

Stabilność genomu

Mutageneza i naprawa DNA. Rekombinacja.

Literatura

- Brown, rozdział 16
- Allison, rozdział 7

Dokładność replikacji

- Systemy replikacyjne współczesnych organizmów są bardzo dokładne
- Żadna replikacja nie może być pozbawiona błędów
 - nieskończona dokładność wymaga nieskończonej energii
- Zmienność informacji genetycznej jest nieuchronna
 - podstawa procesu ewolucji

Zmiany genomu

- Wielkoskalowe - rearanżacje genomu
 - Zmiany liczby i struktury chromosomów, w tym duplikacje całych genomów
 - Dotyczą dużej liczby genów, fenotyp plejotropowy
- Mutacje
 - Dotyczą jednego, bądź niewielkiej liczby genów

Powstawanie mutacji - teorie

- **Spontaniczne**

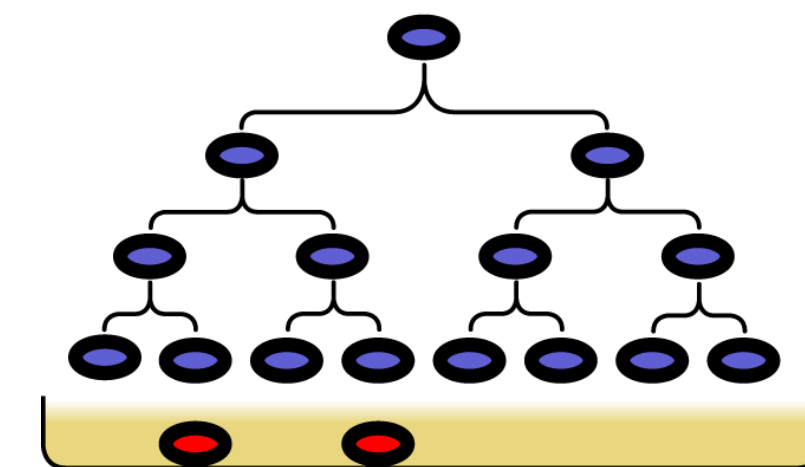
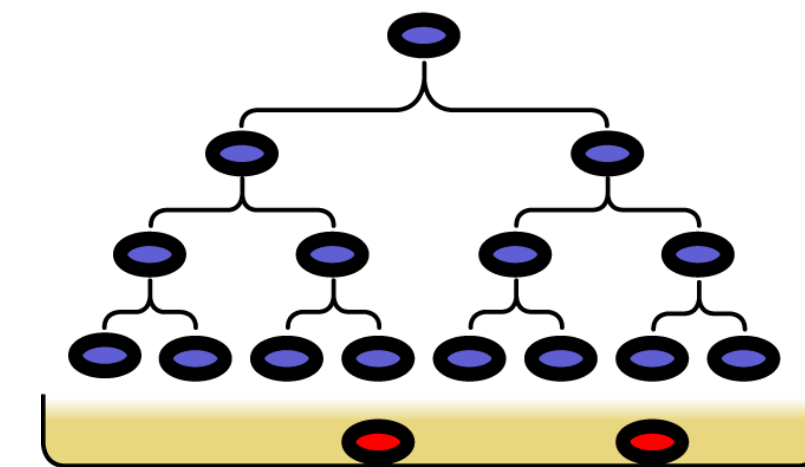
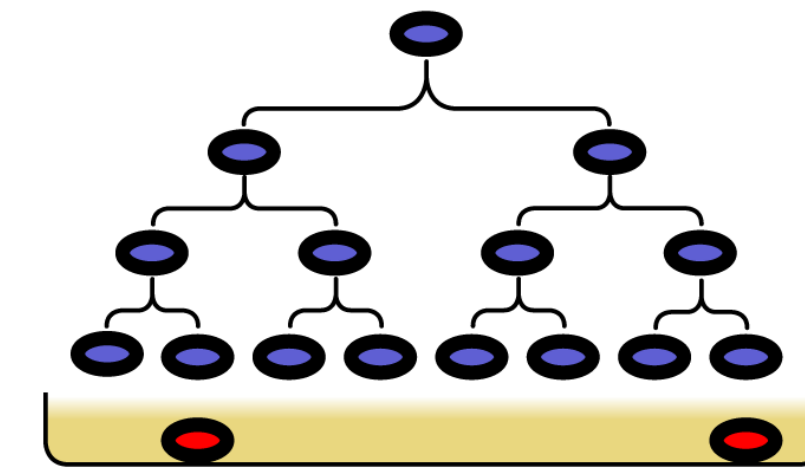
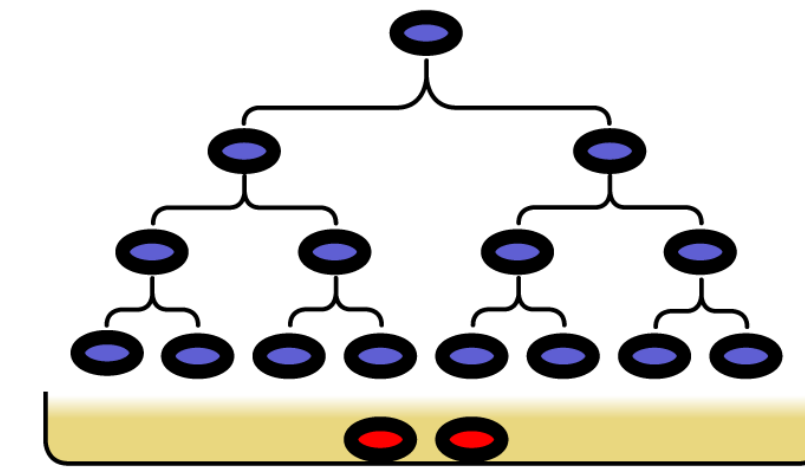
- powstają przypadkowo, środowisko może wpływać na częstość (np. mutageny) mutacji, ale nie na to, w którym genie zachodzą

