериальными клетками обеспечивается половыми **пилями** — полыми белковыми структурами на поверхности клеток.

Как правило, при конъюгации передаются **плазмиды**, которые должны содержать гены, обеспечивающие передачу ДНК: гены белков пилей, гены реплисомы – комплекса белков расплетающих ДНК и пр.

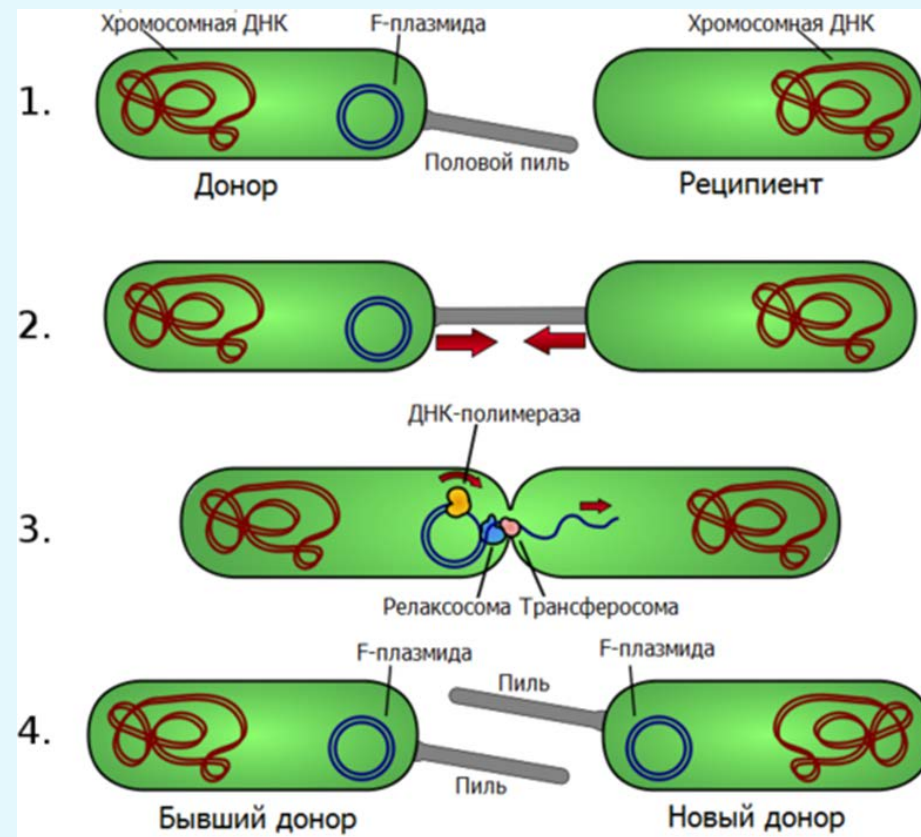
При конъюгации имеет место **однонаправленный перенос** генетического материала **от клетки-донора** (содержит так называемую конъюгативную плазмиду) к **клетке-реципиенту**.



ОБЩАЯ СХЕМА КОНЪЮГАЦИИ

1. Клетка-донор выпускает половой пиль.
2. Пиль прикрепляется к клетке-реципиенту, соединяя две клетки.
3. Передача ДНК через контакт,
4. Хеликаза расплетает плазмидную ДНК, и разрезанная цепь переносится в клетку-реципиент своим 5'-концом вперёд. Параллельно с этим удлиняется её 3'-конец
5. Обе клетки достраивают вторую цепь ДНК

Теперь обе клетки являются полноценными донорами.





Плазмиды в бактериальной клетке могут находиться в свободном состоянии или быть встроенными в хромосому бактерии (находится в геноме в виде **ЭПИСОМЫ**).

Клетки с такими встроенными плазмидами называются **Hfr** (от high frequency of recombination), поскольку при их передаче клетка-реципиент часто получает и фрагмент геномной ДНК, который использует для рекомбинации.

Для переноса полного генома требуется около 100 минут (очень долго), поэтому бактерии-партнёры разрывают контакт раньше, чем успеет перенестись вся геномная ДНК.



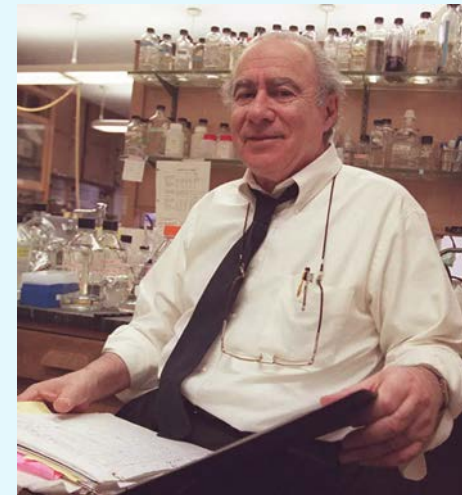


ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСДУКЦИЯ

— процесс переноса ДНК между клетками при помощи вирусов.

Примером является перенос ДНК бактерий из одной клетки в другую с помощью бактериофага.

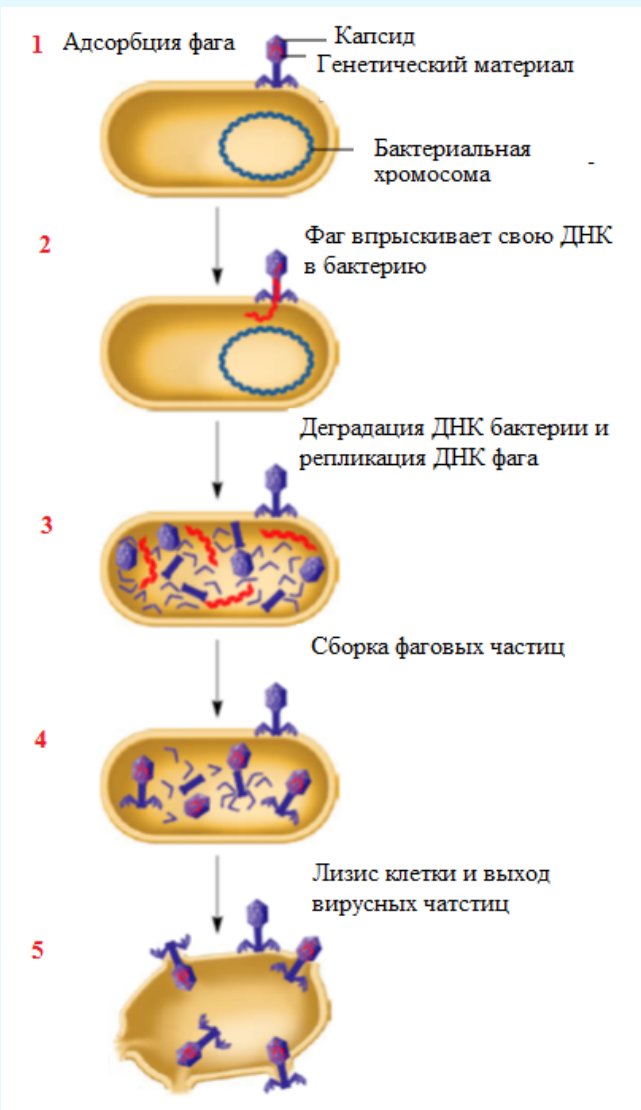
Трансдукция была описана Нортоном Зиндером и Джошуа Ледербергом в 1952 году у *Salmonella*.





Общая схема процесса:

1. Фаг адсорбируется на поверхности бактерии и впрыскивает свою ДНК.
2. Деградация клеточной ДНК и репликация ДНК фага
3. Сборка белковых компонентов фаговых частиц. В головку фага могут попасть фрагменты бактериальной ДНК.
4. Разрушение клетки и выход вирусных частиц.
5. При атаке на следующую клетку фаг инъецирует в неё и фрагмент бактериальной ДНК:





При атаке на следующую клетку фаг инъецирует в неё и фрагмент бактериальной ДНК:

может остаться в цитоплазме, реплицироваться не будет и попадет при делении лишь в одну из дочерних клеток – **абортивная трансдукция**;

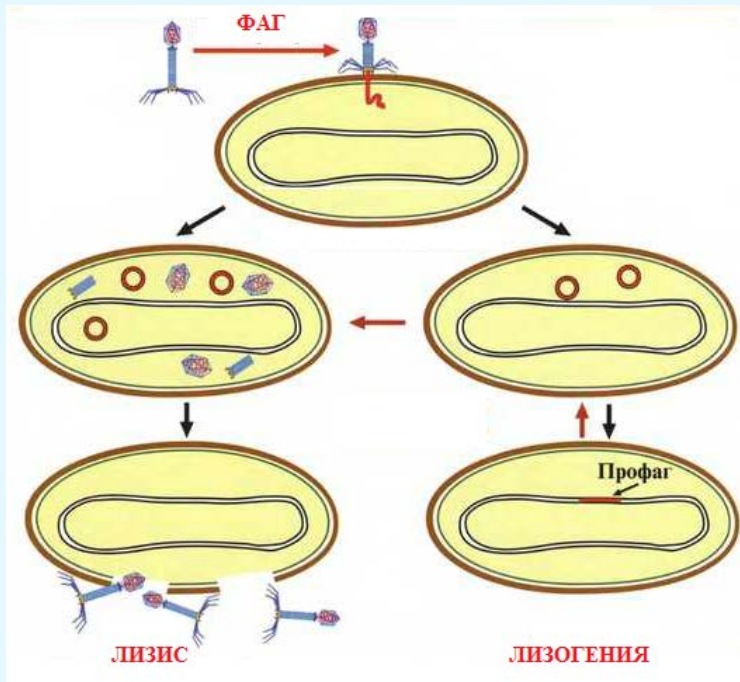
- может рекомбинировать с гомологичным участком хромосомы инфицированной клетки, тогда трансдуцированные гены реплицируются в составе этой хромосомы и в процессе деления передаются во все дочерние клетки – **полная трансдукция**. При этом она будет и *неспецифическая* (общая), так как любой участок генома бактерии-донора может стать трансдуцированным фрагментом.



