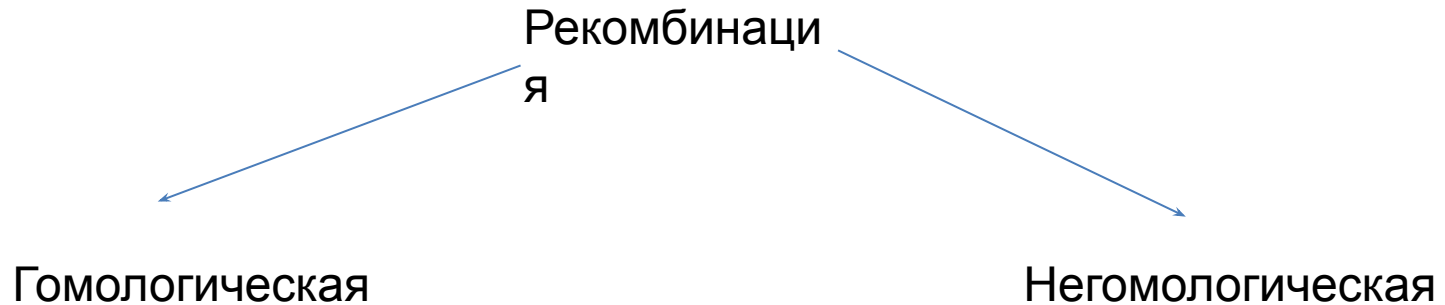


Транспозиция и сайт-специфическая рекомбинация

Рекомбинация – процесс разрезания ДНК и их соединения в новых комбинациях.

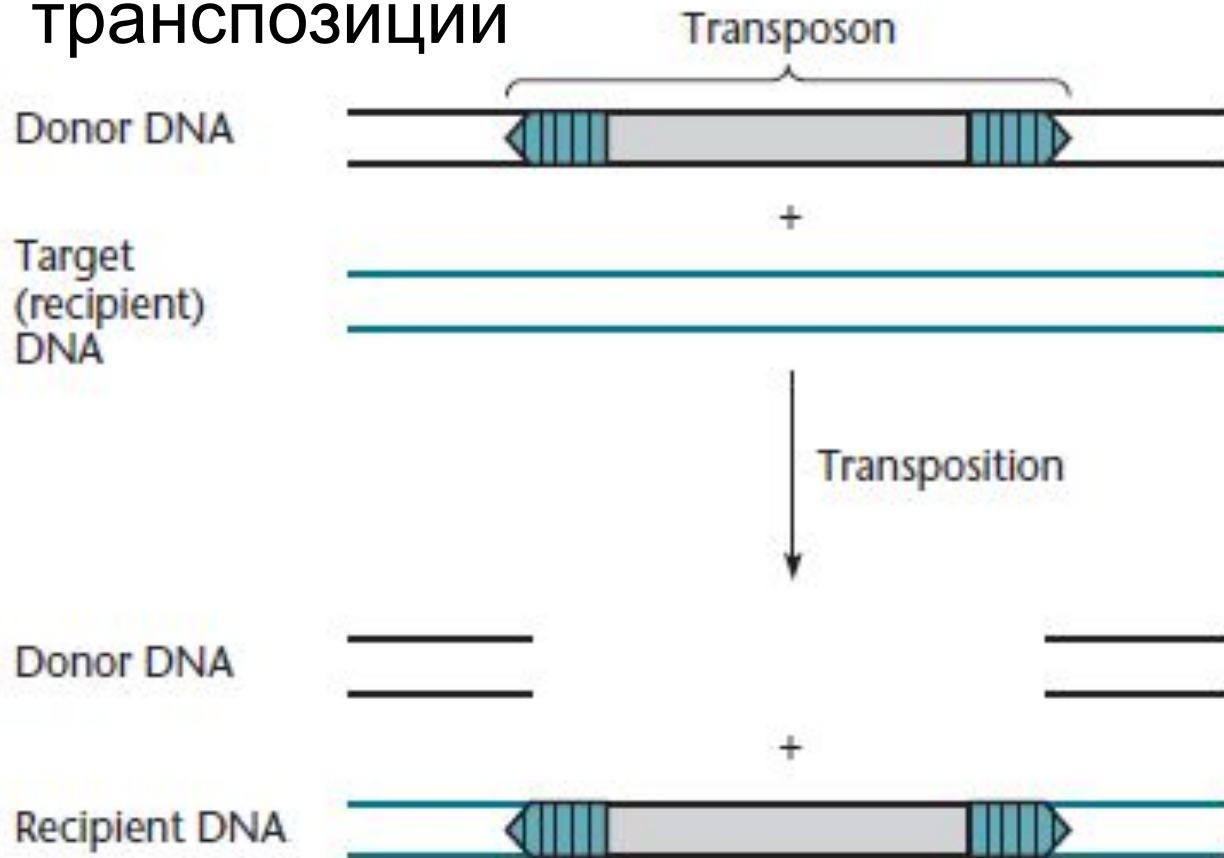


При такой рекомбинации разрезаемые и соединяемые концы ДНК должны содержать более или менее протяженные одинаковые последовательности.

Одним из ее вариантов является сайт-специфическая рекомбинация, при которой перестройка ДНК происходит по коротким участкам строго определенной последовательности. Так происходит вырезание и интеграция фагов в бактериальную хромосому.

Транспозиция происходит при помощи негомологической рекомбинации и заключается в процессе участков ДНК из одного места генома в другое. Такие участки называются **транспозонами**.

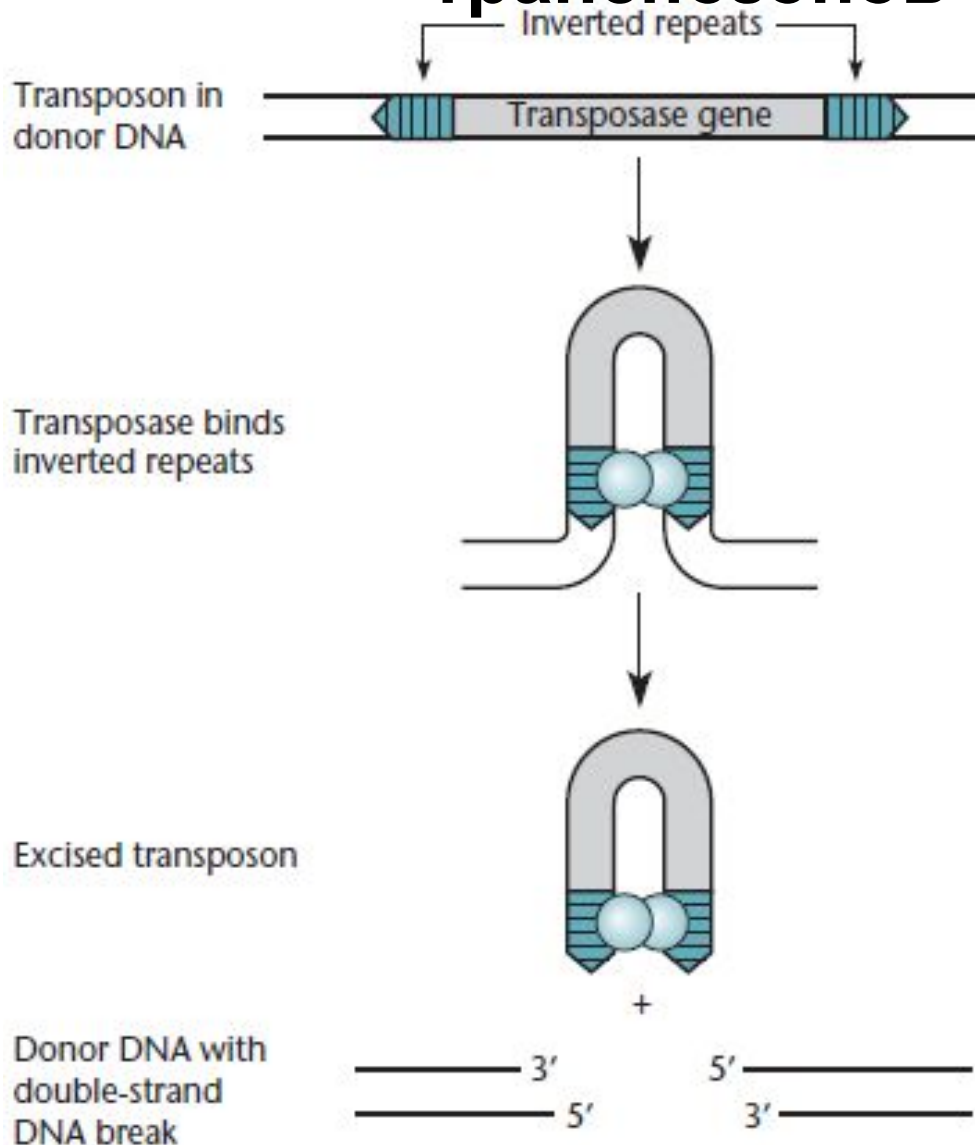
Принципиальная схема транспозиции



Транспозон должен содержать на своих концах инвертированные повторы (IR).

Разрезание донорной и акцепторной ДНК осуществляют ферменты под названием **транспозазы**.