- **Indukowane**

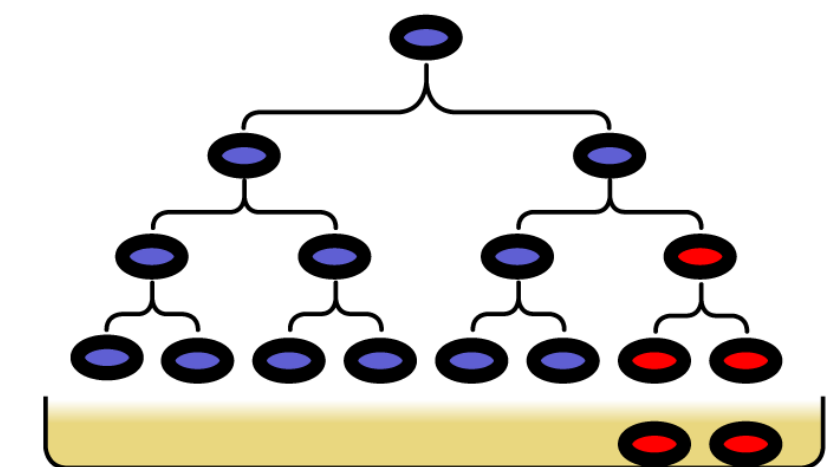
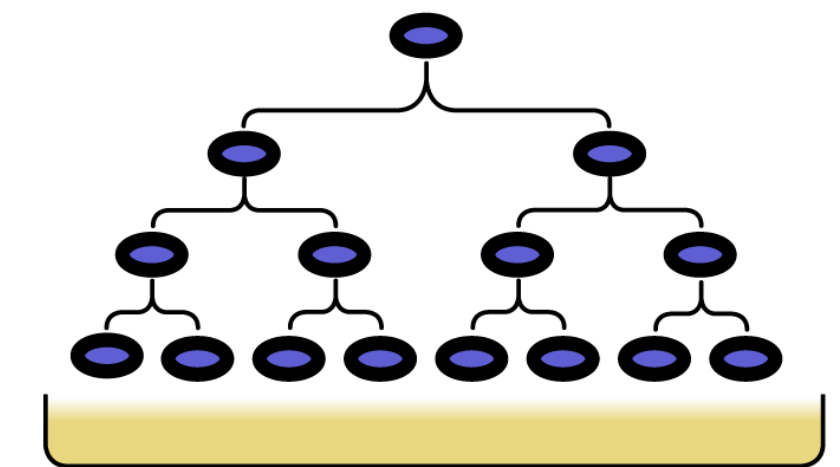
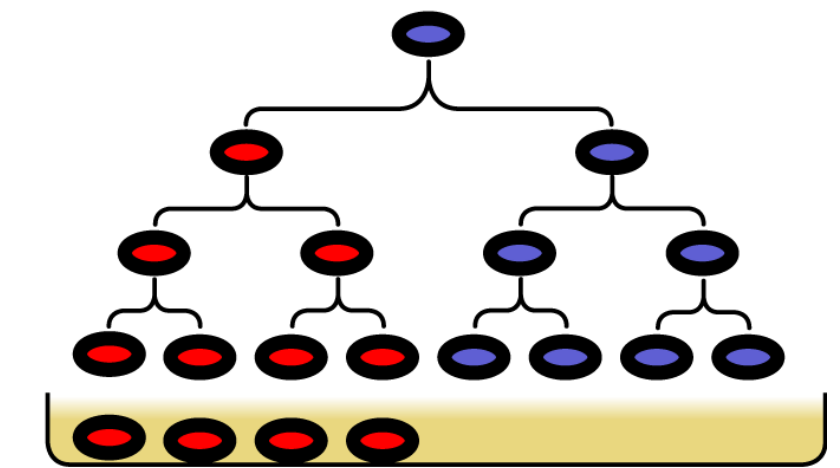
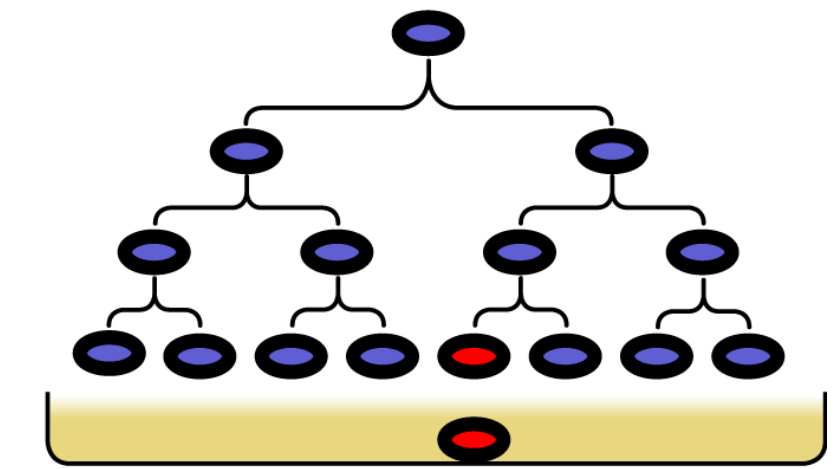
- powstają w konkretnym genie w odpowiedzi na czynnik selekcyjny

Test fluktuacyjny

- Pojawianie się mutantów *E. coli* opornych na faga T1
- Jeżeli pojawiają się w odpowiedzi na kontakt z fagiem, to fluktuacje liczby opornych kolonii z każdej hodowli będą niewielkie
- Jeżeli pojawiają się spontanicznie, to liczba opornych kolonii będzie zmienna, zależnie od tego, kiedy w hodowli pojawił się mutant