БАКТЕРИОФАГИ

Вирулентные

Литическая стратегия:
вызывают лизис клетки



Умеренные

Лизогенная стратегия:

интегрируются в бактериальную хромосому и в пребывают в состоянии профага.

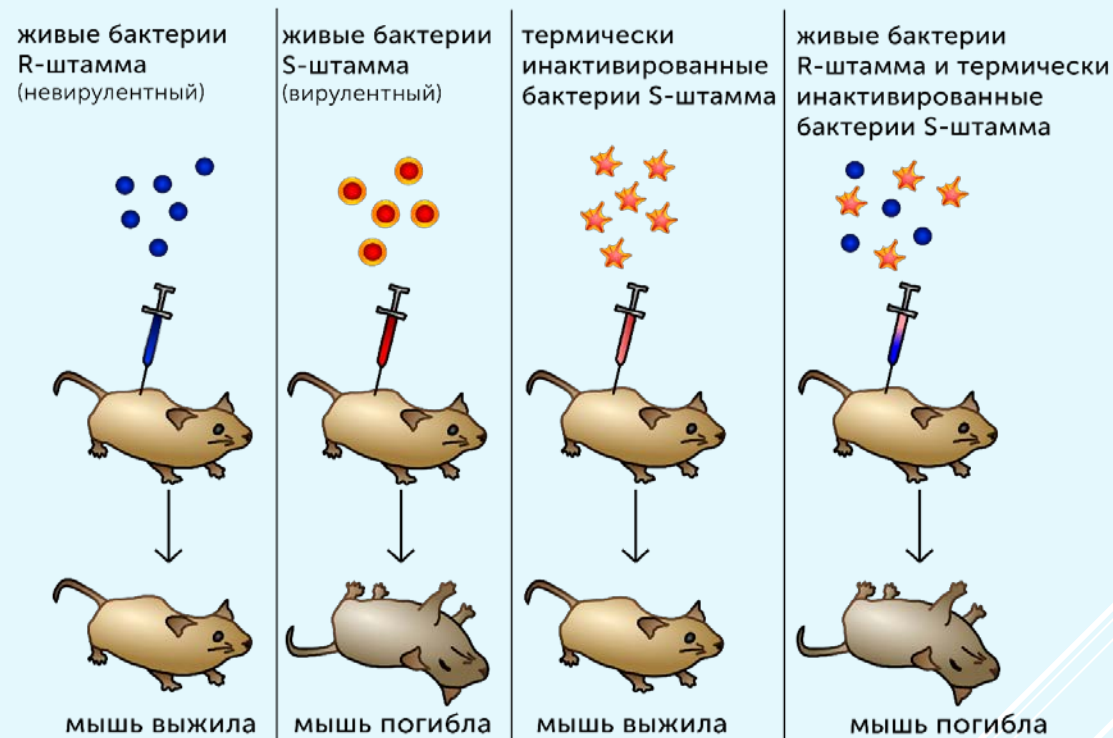
Может переходить к литической стратегии: вырезаются из генома хозяина, они иногда захватывают с собой один или несколько генов хозяина. Такую трансдукцию называют *специфической (локализованной)*.



ТРАНСФОРМАЦИЯ

— процесс поглощения бактериальной клеткой молекулы ДНК из внешней среды.

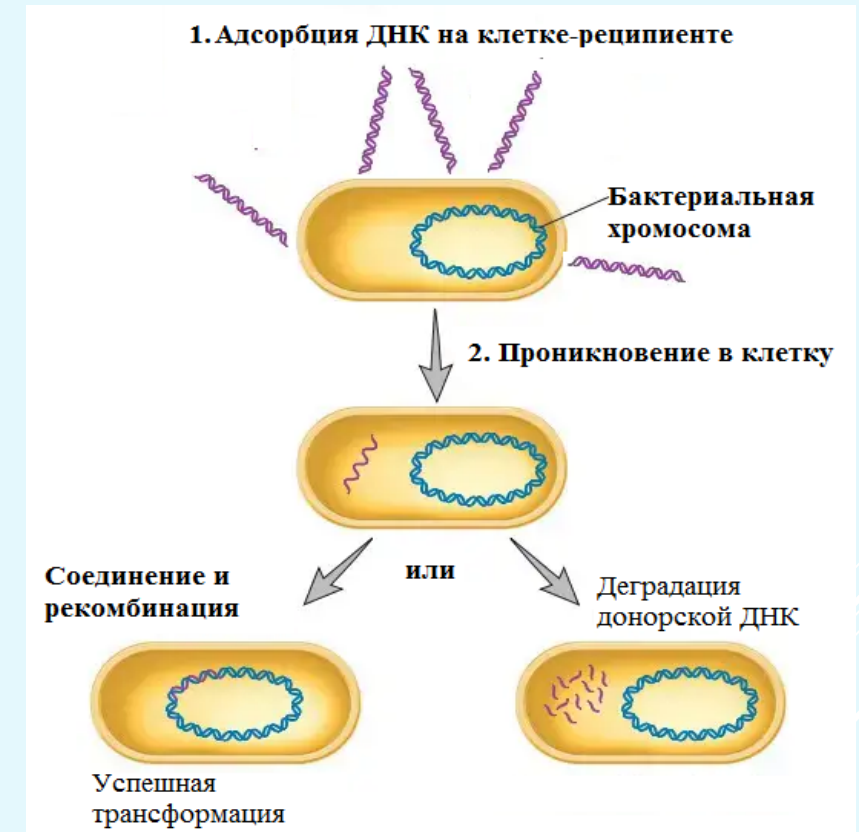
Впервые явление трансформации наблюдал в 1928 году Фредерик Гриффит.





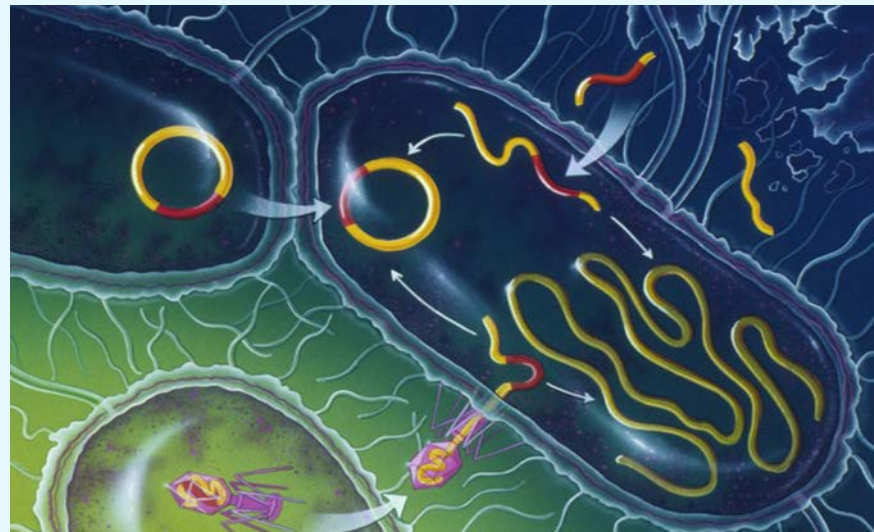
Этапы бактериальной трансформации:

1. Развитие компетентности
2. Связывание ДНК с поверхностью клетки (адсорбция).
3. Обработка и поглощение ДНК.
4. Интеграция ДНК в хромосому хозяина и гомологичная рекомбинация с ДНК бактерии.





Конъюгация, трансдукция и трансформация являются механизмами горизонтального переноса генов.





САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ

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

Широко распространена у прокариот и низших эукариот. Сайт-специфическая рекомбинация обеспечивает интеграцию (включение) ДНК умеренных фагов в хромосомы бактерий.

Самым известным примером сайт-специфической рекомбинации **интеграция умеренного бактериофага лямбда в клетку E. coli.**

Фаг лямбда был обнаружен Эстер Ледерберг в 1950 году.