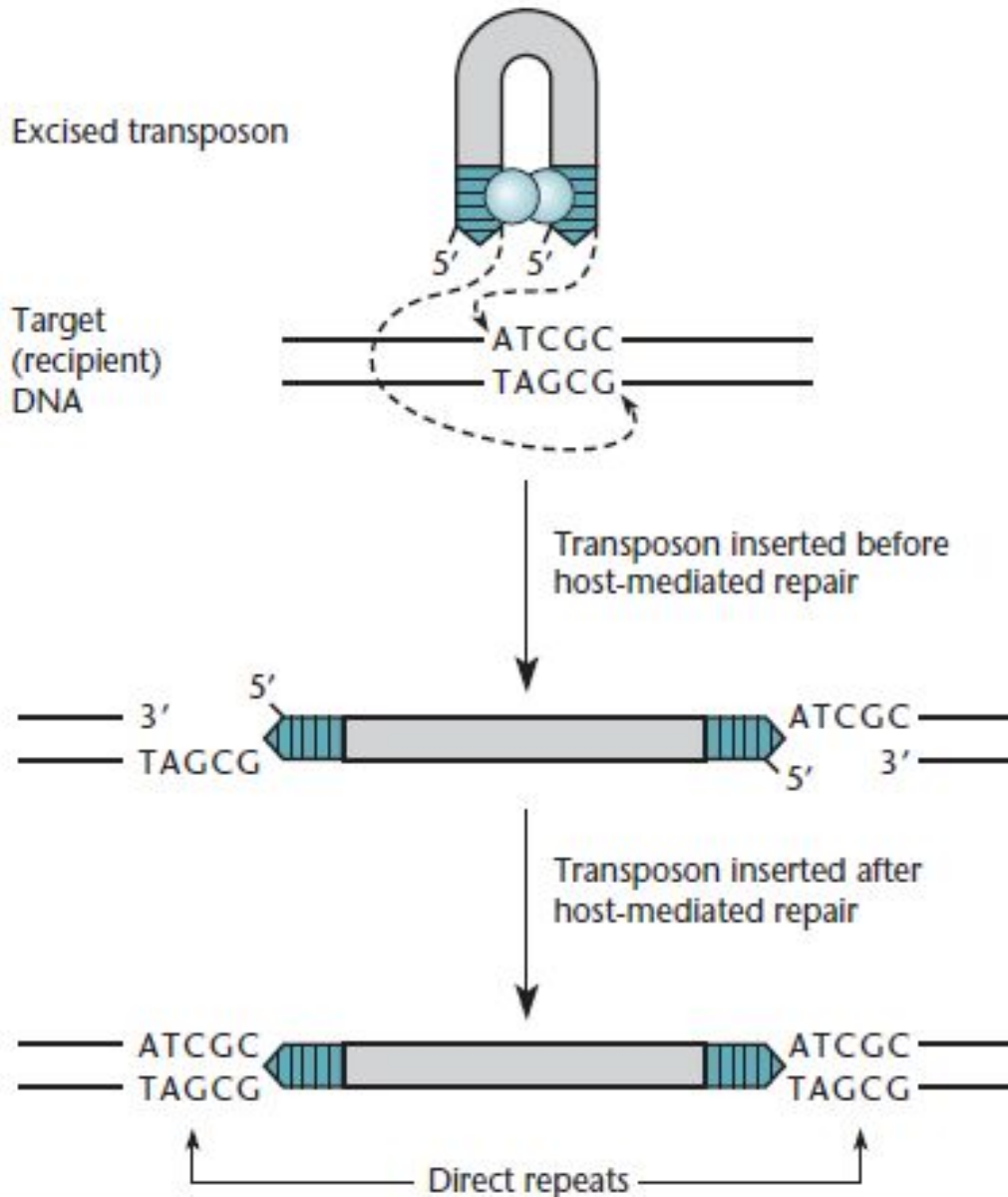
Вырезание транспозонов



Еще до разрезания должен сформироваться так называемый синапс. Это происходит за счет формирования димера транспозазы, каждый мономер в составе которого связан с IR.

Транспозаза в составе синапса осуществляет двуцепочечное разрезание донорной ДНК. При этом образуются липкие концы, обычно длиной от 2 до 9 нуклеотидов.

Встраивание



Свободные концы транспозона при помощи транспозазы атакуют участок акцепторной ДНК с такой же последовательностью, как и липкие концы IR.

В результате получается молекула как бы со встроенным транспозоном, но в то же время с «разрывами» длиной в исходный липкий конец IR.

Эти разрывы достраиваются бактериальной ДНК-полимеразой I, в результате чего, помимо встраивания транспозона, в акцепторной ДНК еще и формируются прямые повторы.

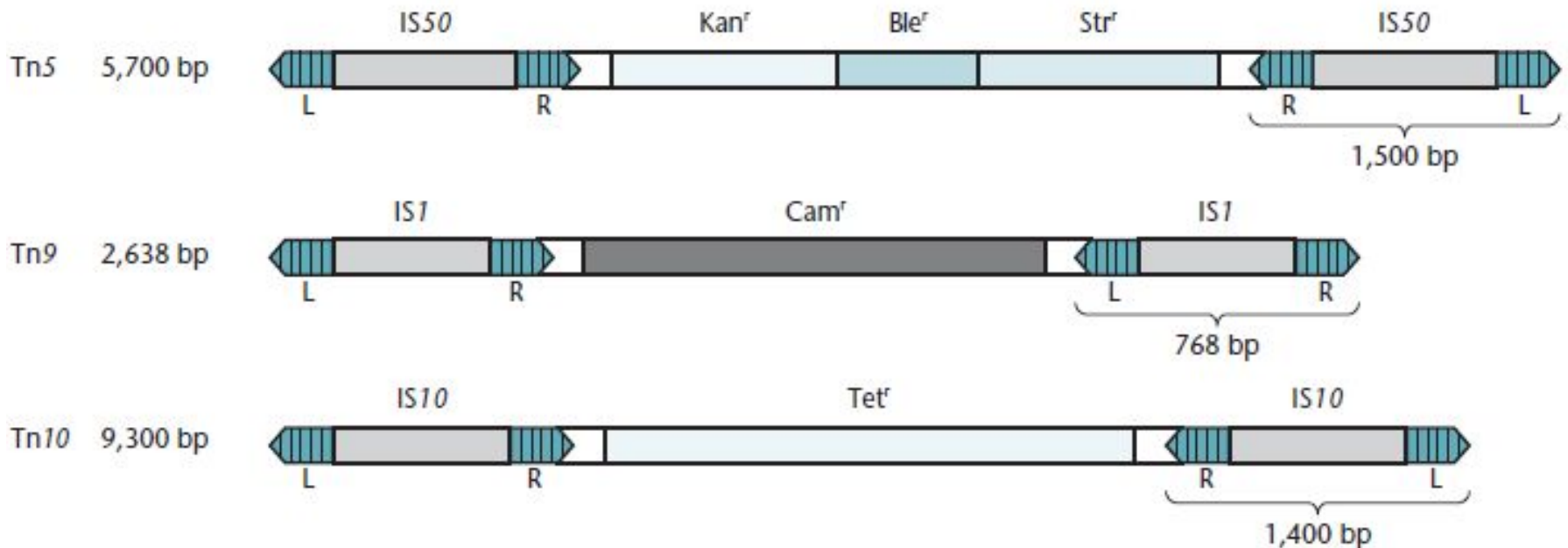
IS- элементы

IS (Insertion Sequences)-элементы – самые маленькие и простые бактериальные транспозоны. Их длина обычно в диапазоне 750-2000 нуклеотидов, и они почти никогда не кодируют что-либо, кроме транспозазы.

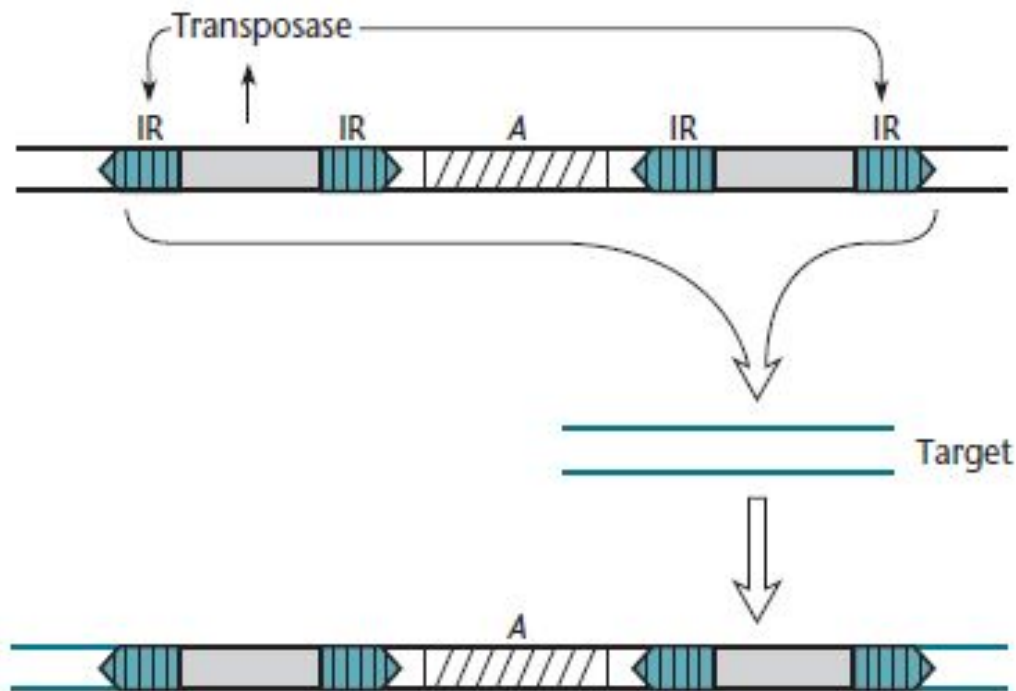
Композитные, или составные

транспозоны

Такие транспозоны состоят из двух одинаковых IS-элементов, перемещающихся по геному вместе с последовательностью, находящейся между ними. Последняя часто кодирует гены устойчивости к антибиотикам.