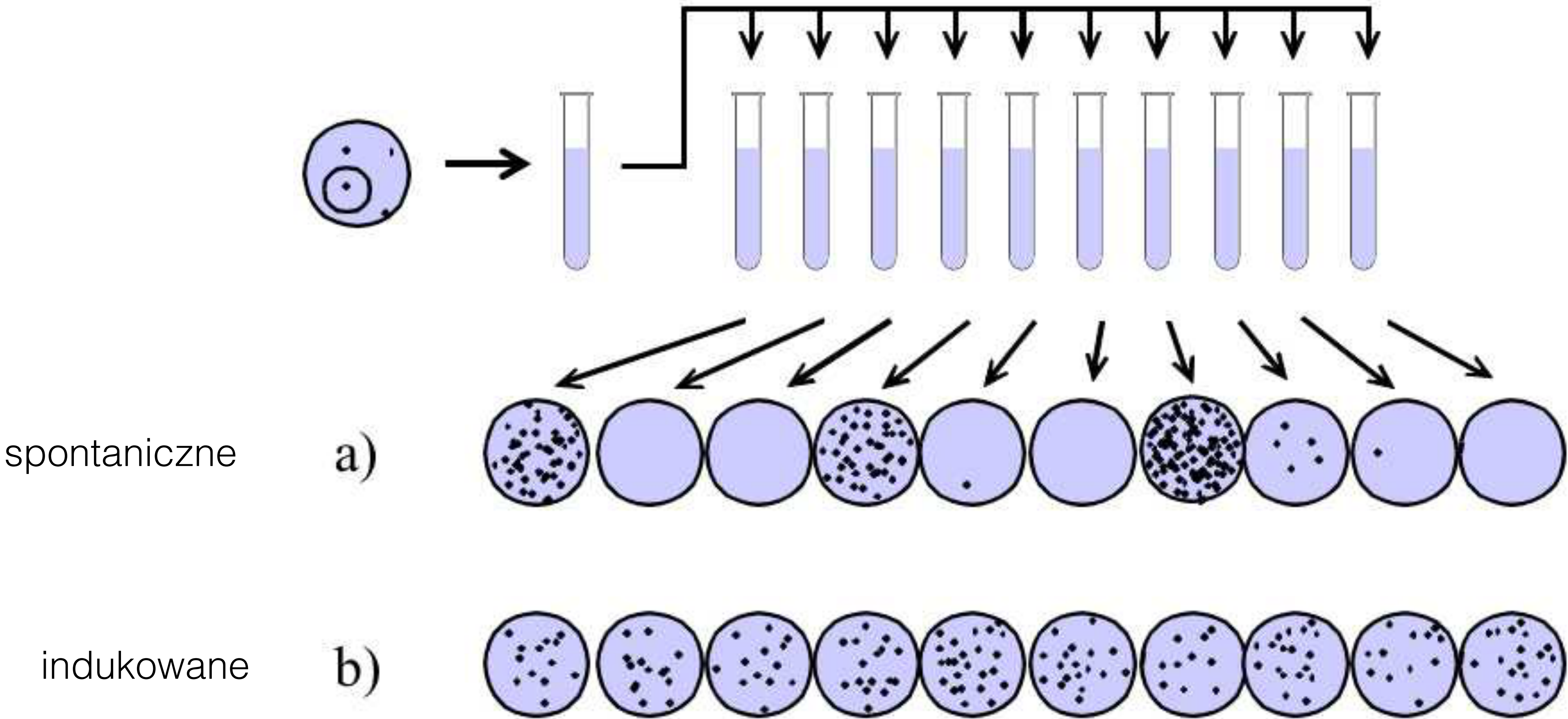


indukowane

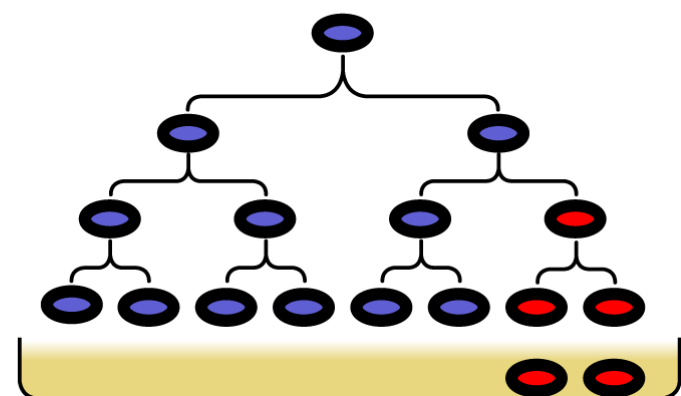
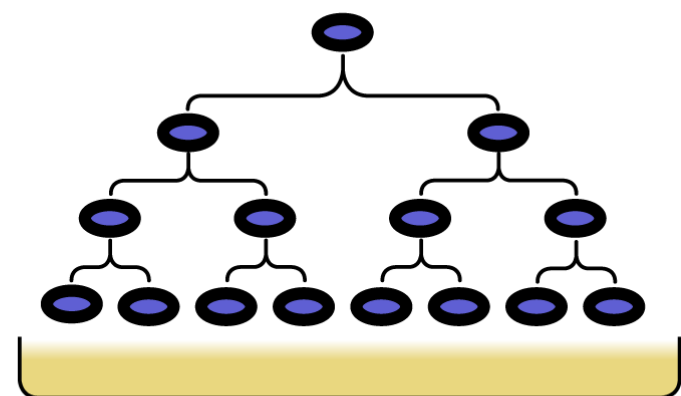
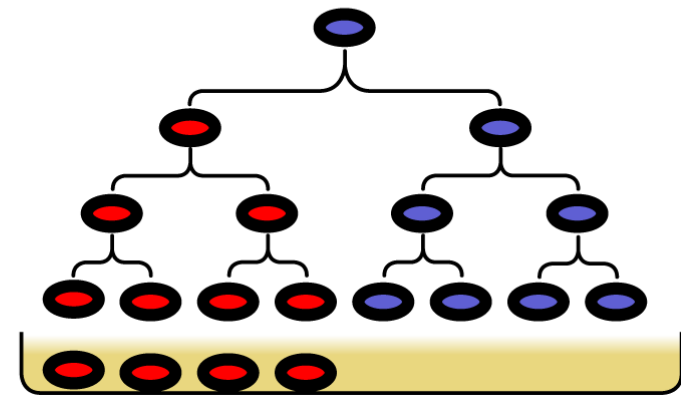
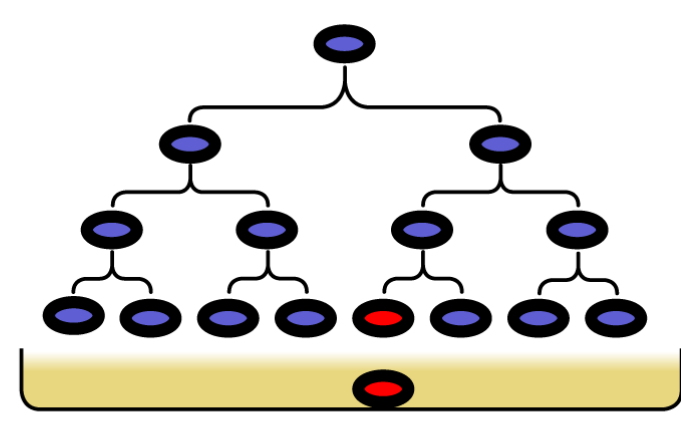
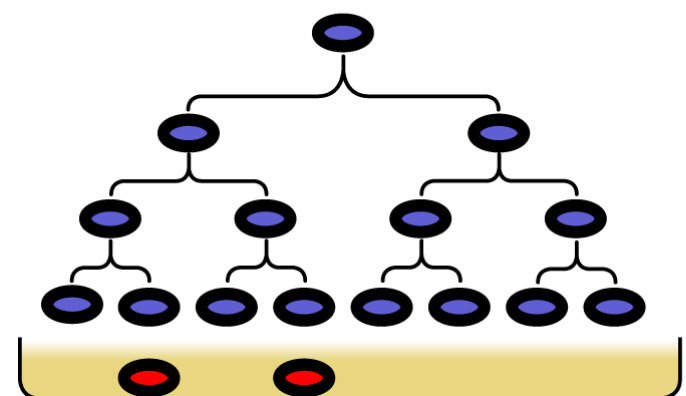
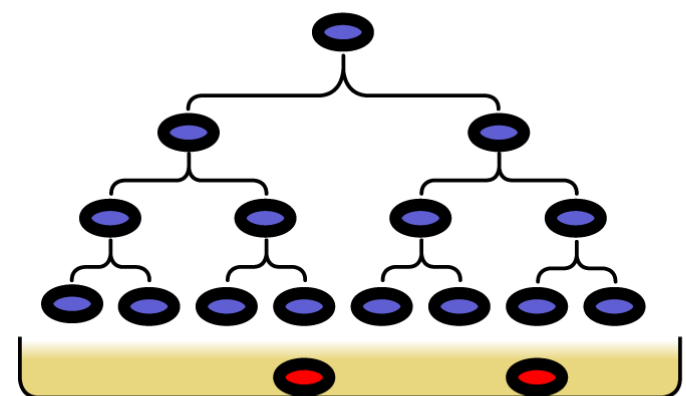
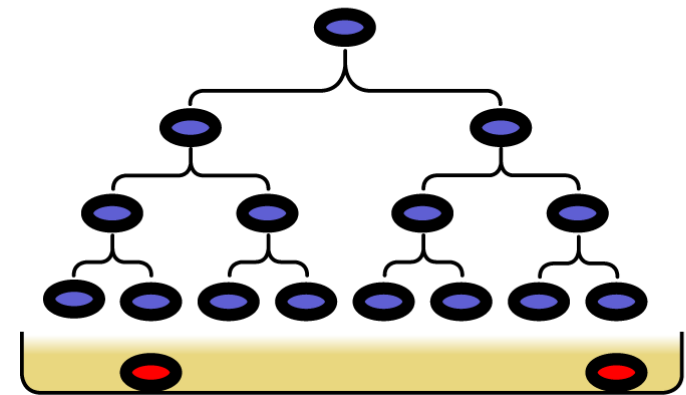
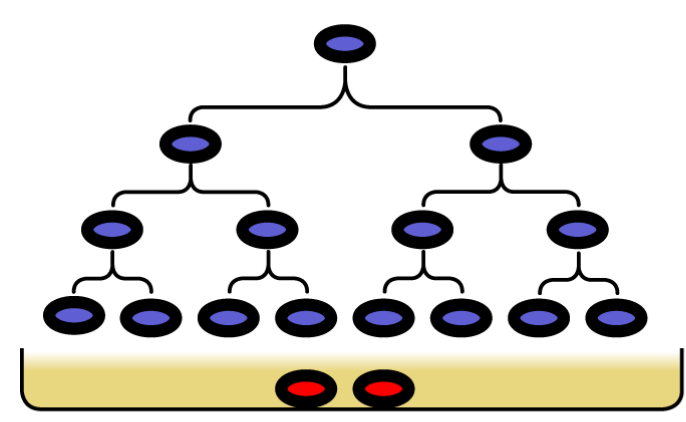