И бактериофаг, и E. coli являются классическими модельными объектами в молекулярной биологии.





Интеграция фага идет по лизогенному пути.

Интеграция происходит путем рекомбинации между att (attachment) – сайтами: attP в хромосоме фага и attB в хромосоме бактерии.

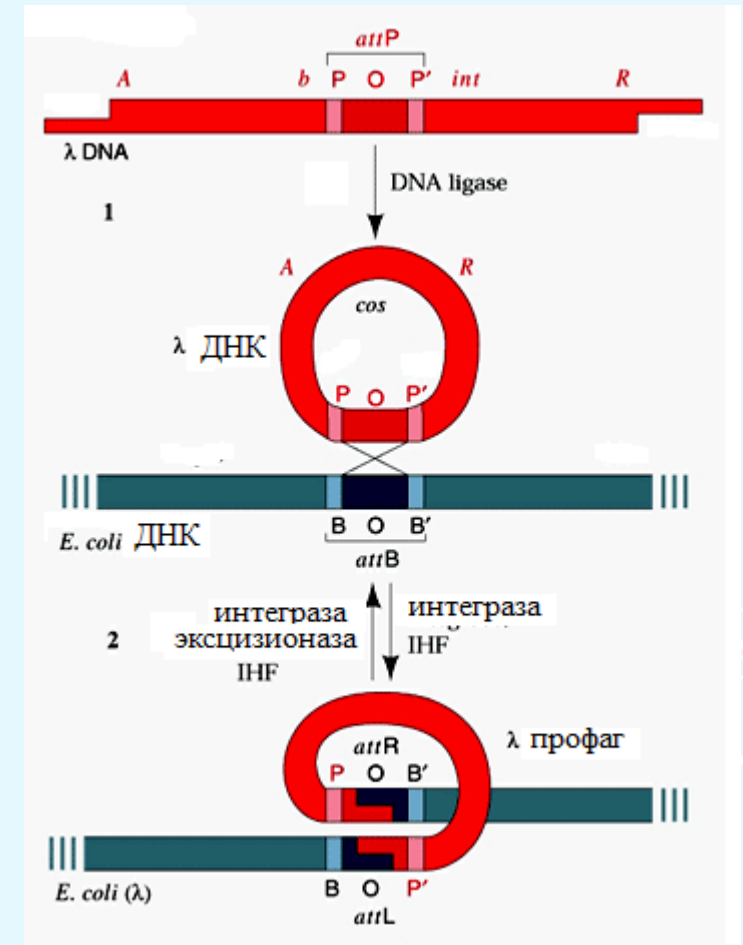
attP (ROP') 150 нк влево (P) и 75 нк вправо (P') от общего ядра, а attB (BOB') – 25 нк.

attP (ROP') и attB (BOB') имеют общее ядро (O).

Обмен происходит через образование **структуры Холлидея** и требует фагового белка **интегразы** и бактериального белка **IHF** (англ. integration host factor).

Оригинальная BOB' последовательность заменяется интеграцией на B-O-P'-фаг ДНК-P-O-B'.

ДНК фага теперь — часть генома хозяина.





ТРАНСПОЗИЦИИ

- рекомбинационные процессы, связанные с перемещением **транспозонов**
- разновидности мобильных генетических элементов.

Открыты Барбарой Мак-Клинток в 1946 году при изучении кукурузы.

Лишь в 1983 году за это открытие была присуждена Нобелевская премия.





ТРАНСПОЗИЦИИ

Транспозоны относятся к повторяющимся элементам генома, которые могут располагаться в тандеме (микросателлиты, теломеры и т. д.) и могут быть рассеяны по геному.

У разных видов транспозоны распространены в разной степени:

У человека до 45 % всей последовательности ДНК,

У *Drosophila melanogaster* 15—20 % всего генома.

У кукурузы более 85 %.

Длина различных транспозонов варьирует от 1000 до 20 000 п.н.

Транспозоны формально относятся к некодирующей части генома.

Некоторые классы транспозонов содержат гены ферментов, необходимых для их перемещения: **транспозаза, интеграза, ривертаза** и др.



ВИДЫ ТРАНСПОЗОНОВ

Вид	Строение	Форма при перемещении	Ферменты	Механизм
ДНК транспозоны	Имеют инвертированные повторы	Перемещаются в виде ДНК	транспозаза	«вырезать-вставить»
Ретровирусподобные ретротранспозоны	Имеют LTR	Перемещаются в виде РНК	обратная транскриптаза, интеграза	«копировать-вставить»
Неретровирусподобные ретротранспозоны	Не имеют LTR	Перемещаются в виде РНК	обратная транскриптаза, эндонуклеаза	«копировать-вставить»



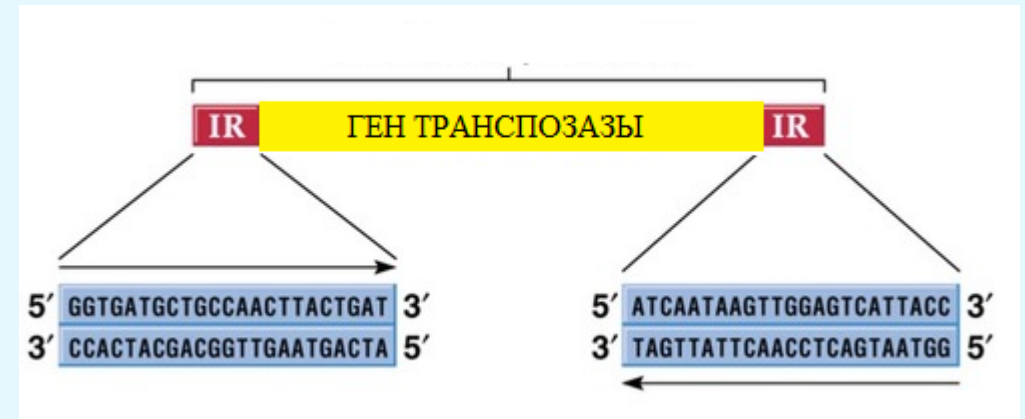
ДНК ТРАНСПОЗОНЫ

ДНК-транспозоны передвигаются способом «**вырезать и вставить**» благодаря комплексу ферментов **транспозаза**.

Ген транспозазы в последовательности транспозона.

На концах участков ДНК-транспозона расположены инвертированные повторы, которые являются участками узнавания транспозазы.

Транспозаза способна делать двухцепочные разрезы ДНК, вырезать и вставлять в ДНК-мишень транспозон

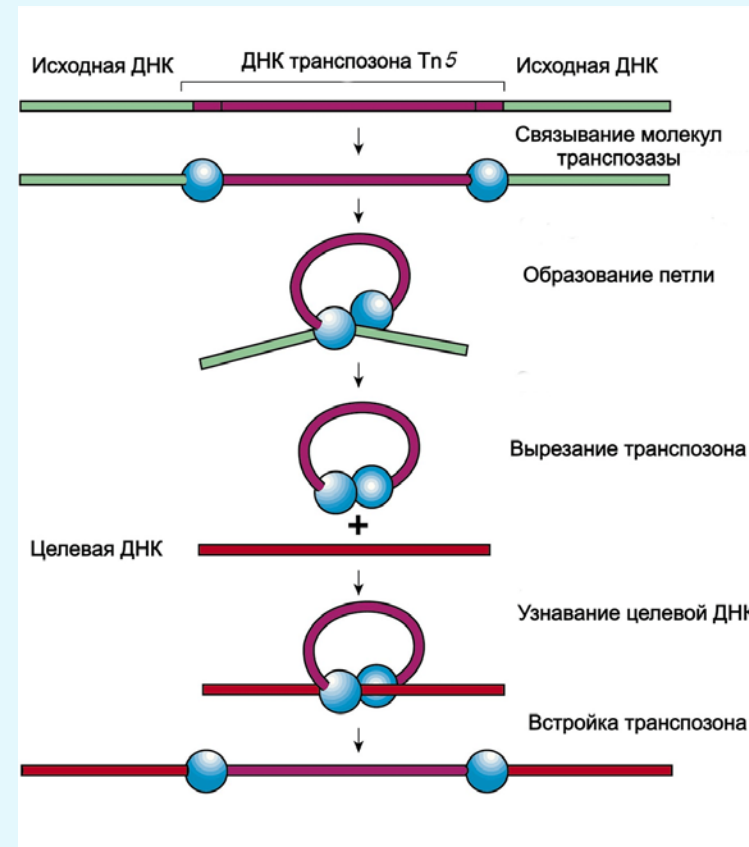
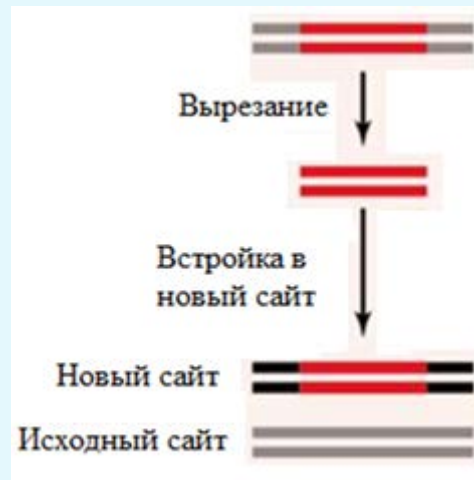