Перемещение композитных транспозонов

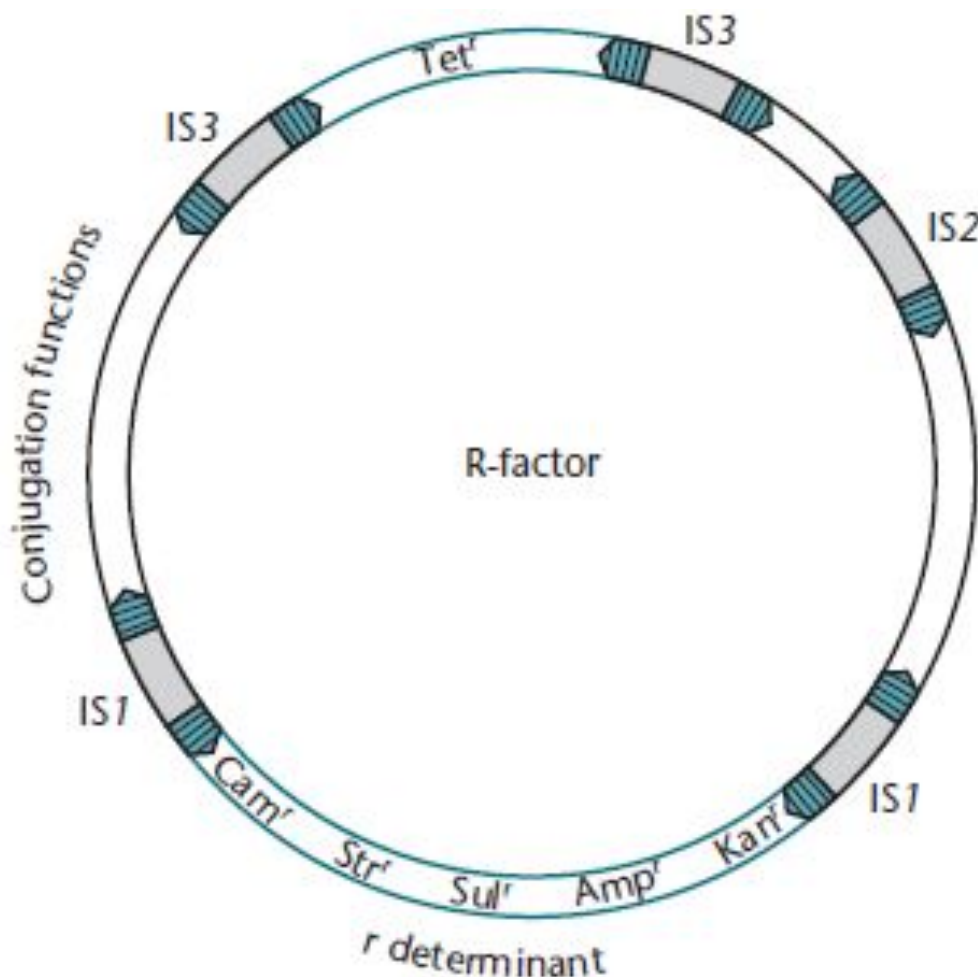


IS-элементы в составе композитного транспозона не могут перемещаться по отдельности, потому что:

- Часто один из генов транспозазы инактивируется,
- Еще чаще IR мутируют так, что активными остаются только два самых концевых, то есть как раз IR композитного транспозона.

Сборка плазмид при помощи транспозонов

Множество природных плазмид очевидным образом образовались вследствие активности транспозонов, зачастую – именно композитных, так как они часто содержат гены устойчивости к антибиотикам.

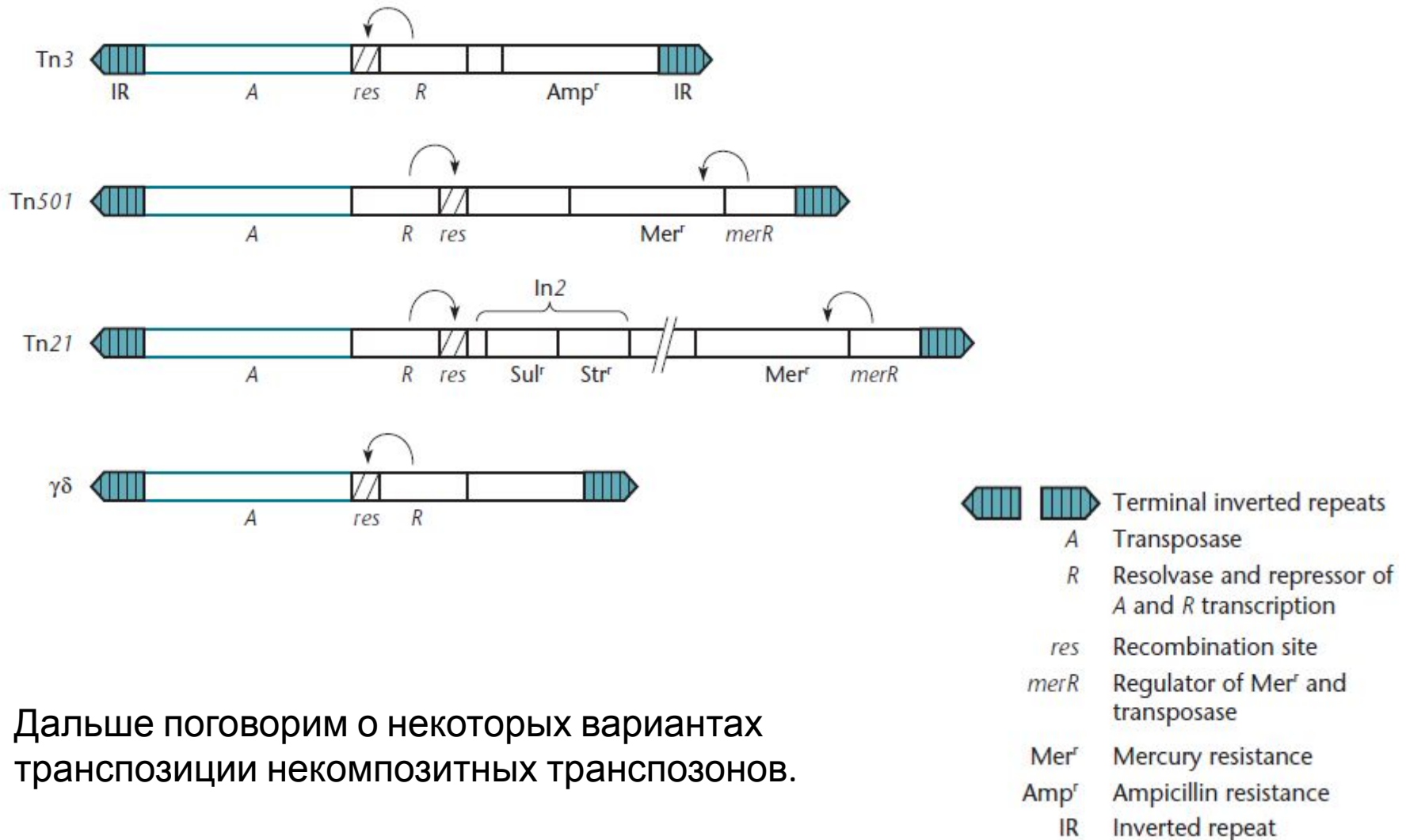


Это R-плазмида (R от resistance), содержащая кучу генов устойчивости. Поскольку все они фланкированы IS, очевидно, что тут постарались транспозоны.

Некомпозитные

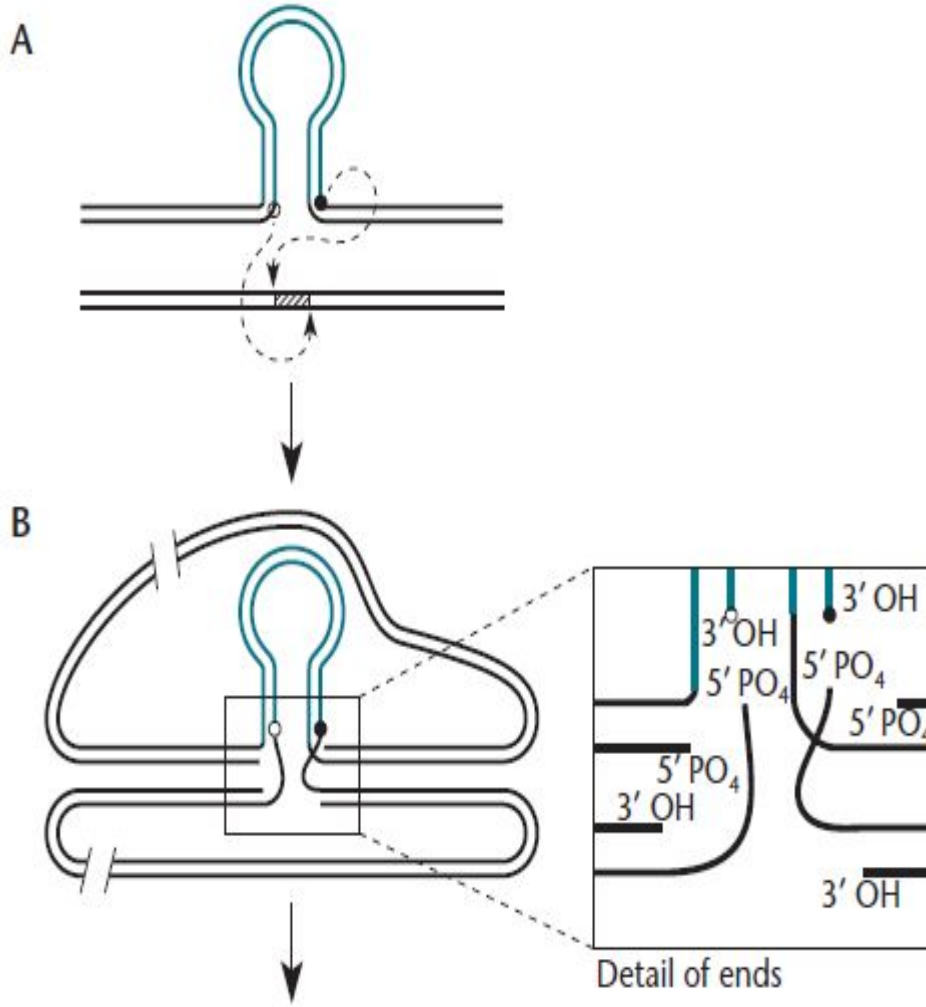
транспозоны

Так называются транспозоны, не состоящие из двух одинаковых IS-элементов, и в то же время более сложные, чем IS-элемент.



Дальше поговорим о некоторых вариантах транспозиции некомпозитных транспозонов.

Репликативная транспозиция на примере Tn3

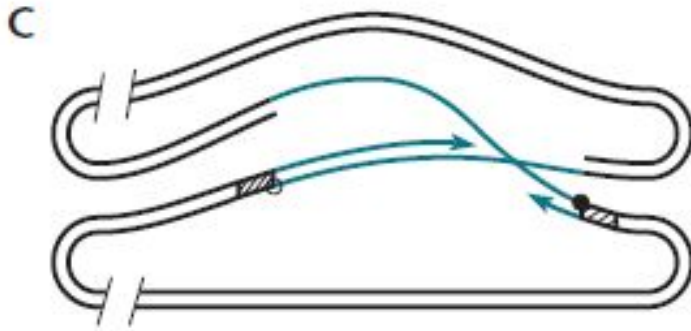


Транспозон выпетливается, и транспозаза делает одноцепочечные разрывы в местах, обозначенных кружками.