spontaniczne

Test fluktuacyjny



Test fluktuacyjny



indukowane

spontaniczne

Number of T1-Resistant Bacteria

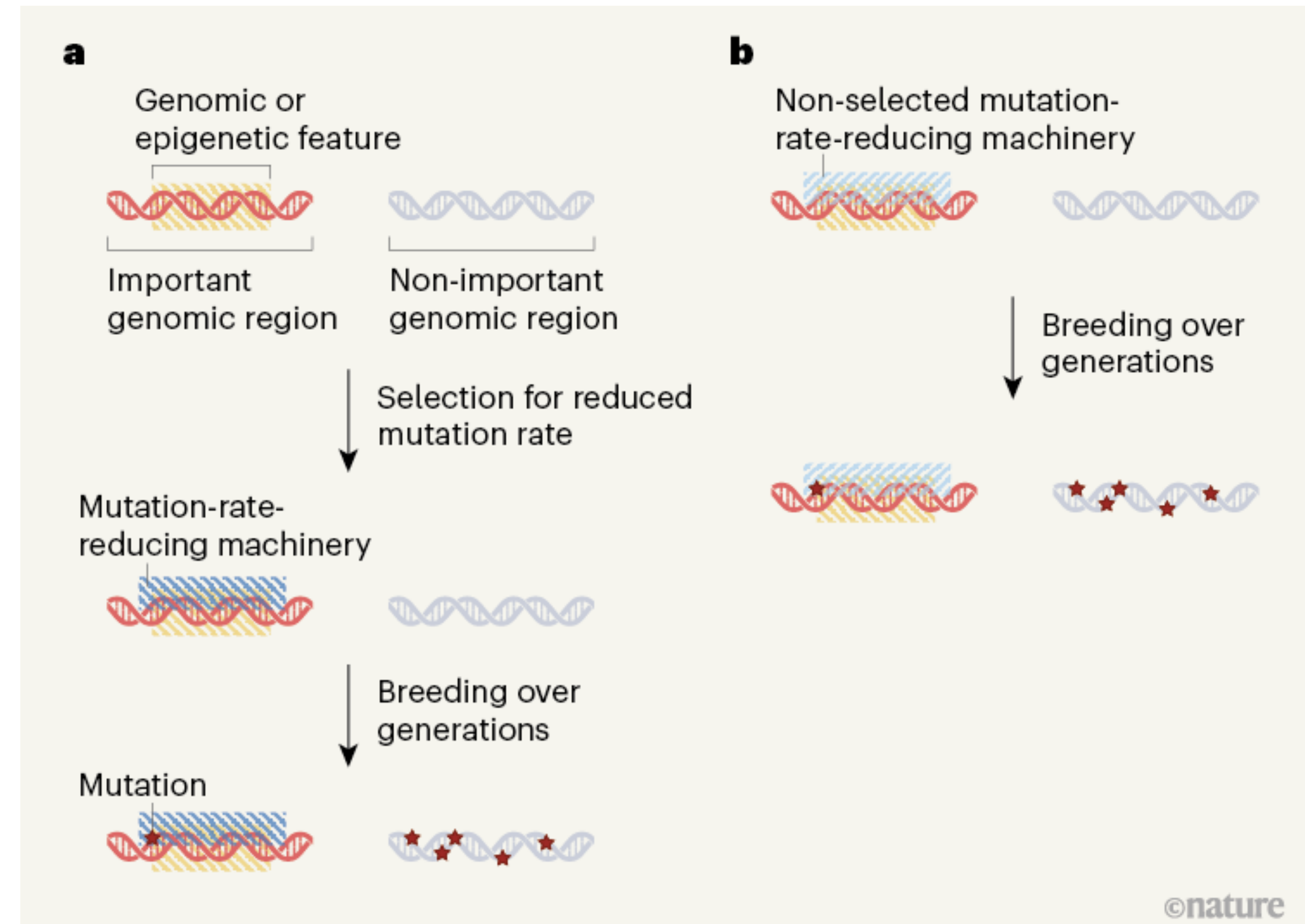
Sample No.	Same Culture (Control)	Different Cultures
1	14	6
2	15	5
3	13	10
4	21	8
5	15	24
6	14	13
7	26	165
8	16	15
9	20	6
10	13	10
Mean	16.7	26.2
Variance	15.0	2178.0

Source: After Luria and Delbrück (1943).