ДНК ТРАНСПОЗОНЫ

Механизм работы
транспозазы:

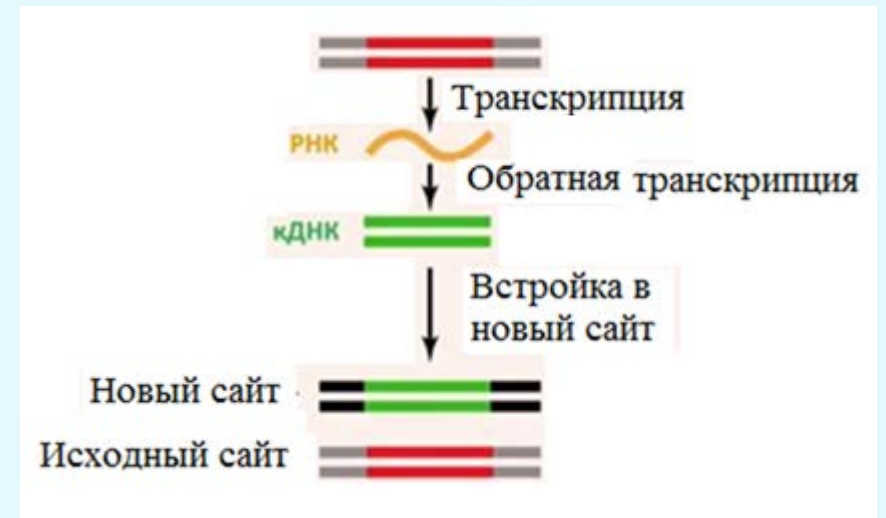
1. Фермент разрезает ДНК, вырезая транспозон по инвертированным последовательностям,
2. Вставляет транспозон в целевую последовательность





Механизм вставки ретротранспозона с LTR:

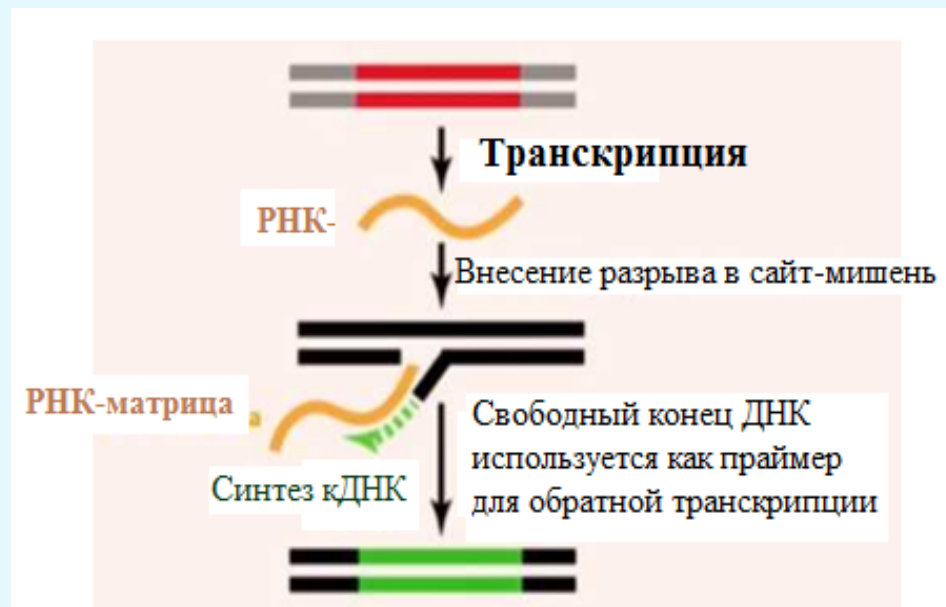
1. Транскрипция РНК
2. Образование кДНК (копии ДНК) путем обратной транскрипции с помощью обратной транскриптазы
3. Репликация копии ДНК
4. Вставка копии ДНК в целевую последовательность с помощью интегразы.





Механизм вставки ретротранспозона без LTR:

1. Транскрипция РНК
2. Внесение разрыва в сайт –мишень с помощью эндонуклеазы.
3. Синтез копии ДНК. При этом свободный конец ДНК используется как праймер для обратной транскрипции



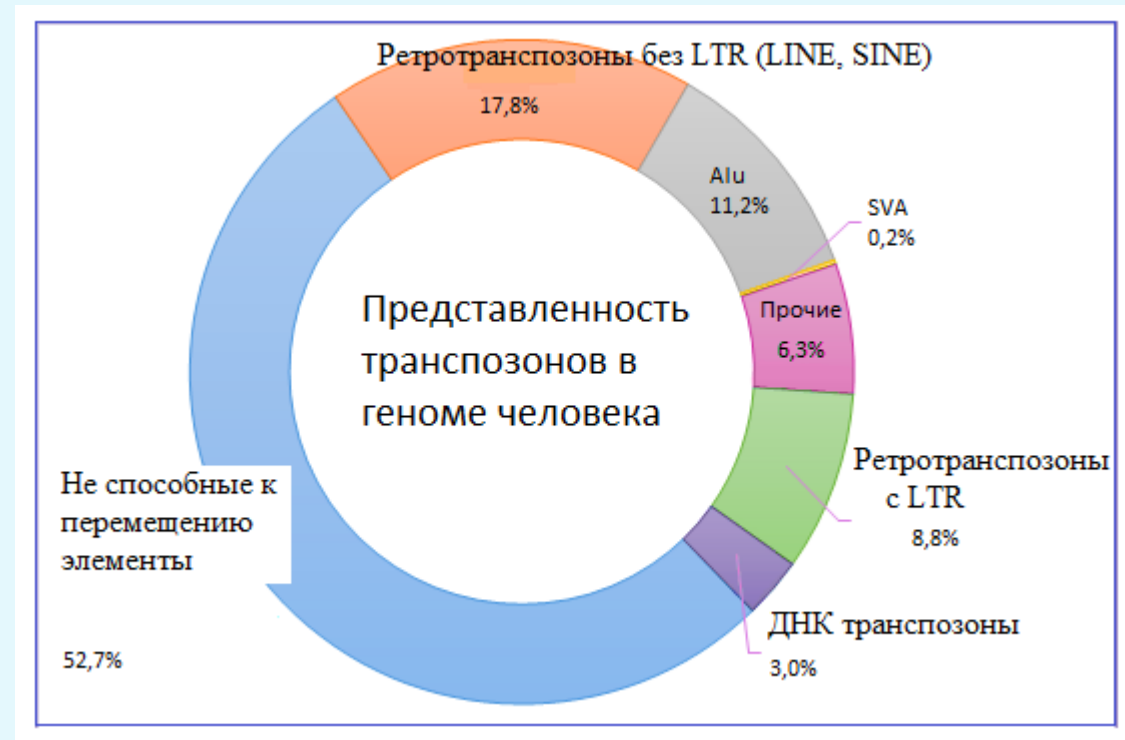


ТРАНСПОЗОНЫ В ГЕНОМЕ ЧЕЛОВЕКА

Транспозоны составляют около 45% генома человека, меньше 0,05% из них остаются активными.

Транспозиции в целом довольно редкое явление. Частота транспозиции варьирует для различных элементов в пределах, сравнимых с частотой спонтанных мутаций (от 10^{-5} до 10^{-7} на поколение).

Долгое время их считали «мусорной ДНК» или «эгоистической ДНК».





ВРЕДНЫЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ТРАНСПОЗОНОВ

Активация транспозонов может приводить к **разрывам ДНК, делециям или инверсиям** участков.

С активностью транспозонов **связаны многие патологии**, такие как рак, нарушения развития, гемофилия, воспалительные и аутоиммунные заболевания, старение и ассоциированные с ним болезни, нейродегенеративные заболевания, нарушения половой системы.

Важная роль в формировании **устойчивости к антибиотикам** принадлежит транспозонам.



ТРАНСПОЗОНЫ. ПОЛЬЗА

- Транспозоны участвуют в формировании **теломер** и **центромер** хромосом.
- Транспозоны способствуют мутагенезу, и иногда такие **мутации могут быть полезными**.
- Перемещаясь по геному, транспозоны могут переносить вместе с собой регуляторные элементы и таким образом менять профиль экспрессии генов.
- В ходе ретрокопирования и неофункционализации ретротранспозоны могут создавать **новые гены**.
- Белок Arc опосредует **нейропластичность** и **формирование долгосрочной памяти**.
- Эндогенных ретровирусы **участвуют в формировании плаценты**.
- Транспозоны можно использовать как **инструмент генной инженерии**.



ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ У ЭУКАРИОТ

У эукариот рекомбинация генетического материала обеспечивается в первую очередь **половым размножением** и **транспозицией**.