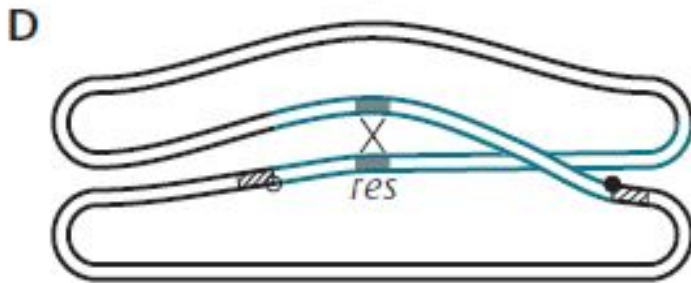
Сформировавшиеся свободные гидроксилы атакуют нуклеотиды целевой ДНК. Как именно происходит выбор нуклеотидов для атаки – не совсем ясно, может быть, что и случайным образом.

Репликативная транспозиция на примере

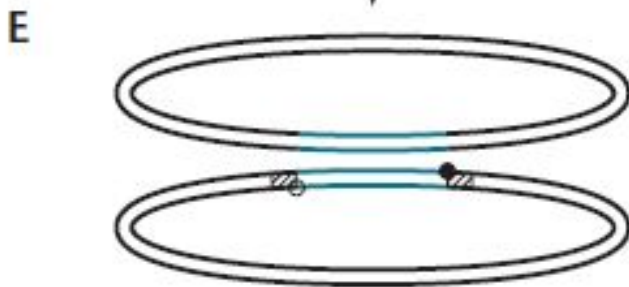
Tn3



Образуются вот такая жуткая штука из двух молекул ДНК, в каждой из которых есть одноцепочечный участок. Естественно, эти участки достраиваются аппаратом репликации.

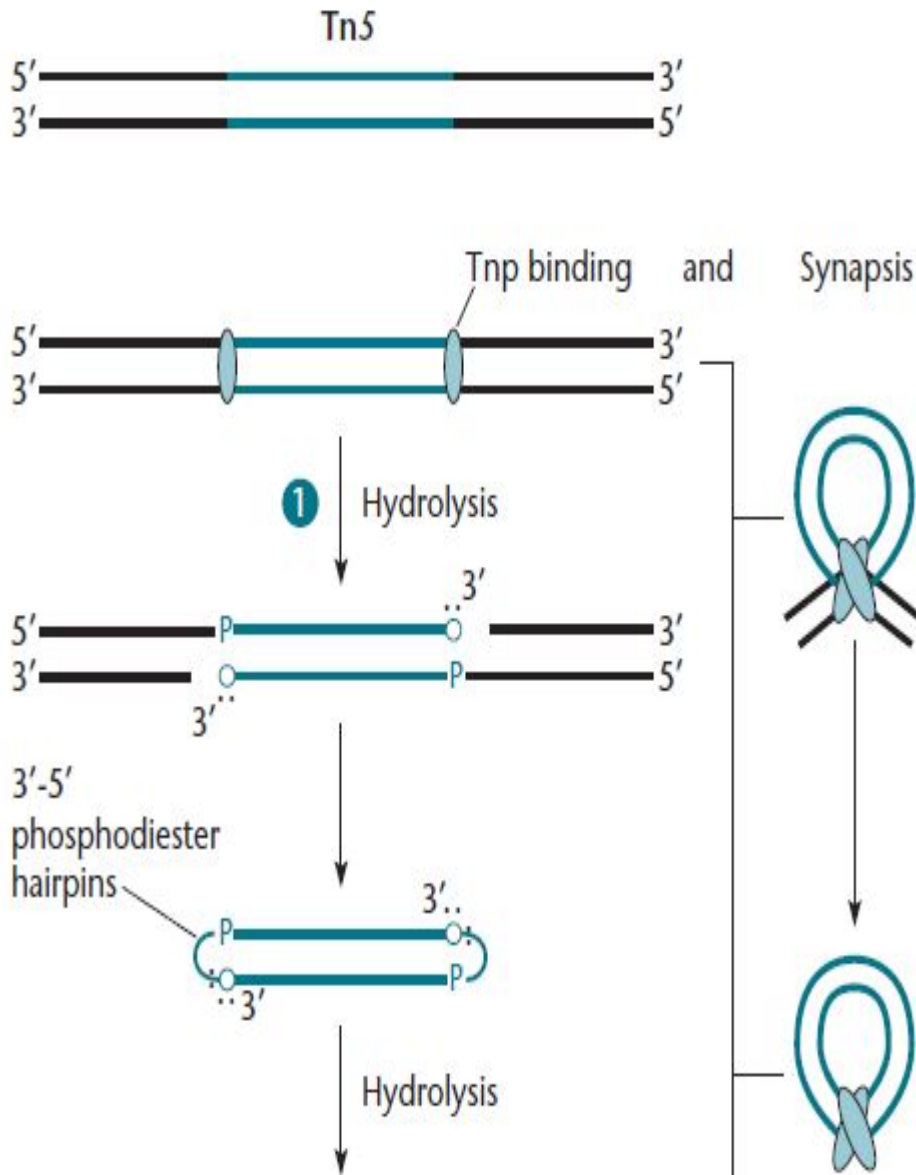


В результате формируется структура под названием коинтеграат – две сцепившиеся друг с другом молекулы ДНК, каждая из которых содержит последовательность Tn3. А в этой последовательности есть специальный участок для сайт-специфической рекомбинации – *res*. Она и происходит с участием фермента резольвазы, закодированного в бактериальной ДНК.



И теперь мы имеем две отдельные молекулы ДНК, в каждой из которых – по Tn3! Именно поэтому такая транспозиция называется репликативной: в этом случае не происходит вырезания транспозона, происходит его копирование.

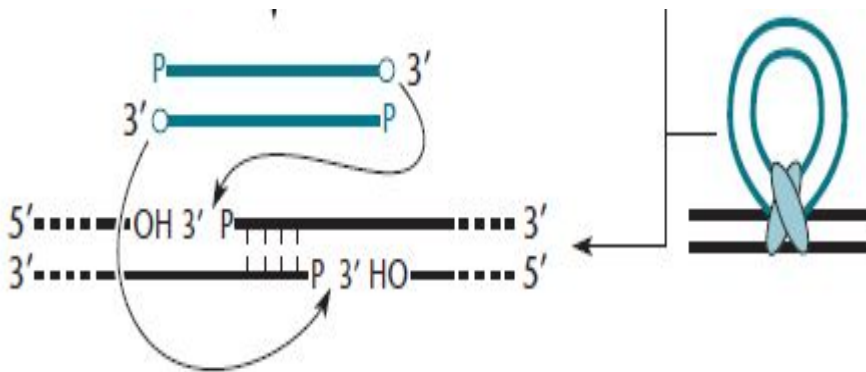
Транспозиция «cut-and-paste» на примере



Транспозаза Tnp связывается с концами транспозона в донорной ДНК (по одной молекуле на каждый из двух концов). После этого транспозаза димеризуется, формируя синапс.

Каждая молекула транспозазы делает разрыв в «чужом» конце ДНК (то есть там, куда изначально села другая молекула транспозазы). Это приводит к формированию агрессивных 3'-концевых гидроксидов, которые моментально атакуют первое, что им подворачивается под руку, то есть 5'-концы противоположной цепочки ДНК. В результате этого в вырезанном транспозоне формируются так называемые 3'-5'-шпильки.

Транспозиция «cut-and-paste» на примере Tn5



Транспозазы в составе синапса затем связываются с целевой ДНК и сразу после этого осуществляют обратное разрезание 3'-5'-шпилек. Вновь сформировавшиеся агрессивные 3'-гидроксилы атакуют нуклеотиды на расстоянии 9bp друг от друга (на разных цепочках ДНК).

3 Strand transfer completed



Происходит встраивание транспозона в целевую ДНК.

4 Replication repair from 3' OH

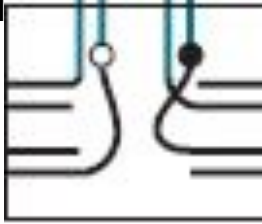


9-нуклеотидные разрывы достраиваются ДНК-полимеразой, в результате чего образуются прямые повторы.

5 Direct repeats flanking Tn

Разница между репликативной транспозицией и cut-and-paste

Репликативная транспозиция – ники разрывы

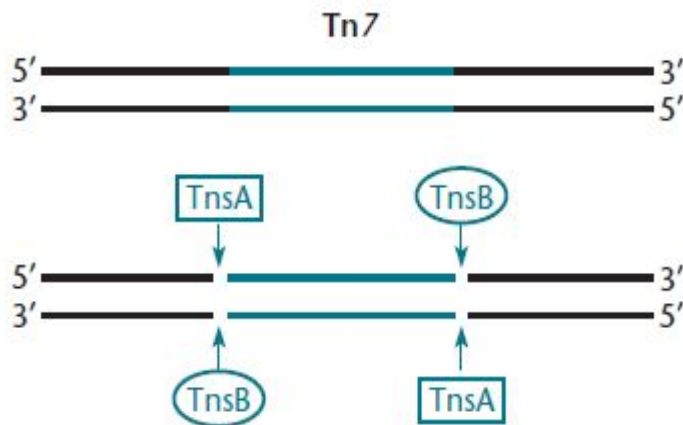


Cut-and-paste – двуцепочечные



Здесь формируется коинтеграт

А здесь никаких коинтегратов нет!