Luria & Delbrück, 1943

Losowość mutacji

- Losowość mutacji nie oznacza, że zachodzą zawsze z tą samą częstością i prawdopodobieństwem
- Monroe et al. (2022) - w ważniejszych obszarach genomu *Arabidopsis* mutacje powstają rzadziej
- Zwiększenie częstości mutacji w odpowiedzi na uszkodzenia (np. system SOS)
- Nie zmienia fundamentalnych wniosków z doświadczenia Lurii i Delbrücka - zmieniać może się częstość mutacji, ale nie to **jakie** mutacje zachodzą



Nature 602, 38-39 (2022)

Poziom molekularny DNA

- Podstawienia (substytucje)
- Indele (delecje i insercje)
- Rearanżacje na dużą skalę

Substytucje

- Tranzycje: zmiana nukleotydu purynowego w inny purynowy lub pirymidynowego w inny pirymidynowy
- Transwersje: zmiana nukleotydu purynowego w pirymidynowy lub pirymidynowego w purynowy
- Tranzycje zachodzą w naturze częściej od transwersji (średnio 2 do 15 x)
- mimo tego, że możliwych transwersji jest teoretycznie więcej

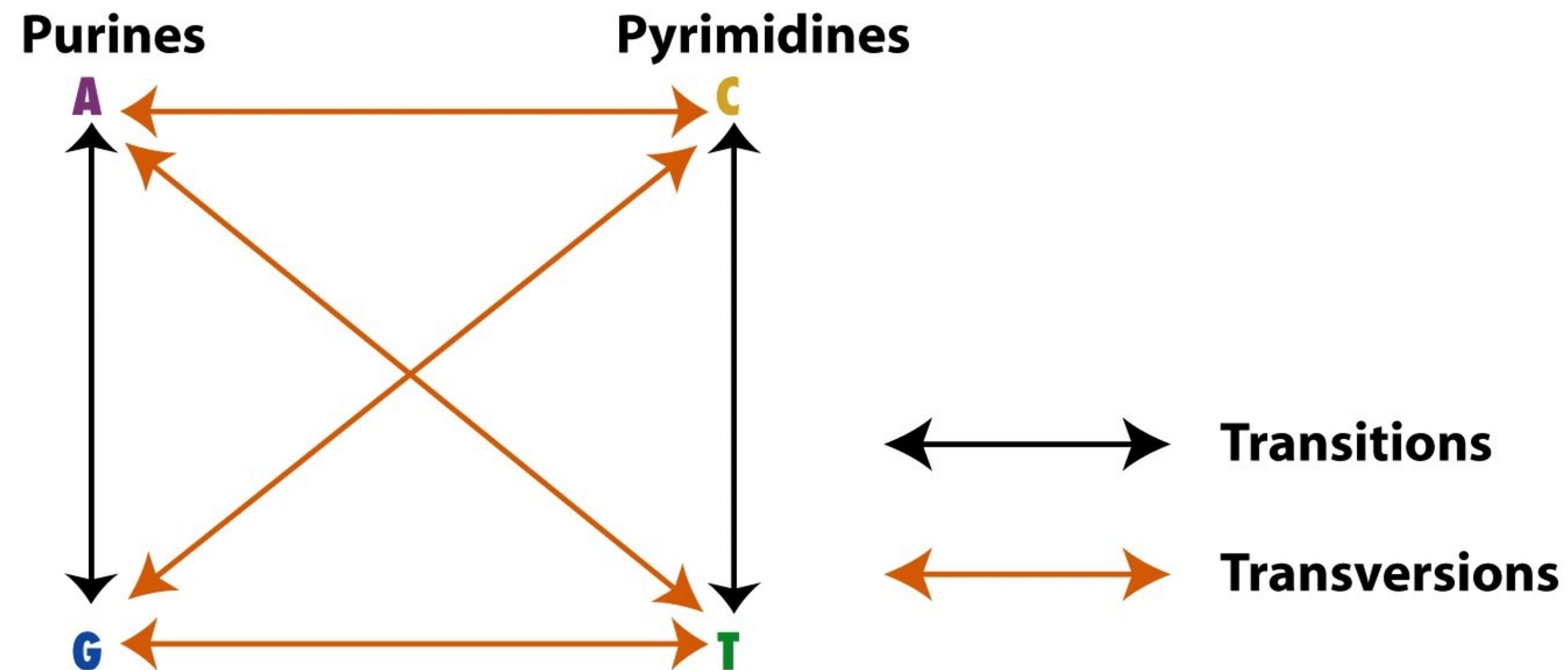


Figure 5-4 Evolutionary Analysis, 4/e
© 2007 Pearson Prentice Hall, Inc.

Mutacja

- Trwała, przekazywana przy replikacji zmiana sekwencji nukleotydowej w materiale genetycznym
- Nie każde uszkodzenie DNA jest mutacją – staje się nią dopiero po utrwaleniu i przekazaniu do cząsteczki (lub cząsteczek) potomnych