В зависимости от количества генетического материала, участвующего в рекомбинации, различают:

- *геномную рекомбинацию* в процессе **оплодотворения**;
- *межхромосомную рекомбинацию* – **независимое распределение негомологичных хромосом в анафазе I мейоза**;
- *внутрихромосомную рекомбинацию* – **кроссинговер**;
- *рекомбинацию путем транспозиции*.

Первые три процесса представляют собой механизмы **комбинативной изменчивости**.



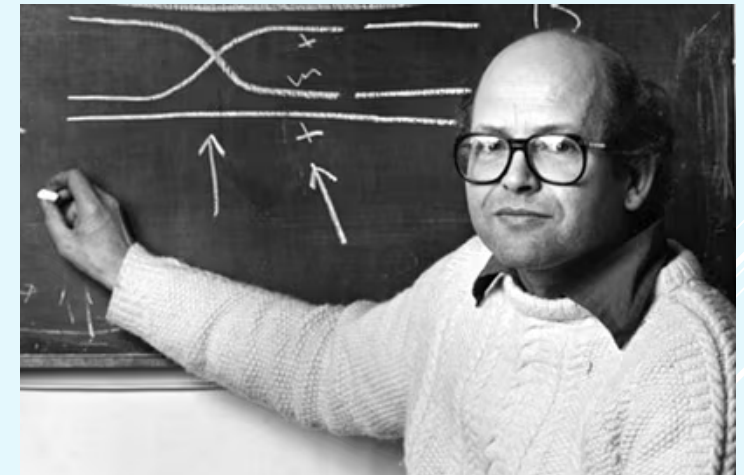
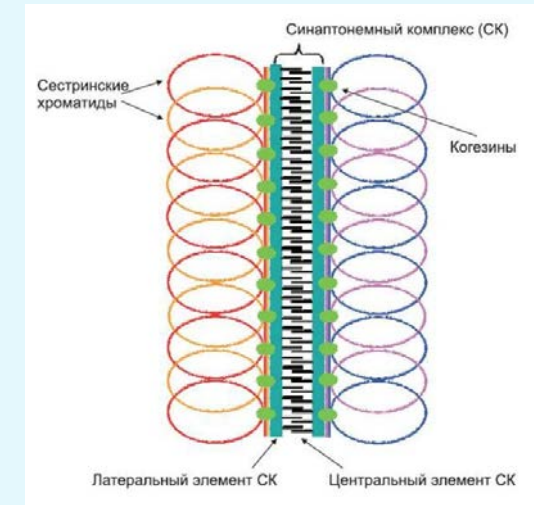
КРОССИНГОВЕР

(от англ. crossing-over – перекрёст), обмен участками хромосом при их тесном сближении (конъюгации).

Термин «кроссинговер» предложен Т. Х. Морганом в 1911 г.

В профазе мейоза 1 между гомологичными хромосомами (каждая из них состоит из 2 сестринских хроматид) происходит узнавание (синапсис). В пахитене хромосомы образуют биваленты. У эукариот образуется **синаптонемный комплекс** (подобно застёжке «молния» удерживает хромосомы вместе).

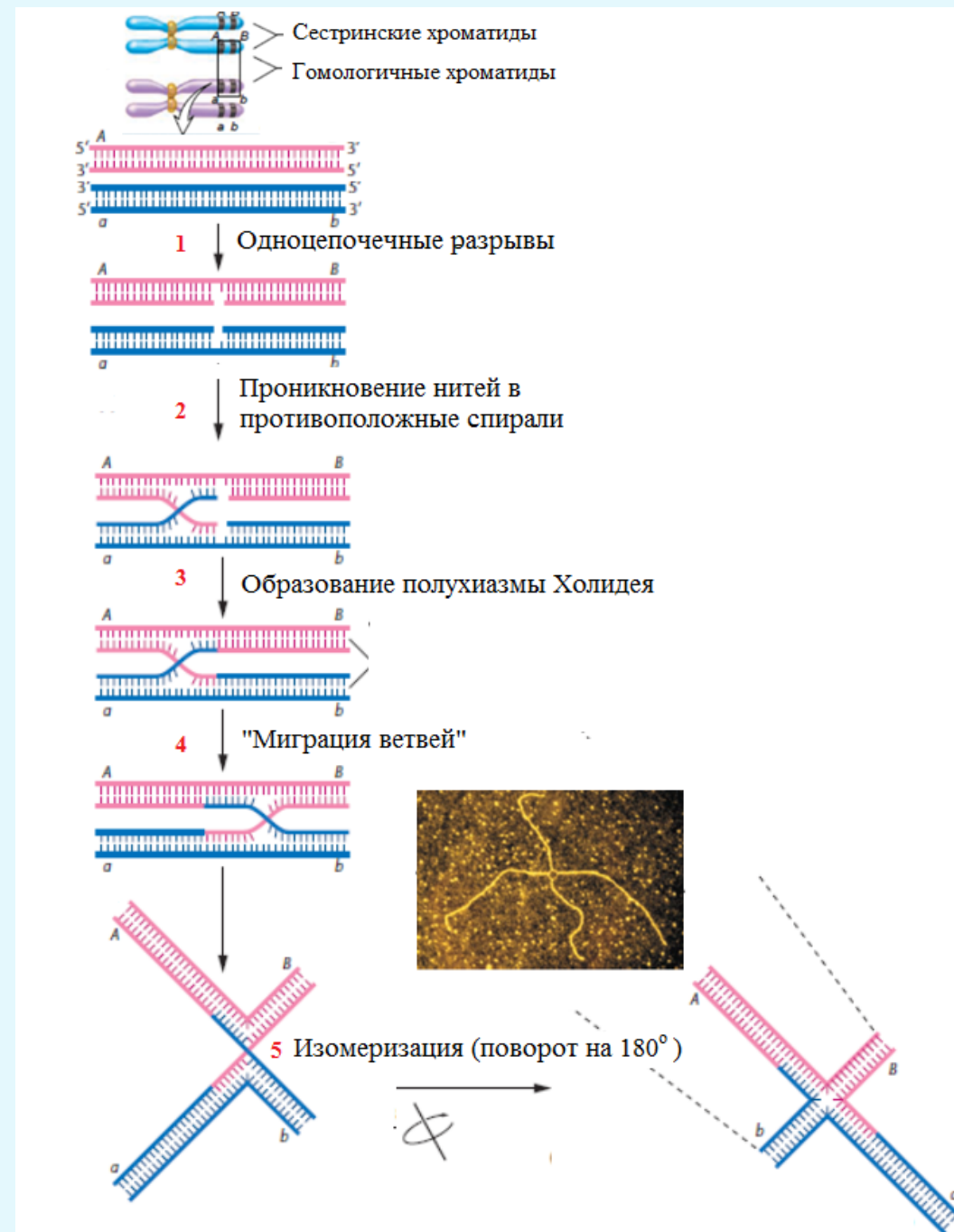
Общая модель кроссинговера предложена в 1964 году Робином Холидеем.





СТРУКТУРА ХОЛИДЕЯ

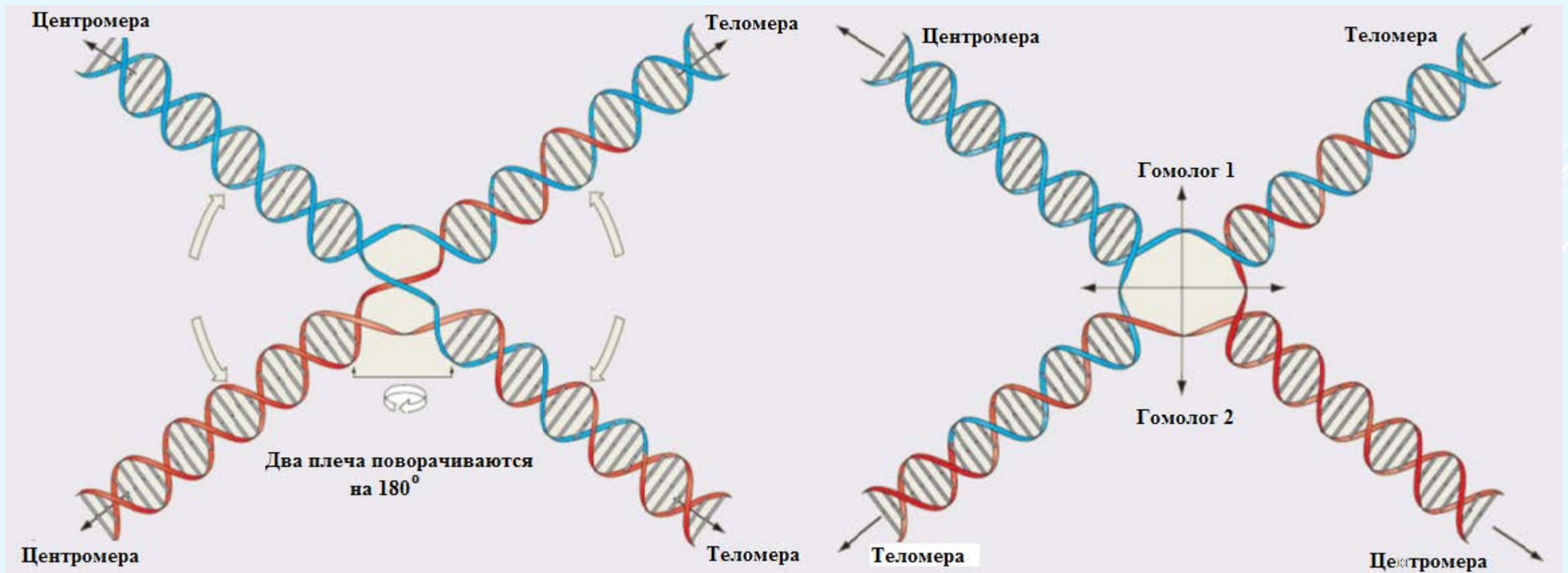
1. Экзонуклеаза вносит одноцепочечные разрывы в идентичных местах гомологичных хромосом.
2. Взаимное проникновение с образованием «полухиазмы Холидея».
3. Миграция ветвей и удлинение дуплекса (от неск. сотен до тысячи п.н.)
4. Изомеризация (поворот на 180°)