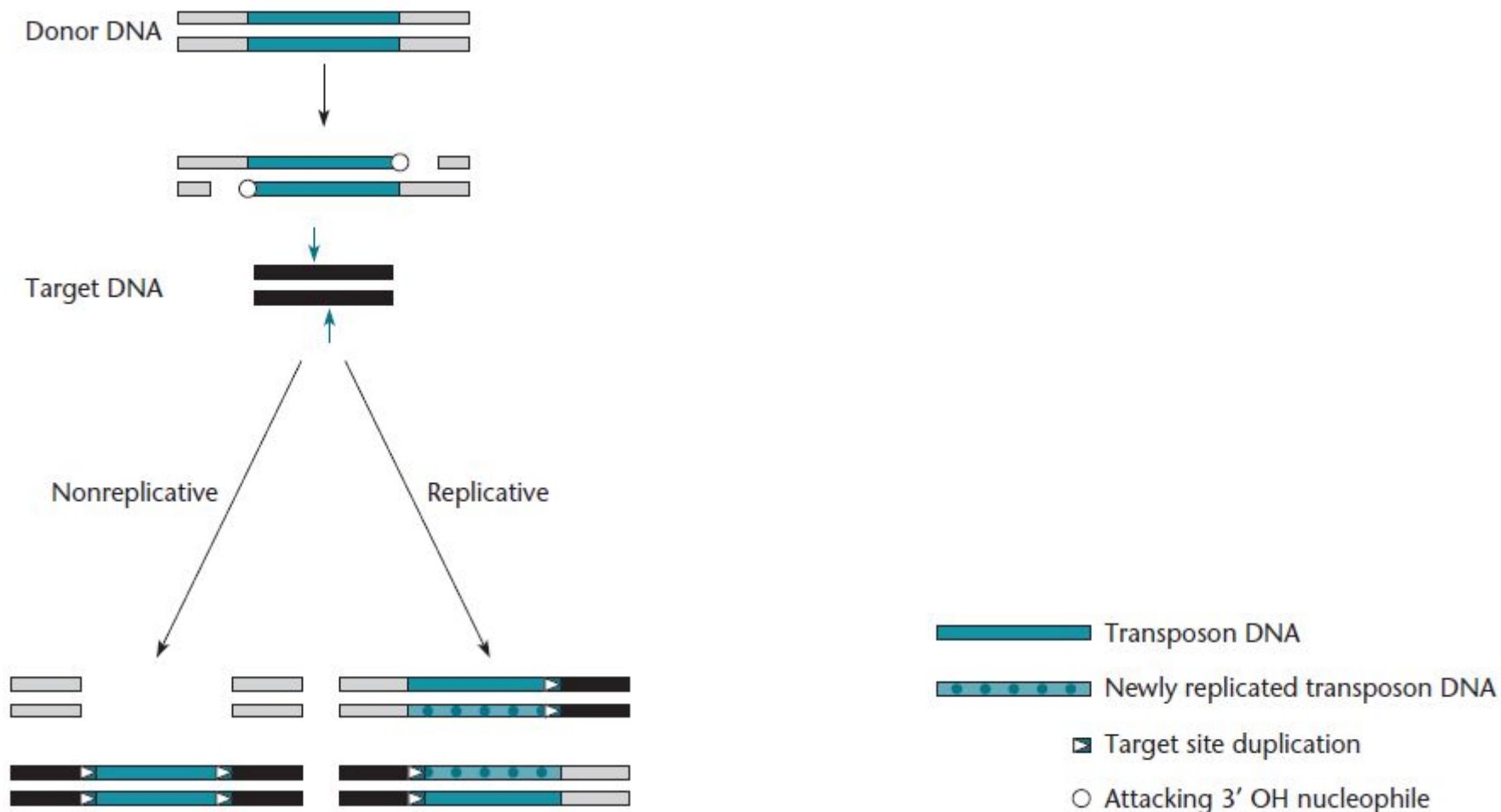


Это Tn7, в норме переносимый по механизму cut-and-paste. Его транспозаза – гетеродимер, состоящий из белков TnsA и TnsB, каждый из которых делает в ДНК ники. Так вот, если инактивировать TnsA, то оставшийся TnsB будет чудесно вносить одноцепочечные разрывы в ДНК, после этого будут формироваться коинтеграты, и транспозиция станет репликативной!

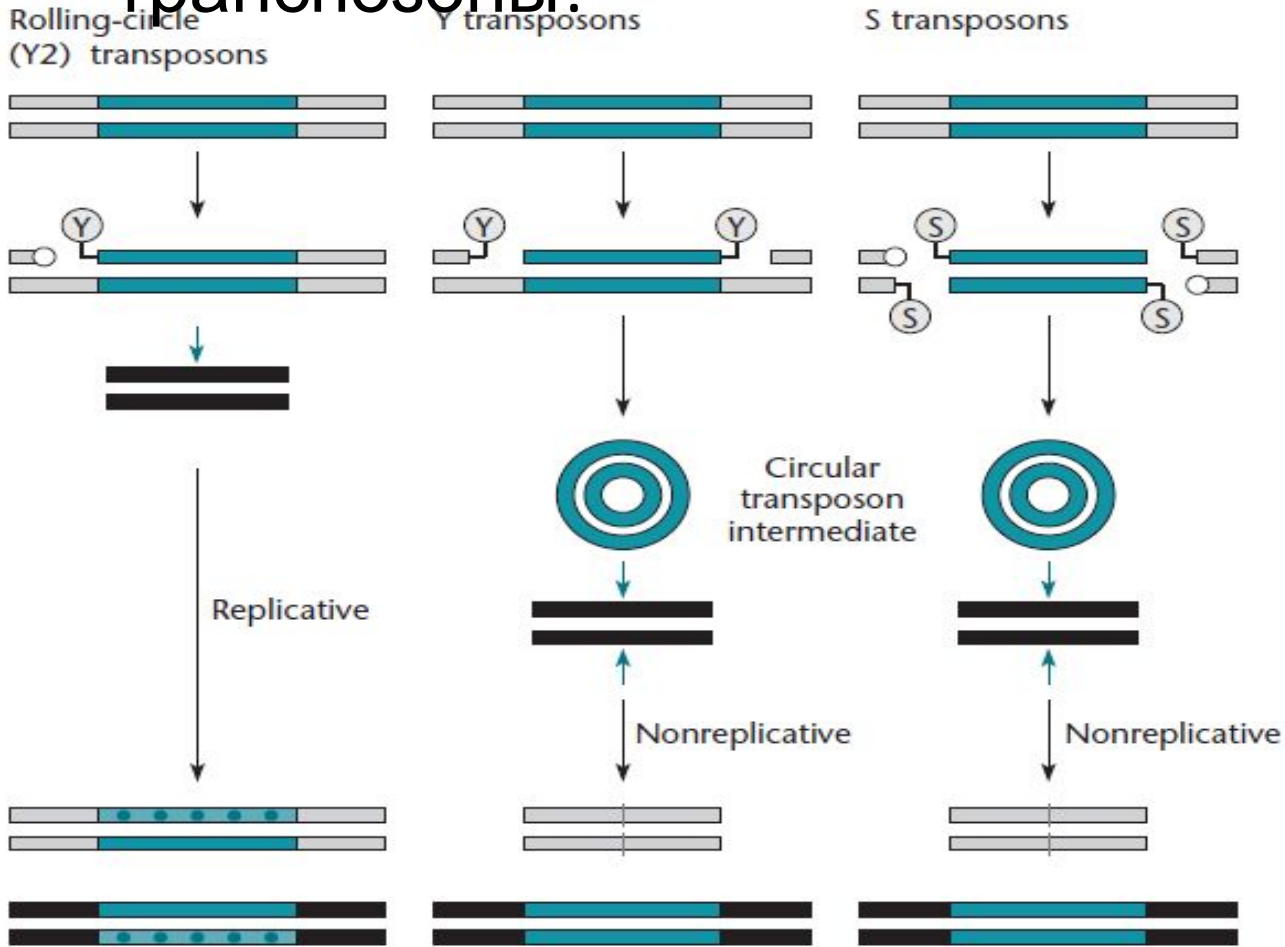
DDE-

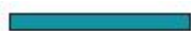

транспозоны

Это все транспозоны, о которых мы говорили выше. DDE – это два аспартата и один глутамат в активном центре транспозазы таких транспозонов.



А бывают и другие транспозоны!



 Transposon DNA
 Newly replicated transposon DNA

▣ Target site duplication

○ Attacking 3' OH nucleophile

↓ ↑ Sites of target joining events

| Excision site from donor DNA

Ⓨ Phosphotyrosine covalent linkage of tyrosine recombinase

Ⓢ Phosphoserine covalent linkage of serine recombinase

Сайт-специфическая рекомбинация

Происходит по коротким участкам строго определенной последовательности.

Хотя эти участки почти всегда содержат комплементарные друг другу куски, они слишком коротки, чтобы по ним могла пройти гомологическая рекомбинация.

Для сайт-специфической рекомбинации нужны специальные ферменты, которые так и называются: сайт-специфические рекомбиназы. Их существует довольно много разных типов. Например, к ним относится уже знакомая нам резольваза транспозона Tn3, а также все тирозиновые и сериновые рекомбиназы.