Mutacja i naprawa

A mutation

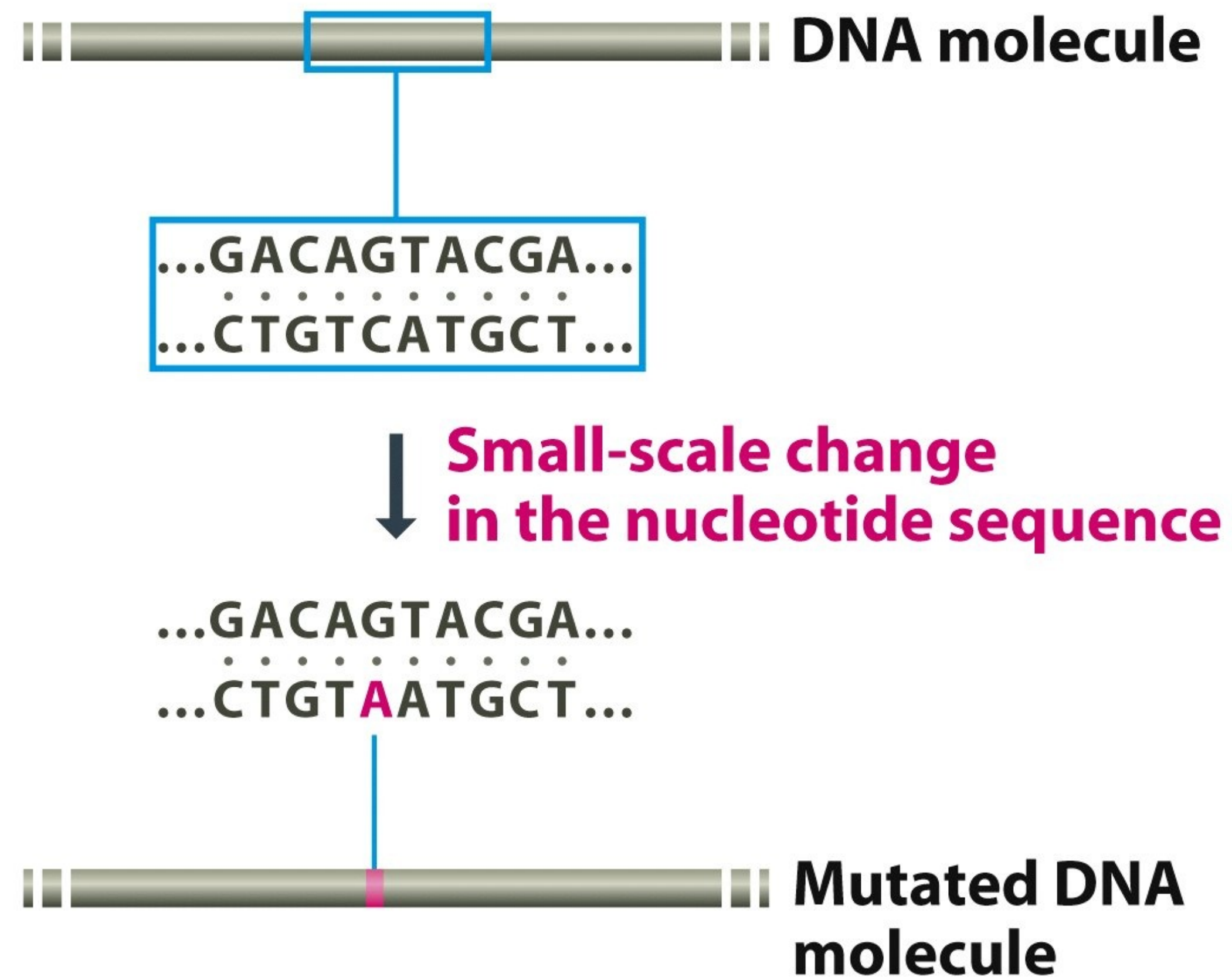


Figure 16-1a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

DNA repair

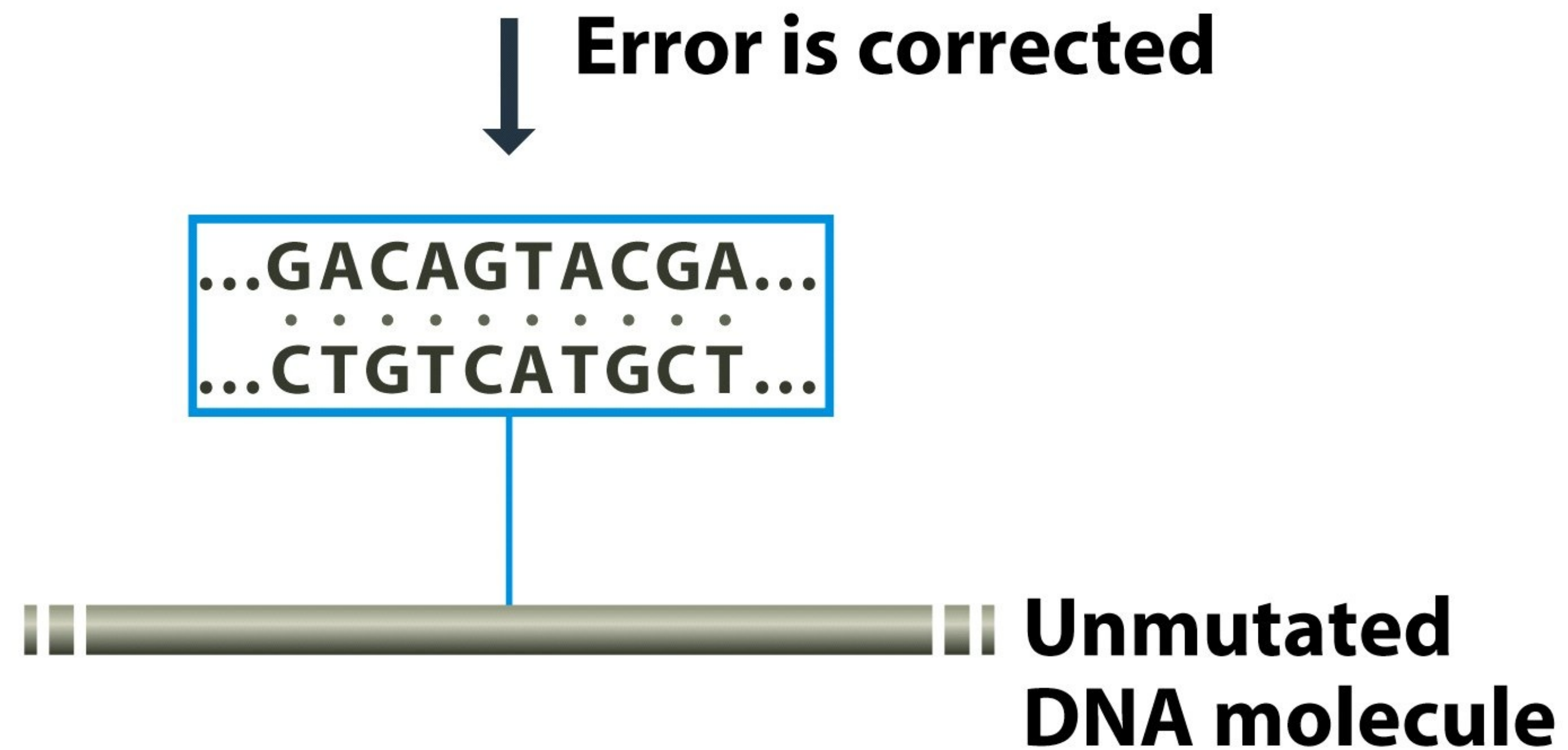


Figure 16-1b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Replikacja utrwała zmiany