СТРУКТУРА ХОЛИДЕЯ

5. Разрешение «полухиазмы»: в одной плоскости (горизонтально) – образуются нерекомбинантные хроматиды; в разных плоскостях (вертикально) – рекомбинантные хроматиды.





КРОССИНГОВЕР

Мейотический кроссинговер, приводит к обмену участками с равным числом генов.

В редких случаях происходит **неравный кроссинговер**, в результате которого участок одной из гомологичных хромосом может удвоиться (**дупликация**), а в другой хромосоме потеряться (**делеция**).

Кроссинговер может произойти и между конъюгирующими нехомологичными хромосомами, что приводит к **транслокациям**.



КРОССИНГОВЕР МЕЖДУ СЕСТРИНСКИМИ ХРОМАТИДАМИ (СХО)

Это не приведет к рекомбинации генов, но такой обмен также имеет важное значение.

Агенты, индуцирующие повреждение ДНК (вирусы, рентгеновское или УФ излучения, химические мутагены) повышают частоту СХО.

Частота СХО увеличивается и при некоторых наследственных заболеваниях, например при **синдроме Блума**, ассоциированного с мутацией гена BLM, расположенного на длинном плече 15 хромосомы и кодирующего фермент ДНК-хеликазу.

(задержка роста, высокая чувствительность кожи к УФ, иммунодефицит, предрасположенность к злокачественному опухолевому росту и аномальным поведением).





КОНВЕРСИЯ ГЕНОВ

Гомологичной рекомбинации сопутствует еще один процесс - **конверсия генов**.

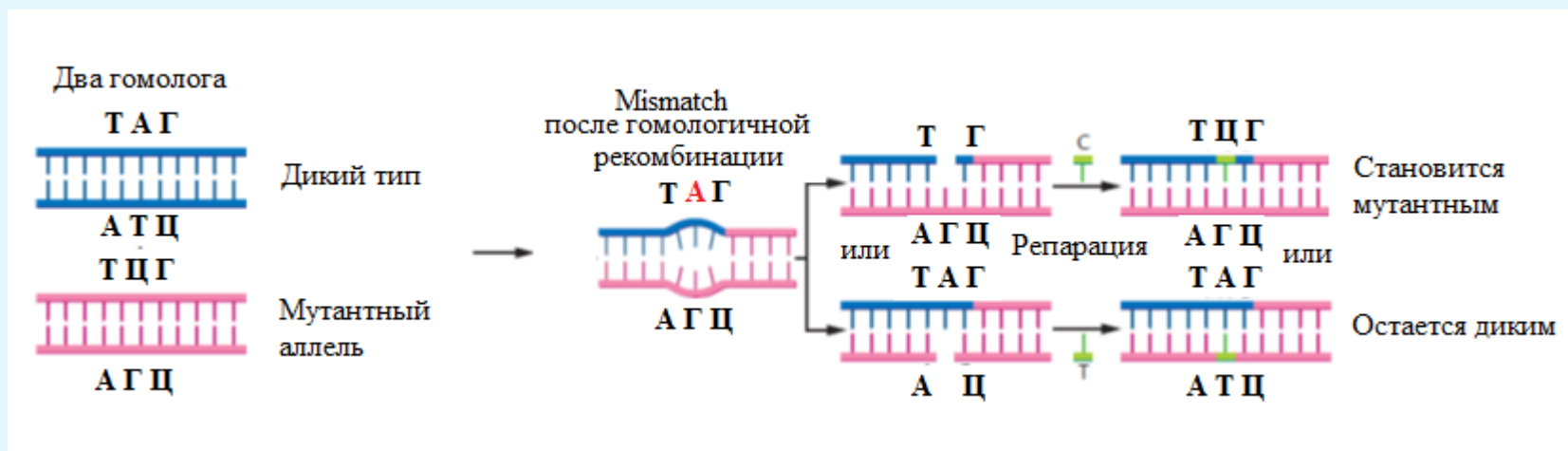
Конверсия генов - замена одной последовательности ДНК на гомологичную последовательность, так что последовательности становятся идентичными.

Феномен обнаружен у дрожжей Карлом Линдегреном в 1949 году



КОНВЕРСИЯ ГЕНОВ

Последовательности ДНК в гомологичных хромосомах очень похожи, но не идентичны абсолютно. Поэтому обмен нитями ДНК при «миграции ветвей» может привести к образованию гетеродуплекса, который содержит несоответствия оснований (mismatch), что запускает репаративные процессы. Репаративная система корректирует одну цепочку по матрице другой как по образцу. После чего последовательности становятся идентичными.





САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ У ЭУКАРИОТ

Редкий, если не единственный, но зато жизненно важный пример сайт-специфической рекомбинации у многоклеточных животных - перестройки в последовательностях ДНК, кодирующих иммуноглобулины, - белковые молекулы, распознающие тот или иной антиген при иммунном ответе у позвоночных.

Этот вид рекомбинации называется V(D)J рекомбинация.



V(D)J РЕКОМБИНАЦИЯ

— это процесс сайт-специфической рекомбинации, который происходит на ранних стадиях развития В- и Т-лимфоцитов.

Существует огромное разнообразие Ig и всего лишь несколько генов, которые их кодируют.

Эти гены располагаются в 2, 14 и 22 хромосомах.

Гены Ig не присутствуют в целом виде в соматических клетках.

Образование единого гена происходит посредством нескольких актов рекомбинации.

Рекомбинация создает огромное разнообразие антител, которое достигает 10^{14} .

Гены иммуноглобулинов собираются из составных частей в лимфоцитах.

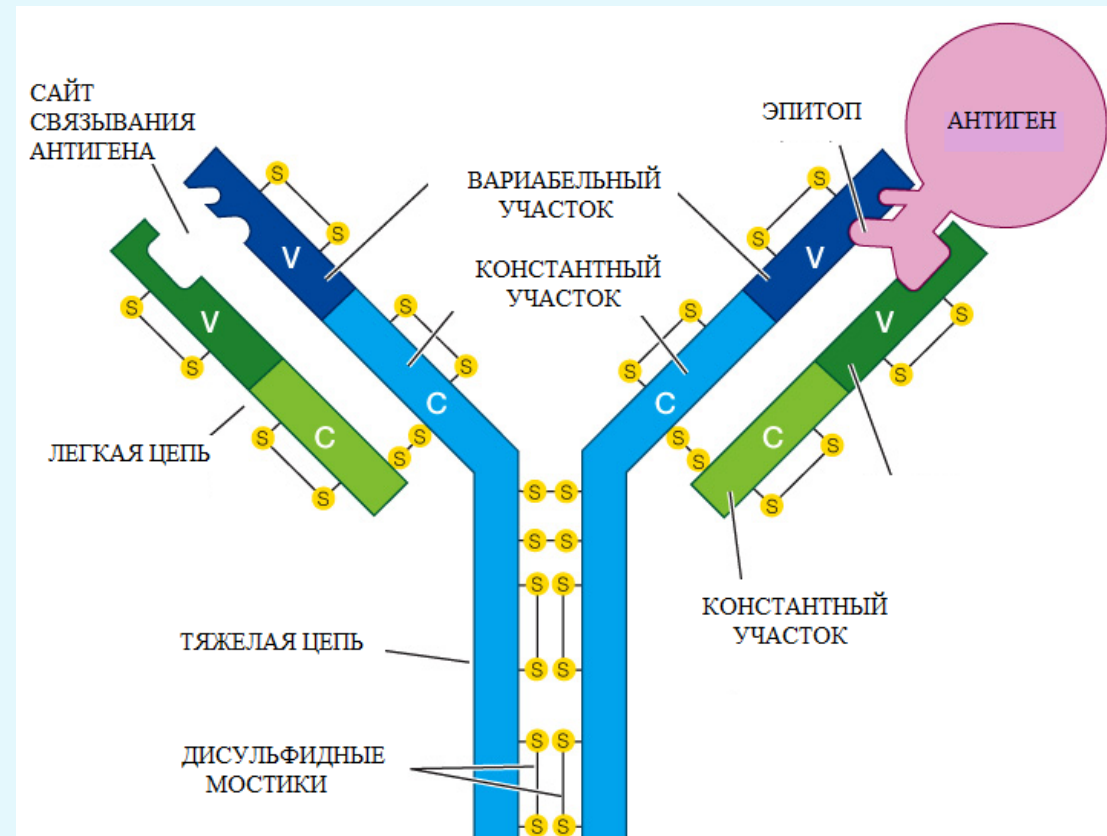


СТРОЕНИЕ АНТИТЕЛА (Ig)

Молекула антитела
(иммуноглобулина) - **тетрамер**
из двух тяжёлых
(**H-цепей**) и двух лёгких
(**L-цепей**).