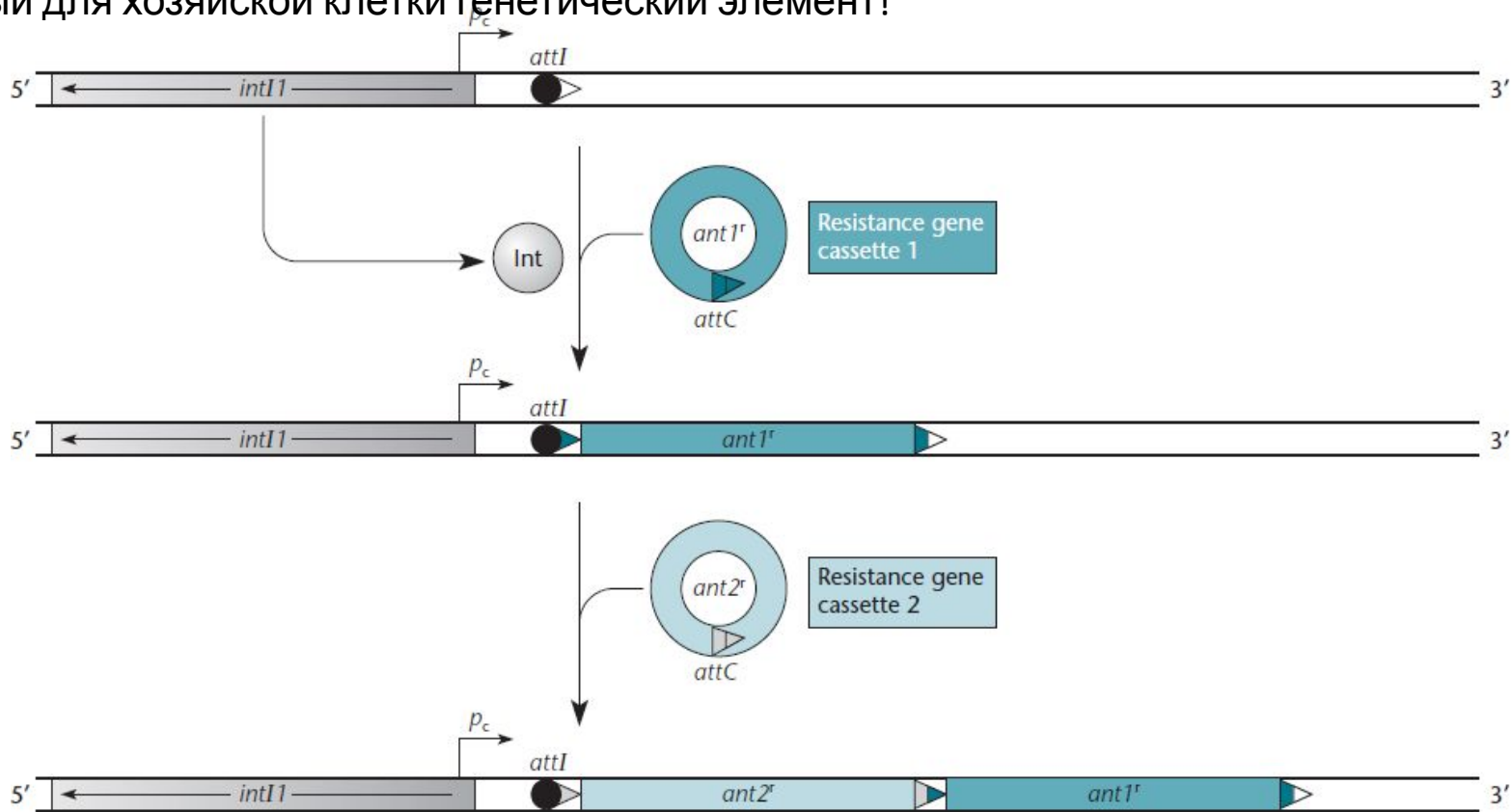
Интеграз

Тип сайт-специфических рекомбиназ, действующий так же, как и резольвазы, разрезающие коинтеграта. Однако интегразы катализируют рекомбинацию между определенными участками двух разных молекул ДНК.

Мы уже знаем такие интегразы, как Int фага лямбда и, к примеру, интегративного конъюгирующего элемента Tn916.

Интегрон

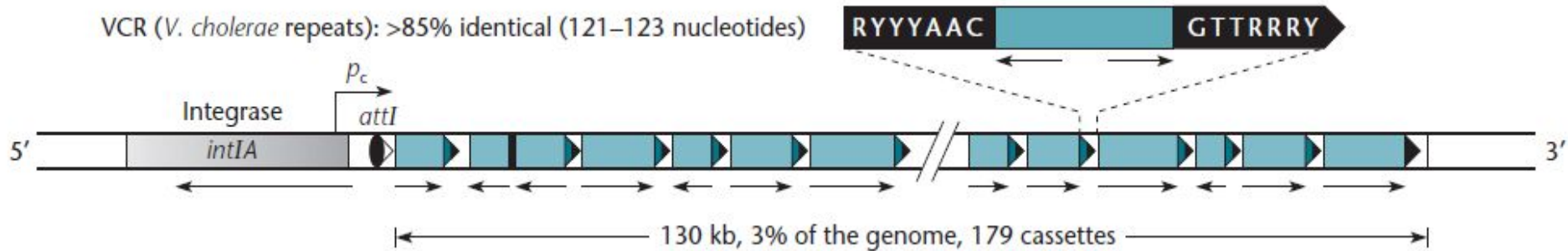
Так называются участки крупных транспозонов, в которых собраны гены устойчивости к антибиотикам. Такие гены часто вырезаются откуда-нибудь (допустим, из плазмид) и некоторое время существуют в виде кольца (это называется «кассета»). При этом в таком кольце должен быть участок, узнаваемый интегронной интегразой (*attC*). В самом интегрене есть ген интегразы *intI1* и участок интеграции *attI* под сильным промотором. Интеграза узнает участки *attI* и *attC* и проводит рекомбинацию. В дальнейшем (в следующих поколениях) ситуация может повториться с другими генами устойчивости. В результате образуется чрезвычайно выгодный для хозяйской клетки генетический элемент!



Интегроны

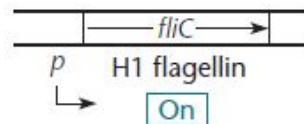
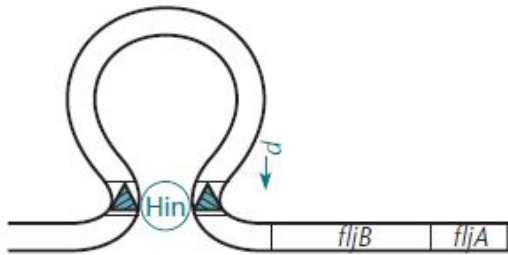
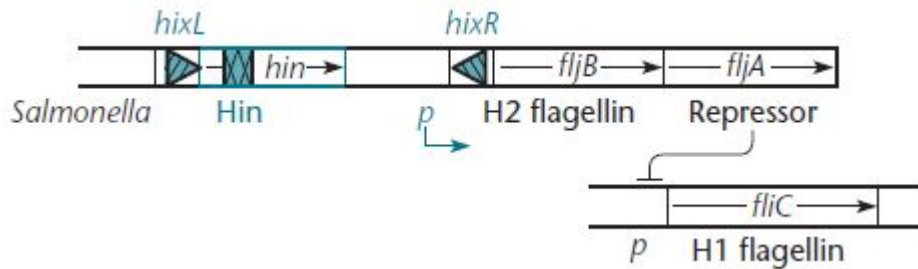
ы

Интегроны встречаются не только в транспозонах, но и в хромосомах. Хороший пример – холерный вибрион, в геноме которого имеется так называемый суперинтегрон, содержащий 179 кассет, кодирующие белки, функция большинства из которых неизвестна (но некоторые из них – точно белки устойчивости). Кассеты разделены участками, крайне напоминающие *attI*. Также в нужном месте имеется и ген интегразы. Хотя экспериментально и не показано, что это интегрон, больше такому участку быть вроде нечем.



ДНК-инвертазы

Это почти то же самое, что и резольвазы (о которых мы специально говорить не будем, поскольку уже сделали это, разбирая репликативную транспозицию Tn3). Если резольвазы имеют дело с участками рекомбинации в прямой ориентации, то ДНК-инвертазы работают с инвертированными повторами, что приводит к инверсии последовательности ДНК, заключенной между ними.



Это участок инверсии сальмонеллы, ограниченный hix-повторами, и содержащий ген инвертазы hin и промотор, под которым расположены:

- fljB – ген флагеллина H2, сильного поверхностного антигена сальмонеллы,
 - fljA – ген репрессора fljC, кодирующего флагеллин H1, другой сильный антиген.
- Когда Hin осуществляет инверсию, вышеупомянутый промотор начинает смотреть в другую сторону, и с него ничего не синтезируется. Это значит, что флагеллина H2 больше нет, а флагеллину H1 ничто больше не мешает синтезироваться, что он и делает. Такая замена флагеллинов позволяет сальмонелле быть более устойчивой к хозяйской иммунной системе.

Механизмы работы сайт-специфических рекомбиназ

Все сайт-специфические рекомбиназы по механизму действия делятся на две группы: тирозиновые (Y) и сериновые (S). Соответственно, либо тирозин, либо серин является основной аминокислотой каталитического центра фермента, играющей критическую роль при осуществлении акта рекомбинации.

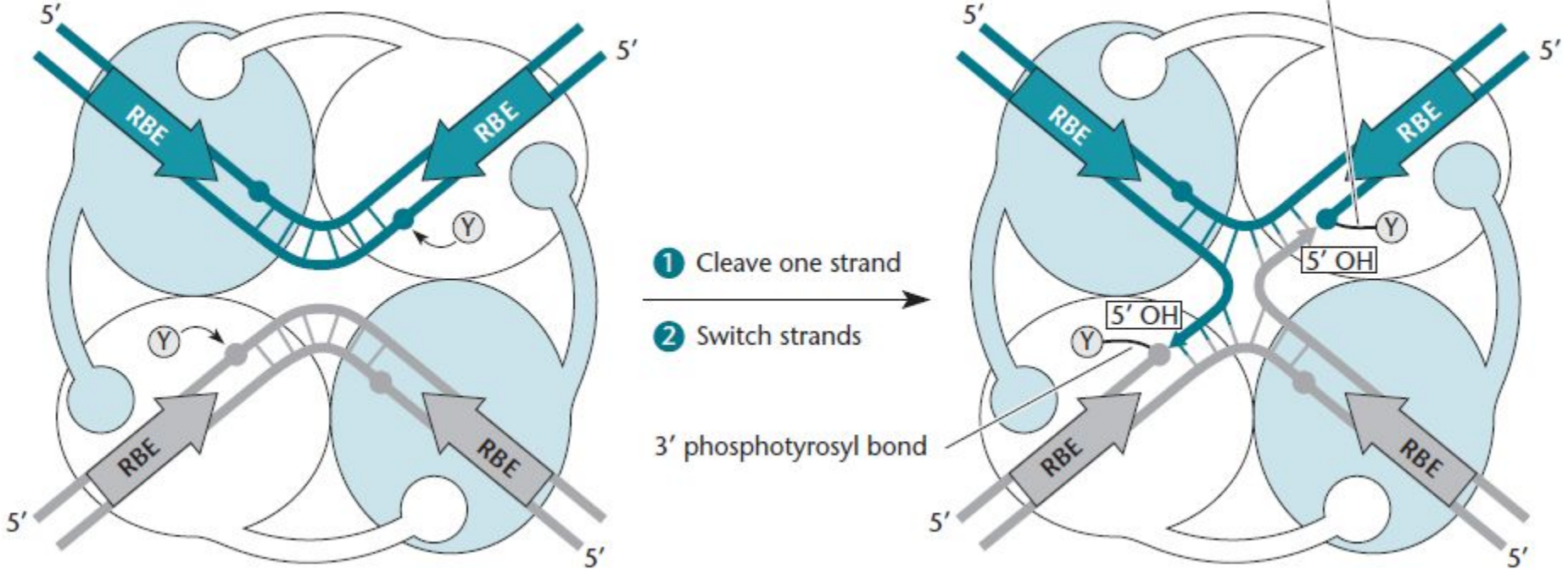
Тирозиновые рекомбиназы

Resolvases	
<i>E. coli</i>	Plasmid/phage P1 Cre Plasmid F ResD Phage N15 telomere resolvase
<i>Borrelia</i> spp.	Telomere resolvase
<i>S. sonnei</i>	Plasmid Collb-P9 shufflon
Bacteria	XerCD
<i>Saccharomyces</i> spp.	Flp
Integrases	
<i>E. coli</i>	Phage λ integrase
Bacteria	Integrase of integrons
Superfamily	
Eukaryotes	Topoisomerases
Viruses, e.g., vaccinia virus	Topoisomerase