An error in replication

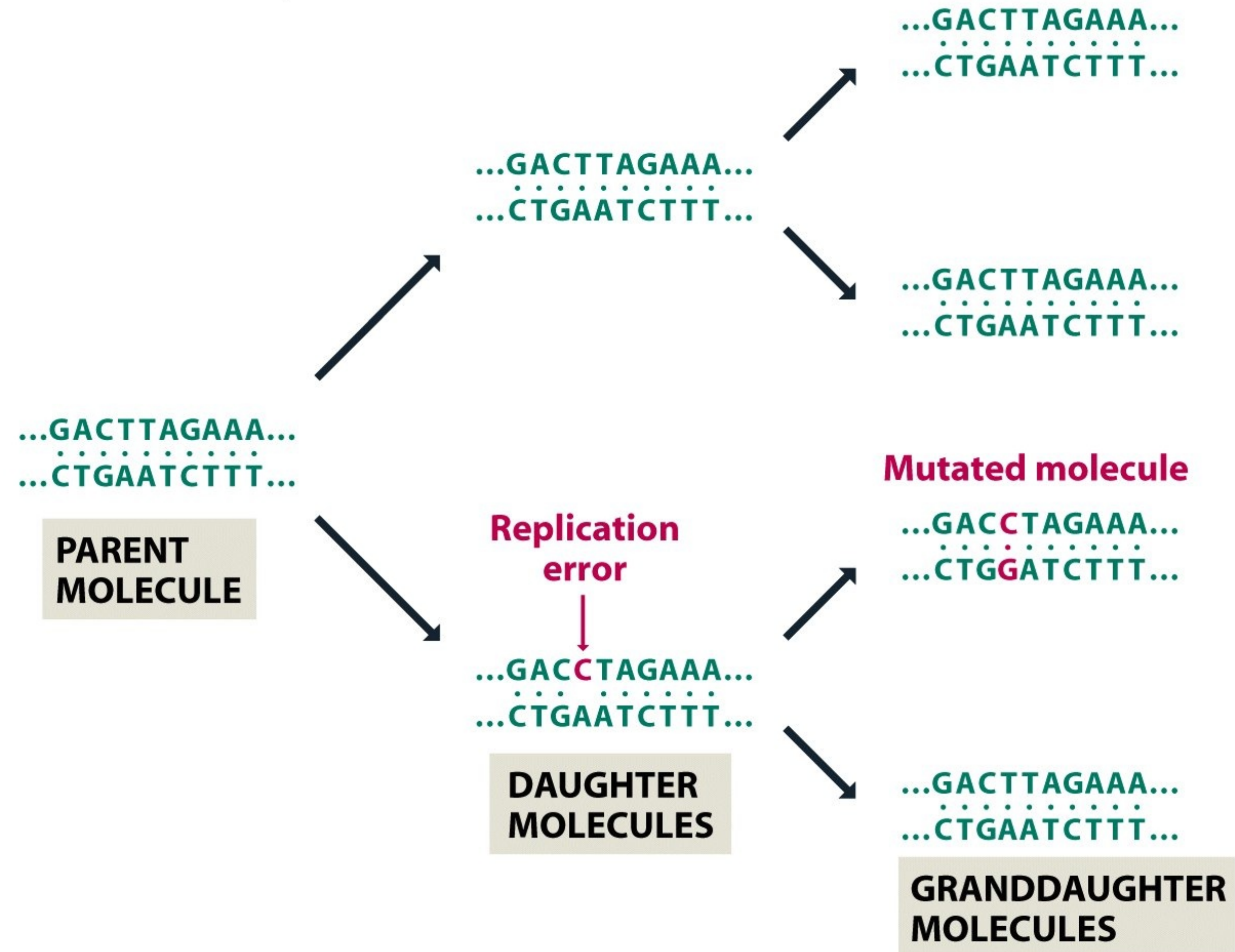


Figure 16-2a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Przyczyny mutacji

- Mutacje spontaniczne
 - Nieuniknione błędy podczas replikacji
- Mutacje indukowane
 - Błędy w wyniku działania czynników uszkodzających DNA lub zaburzających replikację – mutagenów
- Podział nie jest ścisły – mechanizmy nieraz są podobne, wiele mutagenów zwiększa częstość błędów o mechanizmie takim, jak przy mutacjach spontanicznych

Dokładność replikacji

- Specyficzność parowania nukleotydów nie jest zbyt wysoka (~3%)
- Mechanizm **selekcji nukleotydów** polimerazy: na 3 etapach:
 - wiązanie nukleotydu z polimerazą
 - przenoszenie do centrum aktywnego
 - dołączanie do 3' końca syntetyzowanego łańcucha
- Mechanizm **korekcji błędów**:
 - Aktywność egzonukleazy 3'-5'
 - Usuwanie niewłaściwie wstawionego nukleotydu
 - Zasada konkurencji między aktywnością polimerazy a egzonukleazy

Nucleotide selection

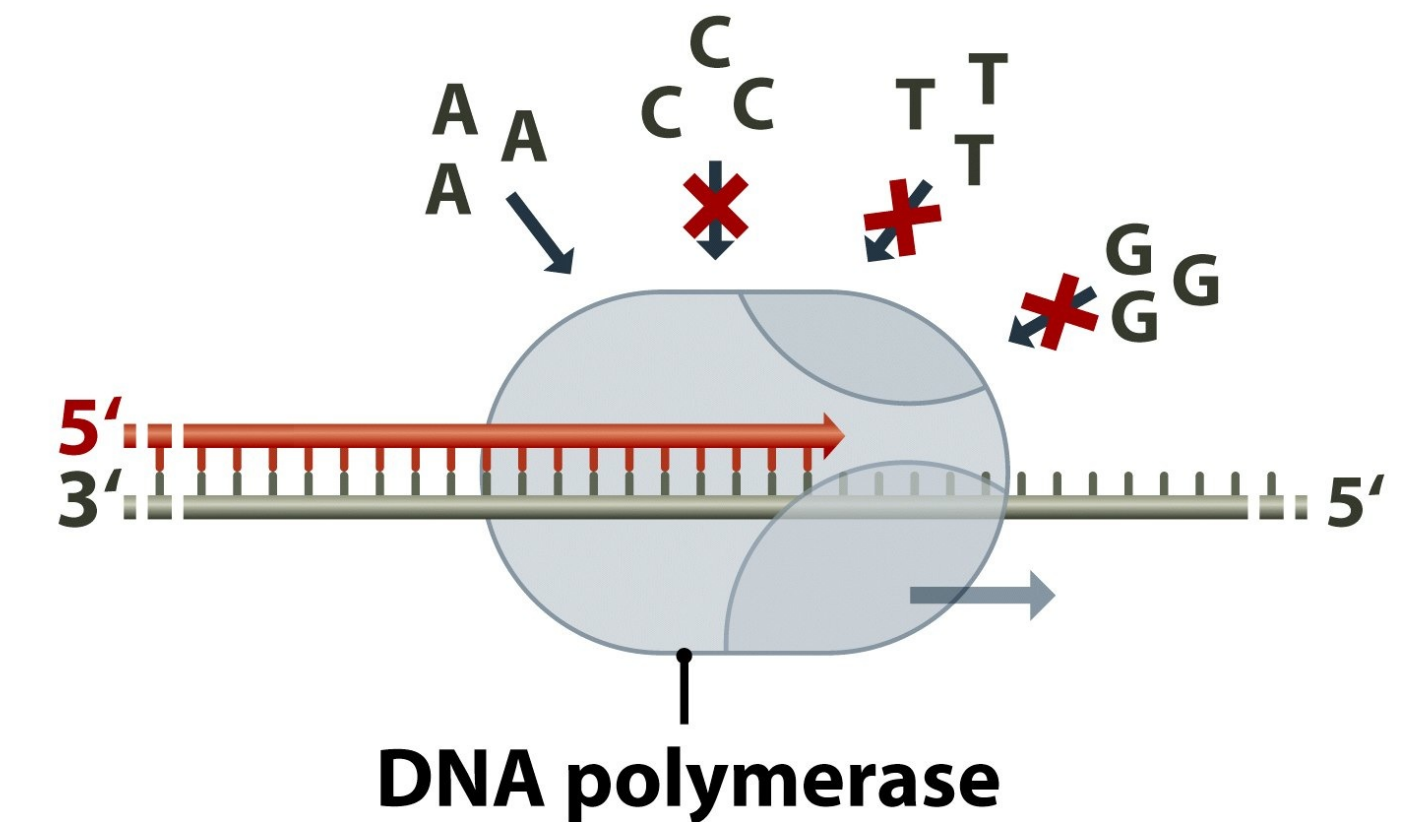
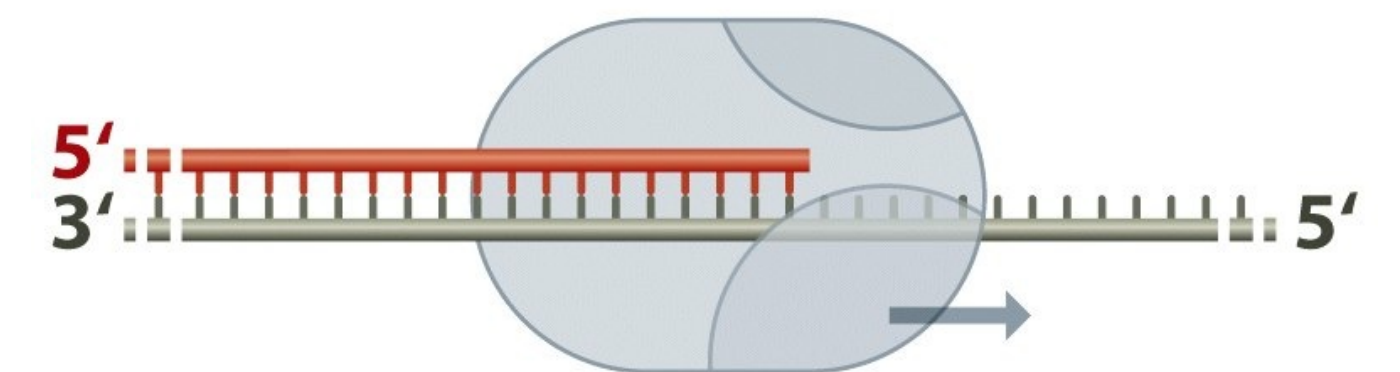
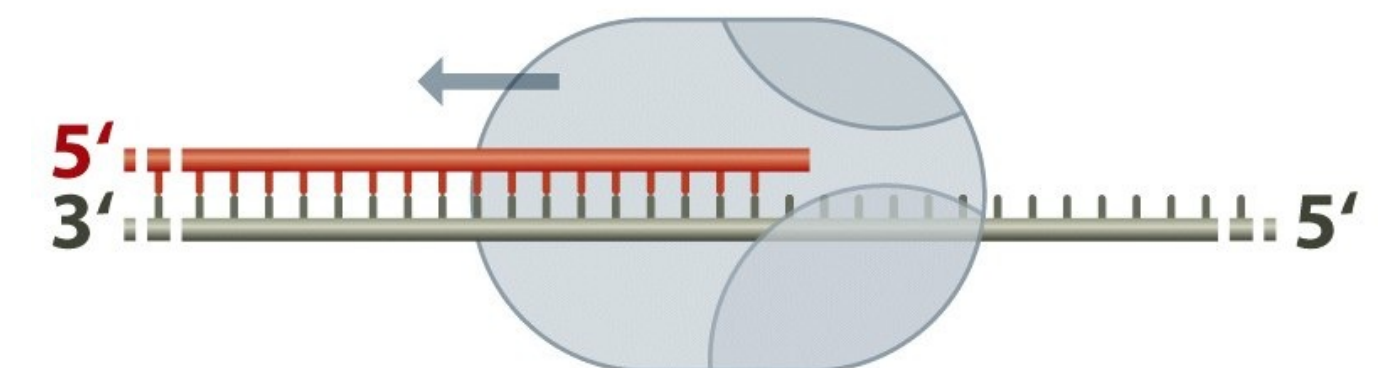