Каждая цепь имеет
вариабельный участок (**V-домен**)
и константный участок (**C-
домен**).

Вариабельный домен принимает
участие в распознавании
антигена.





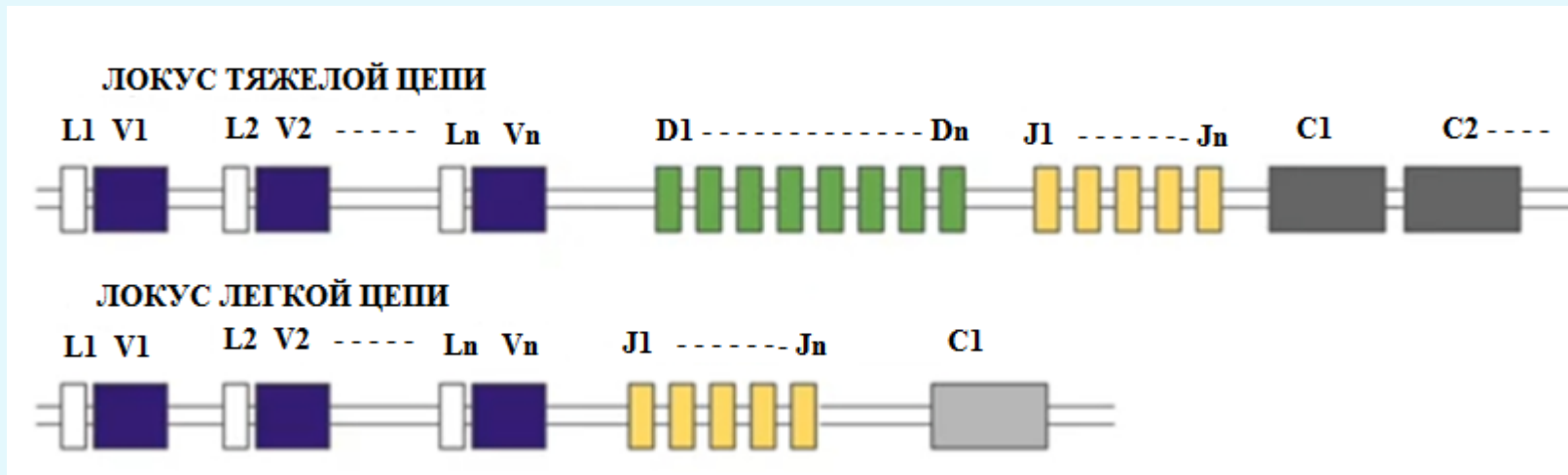
V(D)J РЕКОМБИНАЦИЯ

Гены иммуноглобулинов состоят из повторяющихся сегментов, принадлежащих к трём классам:

V (variable), **D** (diversity) и **J** (joining).

Вариабельная часть гена тяжелой цепи состоит из V,DJ, а легкой а цепи – Vи J.

Константная часть **C** следует за комплексом V(D)J.



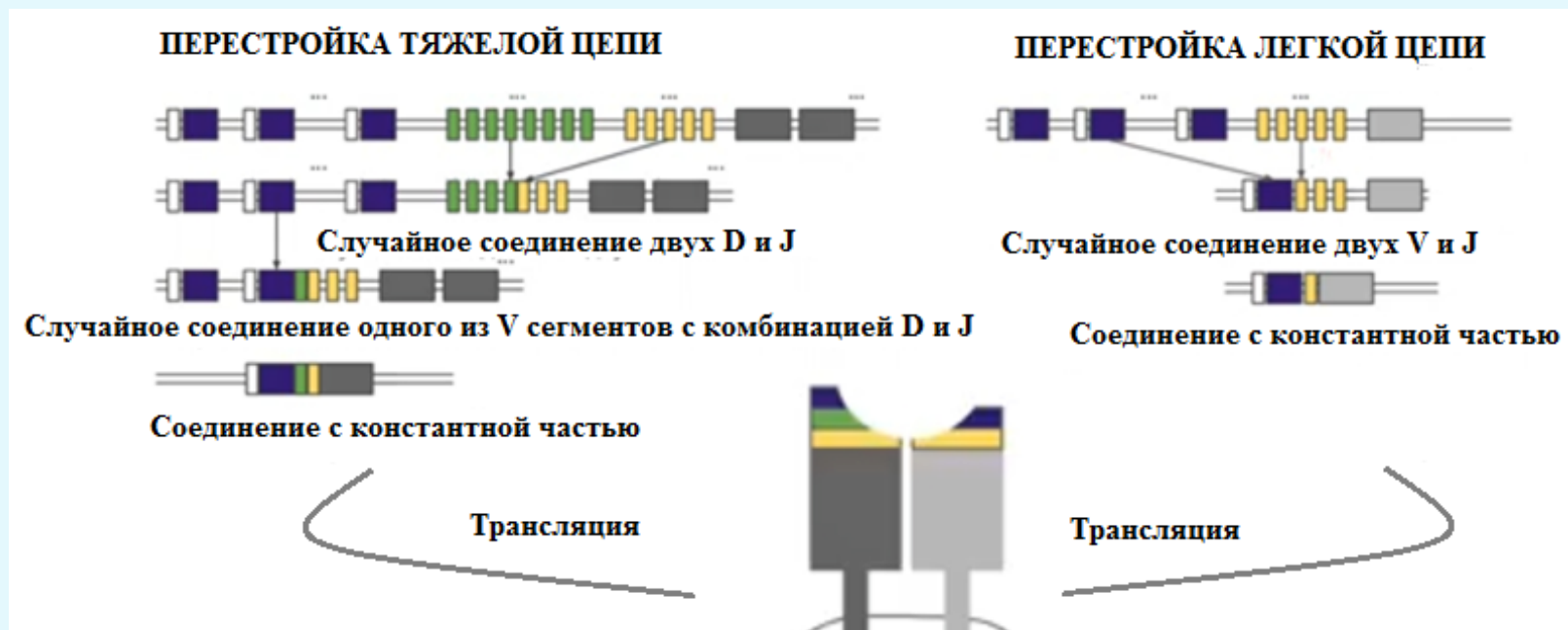


V(D)J РЕКОМБИНАЦИЯ

Тяжёлые цепи образуются в результате **двух актов рекомбинации**.
Объединение V-D-J происходит в две стадии:

сначала один из D-сегментов соединяется с J-сегментов, а потом V-сегмент рекомбинирует с объединённым сегментом DJ.

Лёгкая цепь образуется при **рекомбинации** между V и J сегментами, к которому затем присоединяется C сегмент.

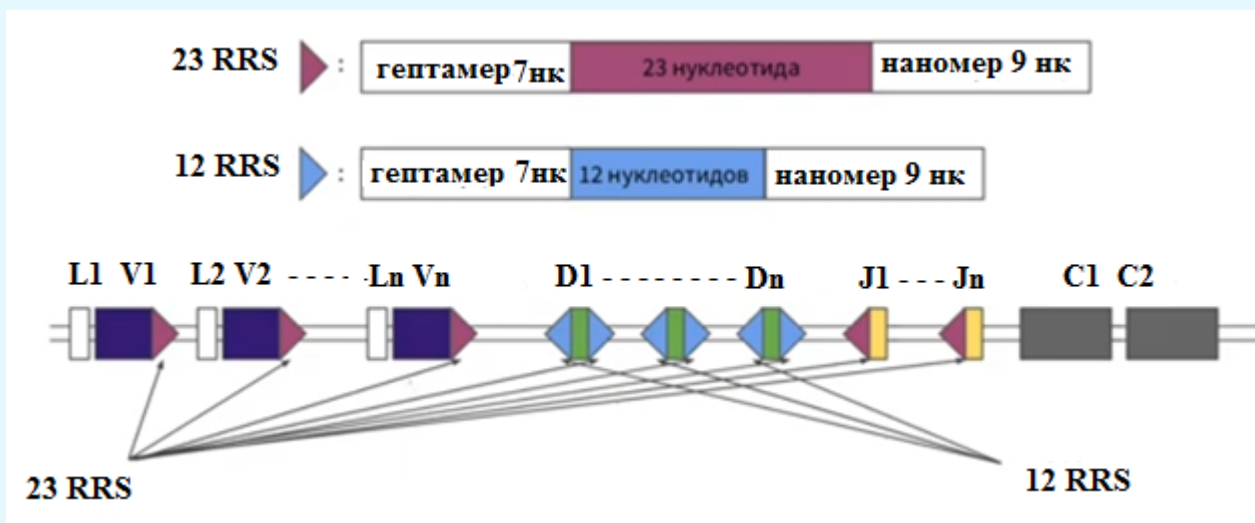




V(D)J РЕКОМБИНАЦИЯ. «ПРАВИЛО РЕКОМБИНАЦИИ 12/23»

Рекомбинация происходит по сигнальным последовательностям ДНК – **RRS**: 7 нуклеотидов — 5'-CACA GTG-3' (гептамер) – спейсер (12 или 23 п.н.)— 5'-A C A A A A A C C C-3' (нонамер).