Сериновые

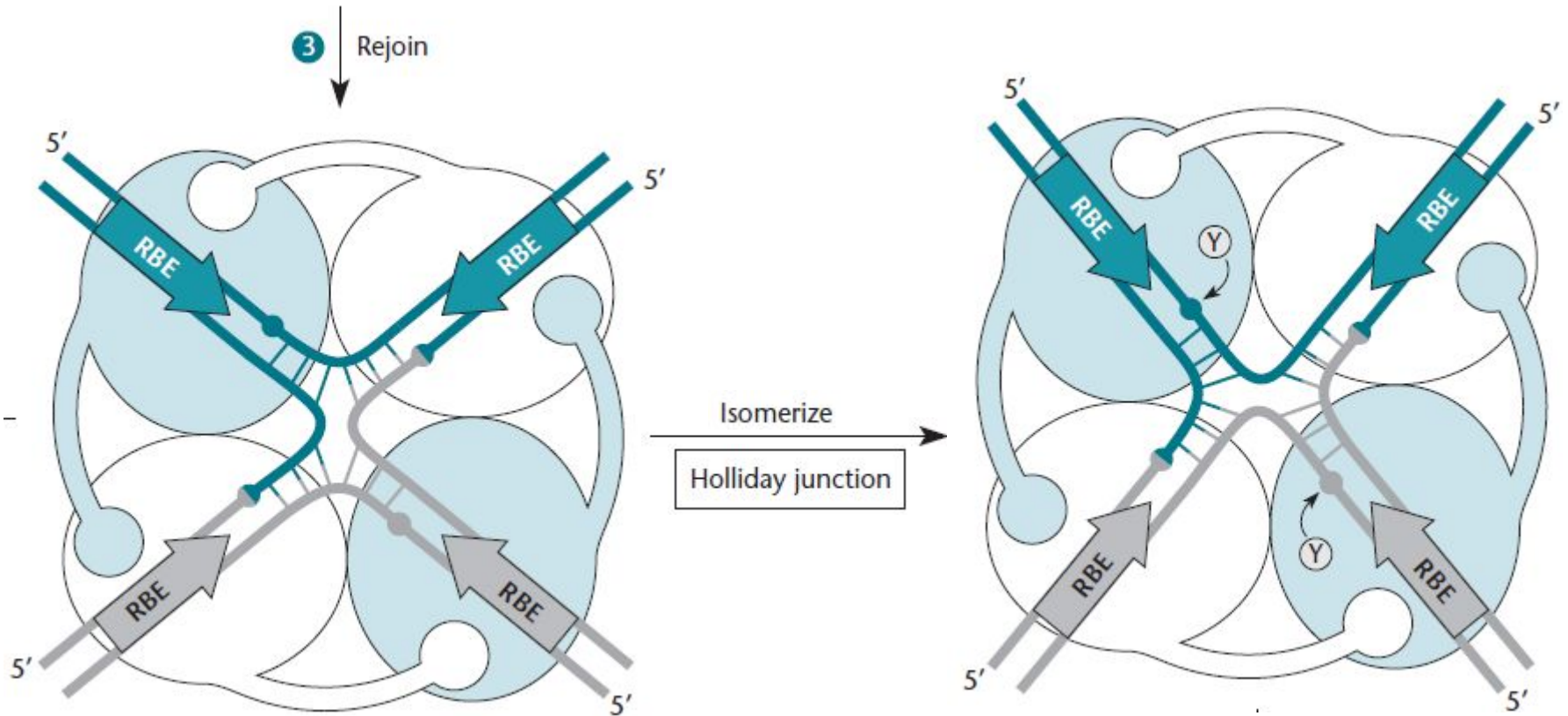
Resolvases	
<i>E. coli</i>	TnpR of Tn3 Resolvase of $\gamma\delta$ ParA of RP4/RK2
<i>Enterococcus</i> spp.	TnpR of Tn917
Invertases	
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	Hin flagellar invertase
<i>E. coli</i> phage Mu	Gin tail fiber invertase
Superfamily	
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Integrase of phage ϕ C31
<i>B. subtilis</i>	SpoIVCA recombinase
<i>Anabaena</i> spp.	Heterocyst recombinase

Как работают Y-рекомбиназы (на примере Cre)



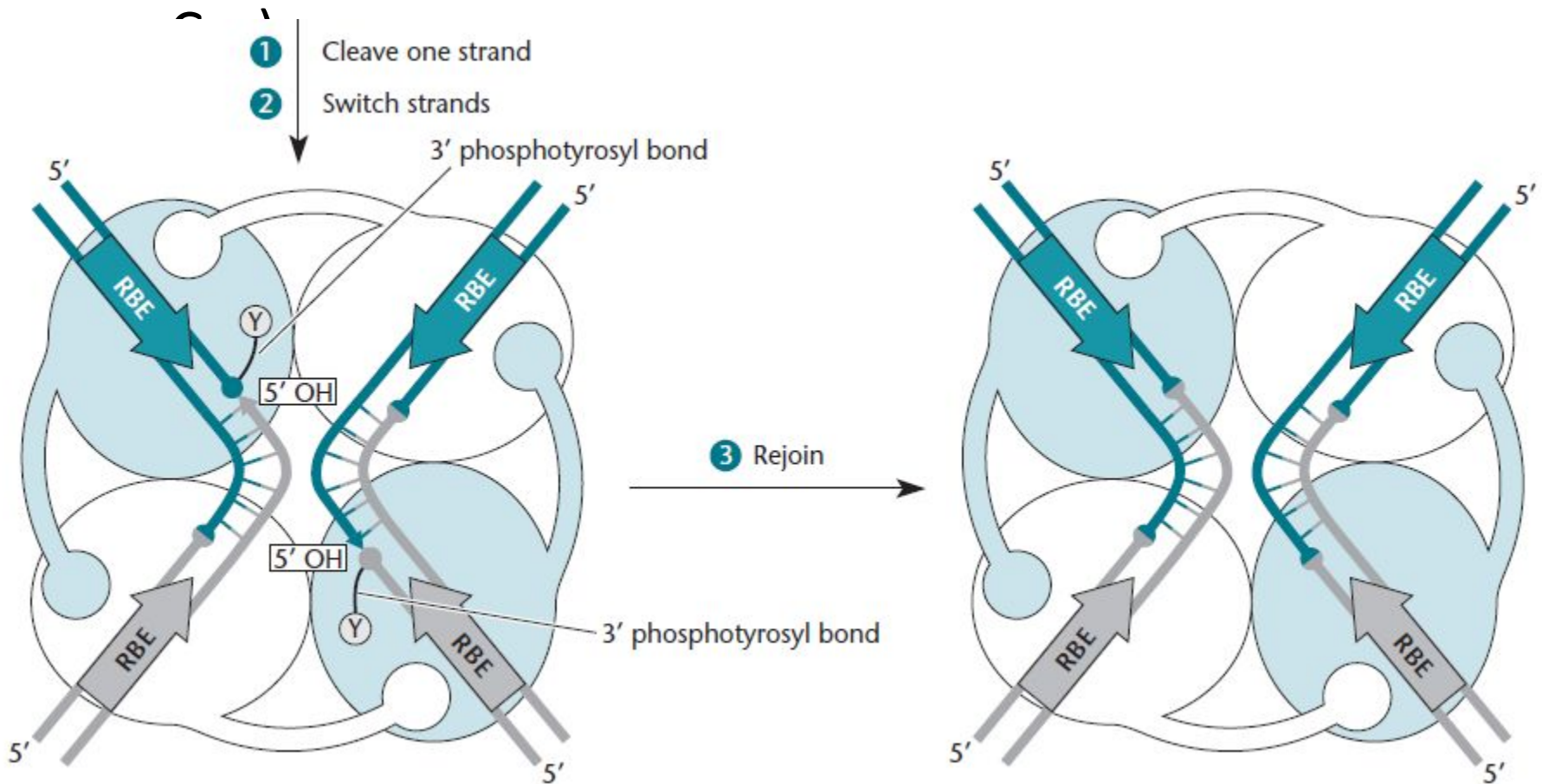
1. 4 молекулы фермента связывают 2 рекомбинирующие молекулы, в каждой из которых есть по 2 RBE-участка (recombinase binding element, инвертированные повторы). Тирозины активных центров двух молекул фермента атакуют определенные нуклеотиды сайта рекомбинации и вносят в них одноцепочечные разрывы, ковалентно связываясь с их 3'-концами и формируя 5'-гидроксильные группы.
2. Каждый 5'-гидроксил атакует противоположную 3'-фосфорилтирозиновую связь, вызывая тем самым «переброс» цепочек ДНК. При этом формируются 3-4 новых водородных связи между цепочками ДНК, ранее принадлежавшим к разным молекулам.