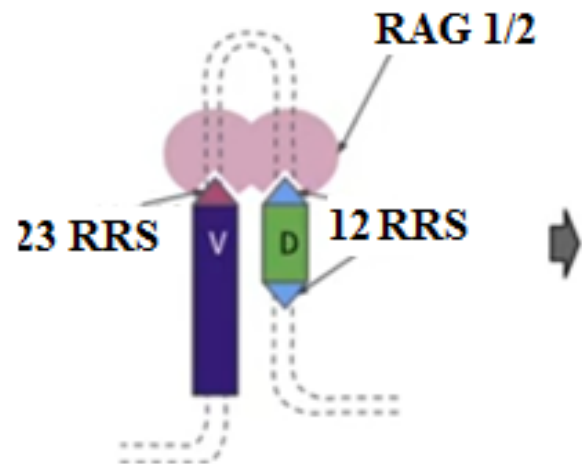
Перестройка происходит только между двумя RSS, одна из которых имеет спейсер 12 пар оснований (п. о.), другая — 23 п. о., «**правило рекомбинации 12/23**». Эта закономерность строения RSS определяет правильную последовательность рекомбинации.





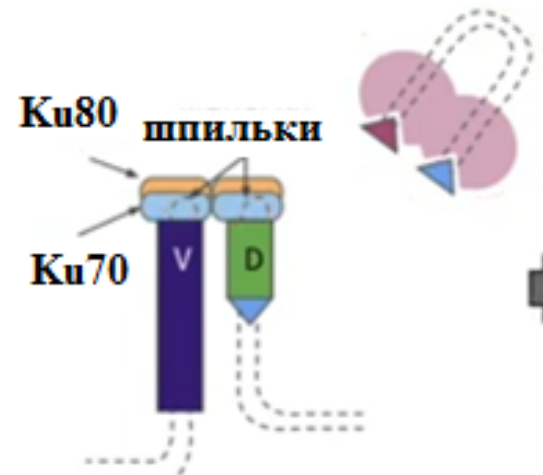
V(D)J РЕКОМБИНАЦИЯ

УЧАСТНИКИ РЕКОМБИНАЦИИ:
RAG 1/2, Ku 70, Ku 80, Artemis

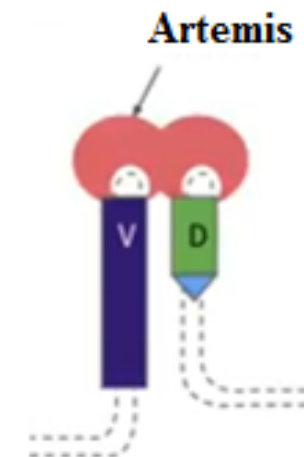


RAG 1/2 распознают 12 или 23 RRS у соединяемых сегментов и внося двуцепочечные разрывы, соединяя их в шпильки

вырезанный фрагмент между V и D сегментами



Белки Ku70 и Ku80 фиксируют концы ДНК



Artemis вносит случайные одноцепочечные разрывы разрывы в случайном месте шпильки



V(D)J РЕКОМБИНАЦИЯ

УЧАСТНИКИ РЕКОМБИНАЦИИ: Artemis, TdT



Artemis вносит
одноцепочечный разрыв
в случайном месте шпильки

Одноцепочечные
последовательности
достраиваются, образуя
палиндромы

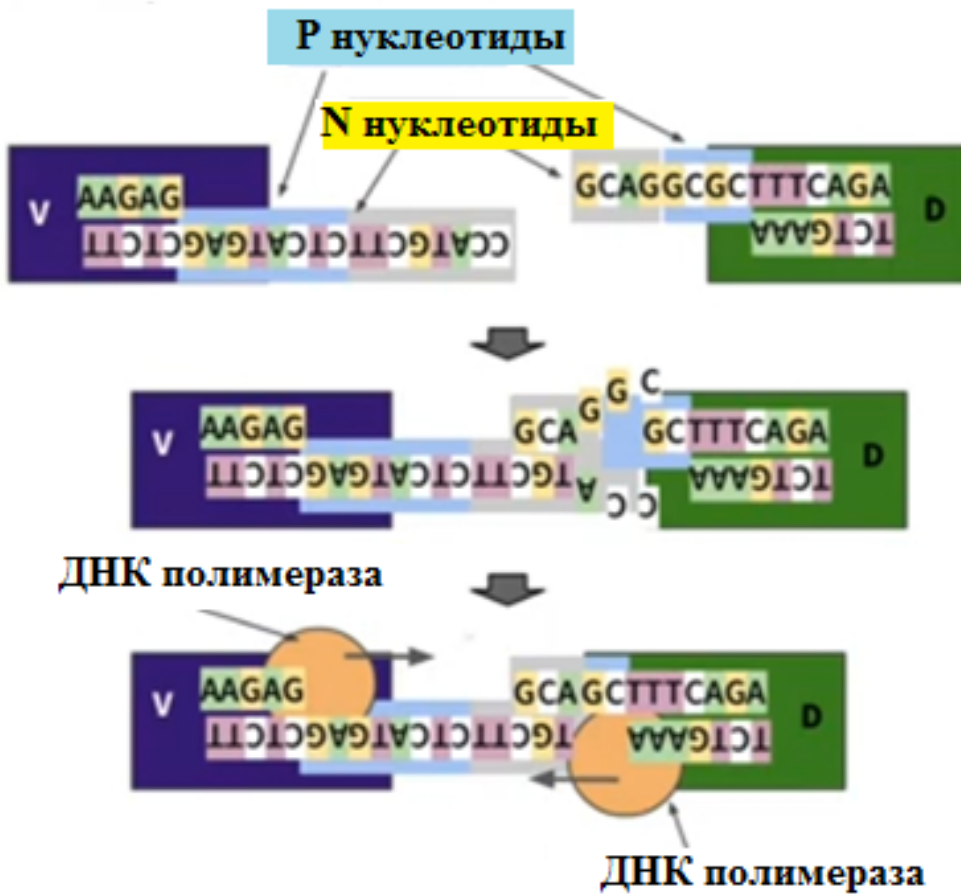
TdT (терминальная
дезоксинуклеотидилтрансфераза)
добавляет на концы случайное число
случайных нуклеотидов



V(D)J РЕКОМБИНАЦИЯ

Спаривание цепей
и удаление
некомплементарных
нуклеотидов

Заполнение одноцепочечных районов
комплементарными нуклеотидами и
лигация одноцепочечных разрывов





V(D)J РЕКОМБИНАЦИЯ. ИСТОЧНИКИ РАЗНООБРАЗИЯ АНТИТЕЛ

Случайные комбинации VDJ или VJ сегментов	Комбинаторное разнообразие
Р и N нуклеотиды на границе сегментов	Разнообразие на границе сегментов Junctional
Случайные комбинации тяжелых и легких цепей	Комбинаторное разнообразие



НЕЗАКОННАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ

– это сборная группа процессов, где рекомбинация происходит без гомологии между молекулами ДНК, и при этом без участия механизмов сайт-специфической рекомбинации или транспозиций.

В качестве примера можно привести захват ретровирусом некоторых клеточных генов при его эксцизии из хромосомы хозяйской клетки.



НЕЗАКОННАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ

Механизмы незаконной рекомбинации мало изучены. Общим для них является соединение концов негомологичных молекул ДНК.

Впервые механизм одной из реакций незаконной рекомбинации был описан японским исследователем Х. Икедой с сотрудниками в 1982 году.

В опыте *in vitro* эти авторы продемонстрировали рекомбинацию между полностью негомологичными ДНК плазмиды pBR322 и фага лямбда, катализируемую высокоочищенной топоизомеразой II (ДНК-гиразой) *E. coli*.

Незаконная рекомбинация может приводить к хромосомным перестройкам.



Таким образом, генетические рекомбинации являются базовым механизмом изменчивости, который, наряду с мутационным процессом, обеспечивает эволюционное развитие живой природы.



Спасибо за внимание!