Как работают Y-рекомбиназы (на примере



3. В результате атаки нуклеофильными 5'-гидроксилами 3'-фосфорилтирозиновых связей создаются две новые фосфодиэфирные связи и формируется структура Холлидея, которая изомеризуется (не до конца ясно как) .

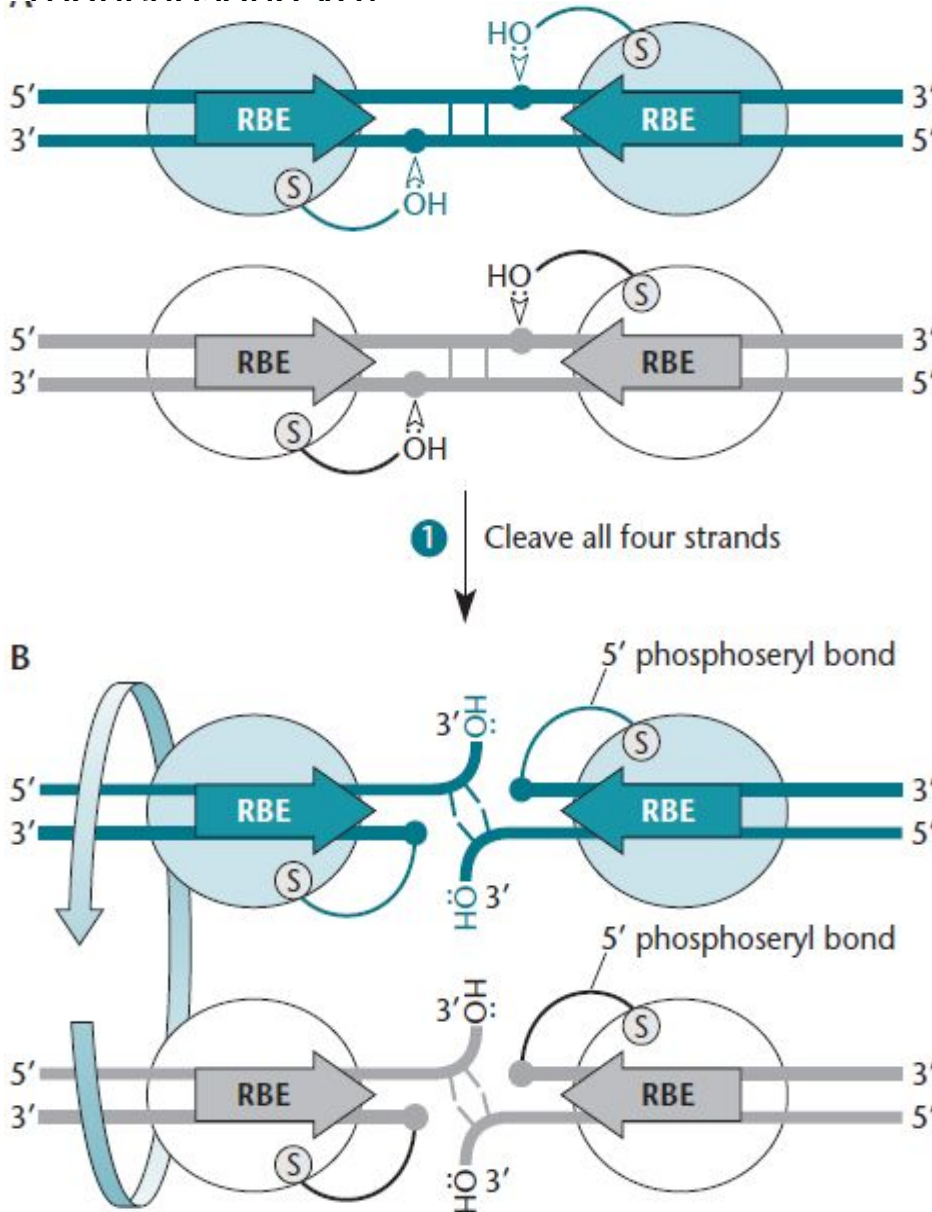
Как работают Y-рекомбиназы (на примере



Изомеризация структуры Холидея каким-то образом подает сигнал двум пока незадействованным молекулам рекомбиназы, которые активизируются и делают все то же самое, только с двумя не участвовавшими в процессе ранее цепочками ДНК. В результате получаются две новых двуцепочечных молекулы ДНК, каждая из которых состоит из половины одной и половины другой исходных молекул.

Как работают S-рекомбиназы (на примере резольвазы

и транспозона $\nu\delta$)



4 молекулы фермента связывают две молекулы ДНК по сайтам RBE. Серины активных центров атакуют фосфодиэфирные связи в определенных положениях (причем работают сразу все 4 фермента, а не два, как в случае γ).

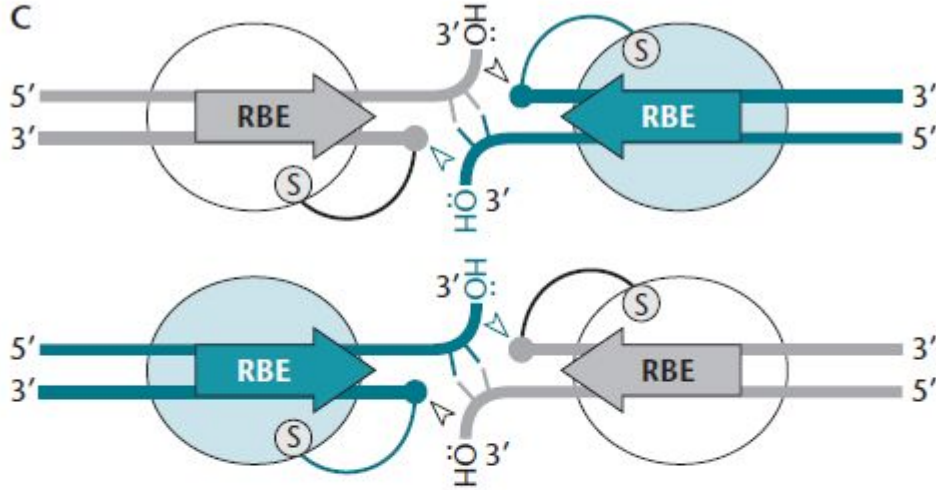
В результате обе молекулы ДНК разрезаются по обеим цепочкам с образованием свободных 3'-гидроксильных и 5'-фосфорилсериновых связей.

Далее каким-то образом происходит переворот одной из двух половин комплекса на 180 градусов. Строгого доказательства этому нет, но (1) есть косвенные указания, (2) как-то по-другому представить себе процесс не получается.

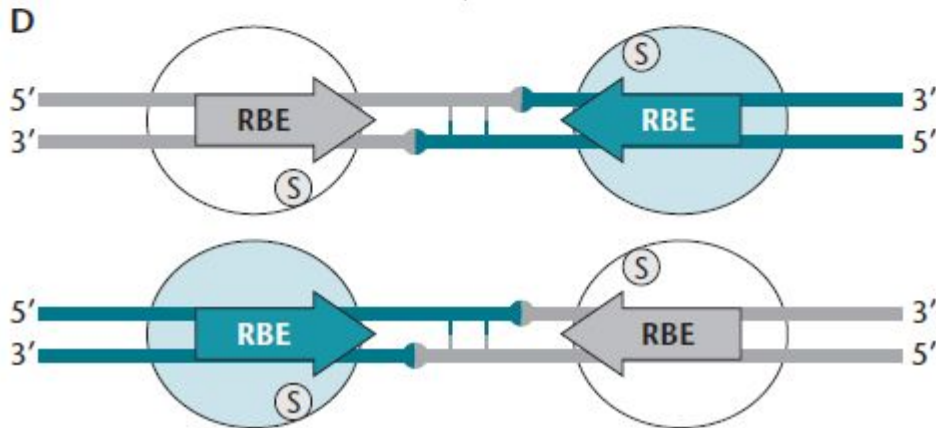
Как работают S-рекомбиназы (на примере резольвазы транспозона $\nu\delta$)

транспозона $\nu\delta$)

2 Switch strands



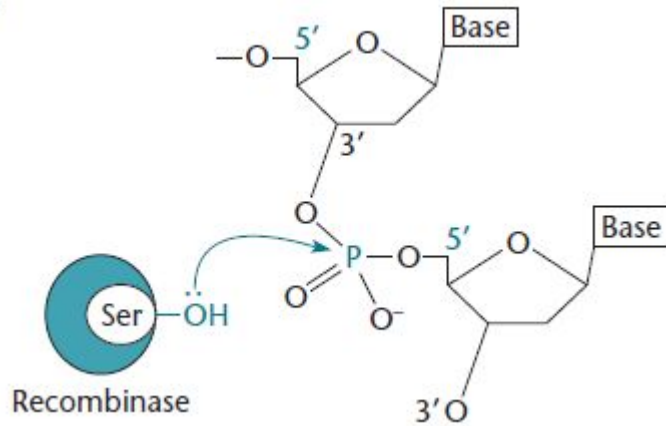
3 Rejoin



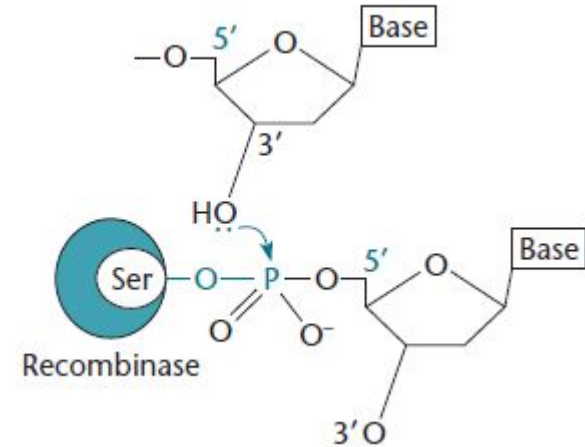
В результате переворота происходит сближение фрагментов ДНК, принадлежавших разным исходным молекулам. После этого 3'-гидроксилы атакуют 5'-фосфорилсериновые связи, наводятся новые фосфодиэфирные связи и получаются два продукта рекомбинации!

Детали участия серина в рекомбинации

A



B



C