Figure 16-3a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

"Proofreading"



Last nucleotide is
base-paired
POLYMERASE WINS



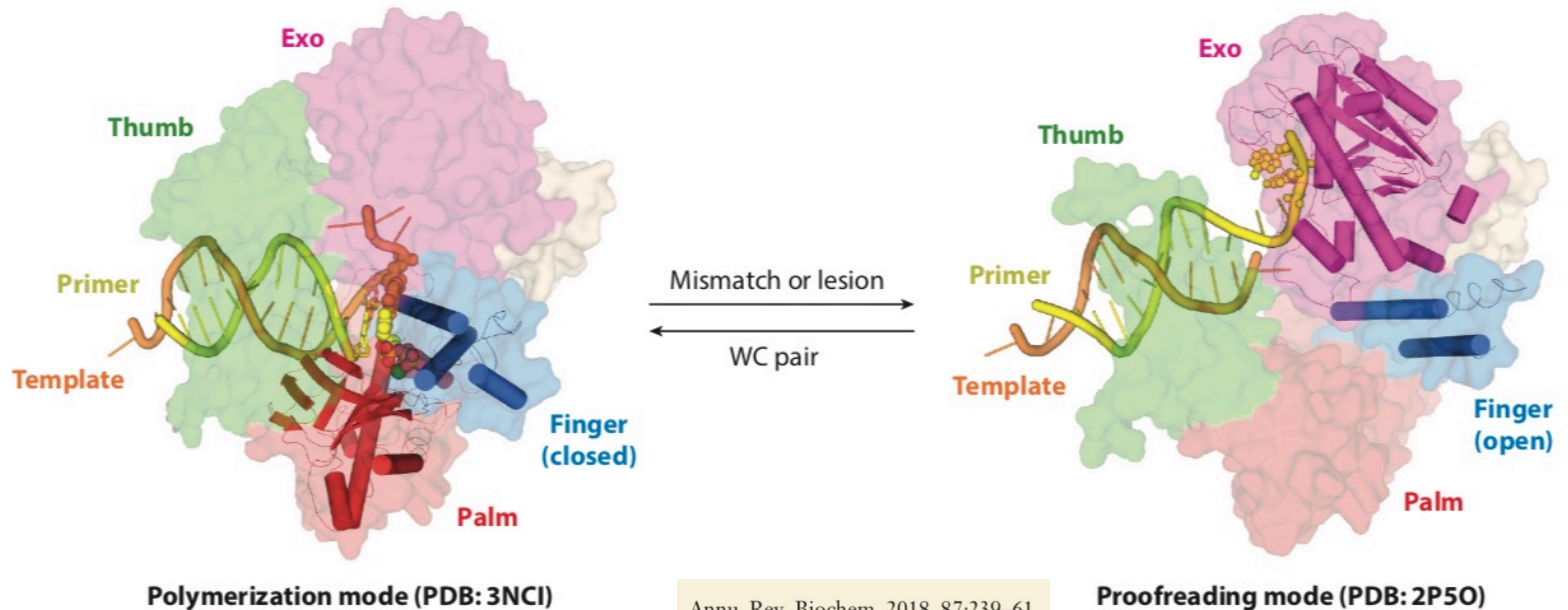
Last nucleotide is not
base-paired
EXONUCLEASE WINS

Figure 16-3b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Dokładność replikacji

- Mechanizm **korekcji błędów**:
- Zasada konkurencji między aktywnością polimerazy a egzonukleazy

c



Dokładność replikacji

- Ostatecznie polimeraza jest bardzo dokładnym enzymem
- Częstość błędów 10^{-7} - 10^{-8} wstawianych nukleotydów
- Dalsze zwiększenie dokładności: systemy naprawcze

a Error rate of DNA synthesis



Mutacje spontaniczne – tautomeria zasad

- Zasady azotowe występują w formach tautomerycznych keto i enol (T, G, U) oraz amino i imino (A, C)
- Dominuje forma ketonowa (lub aminowa) i ona daje właściwe parowanie
- Rzadszy tautomer enolowy/iminowy może dać niewłaściwe parowanie
- Powoduje podstawienia typu tranzycji

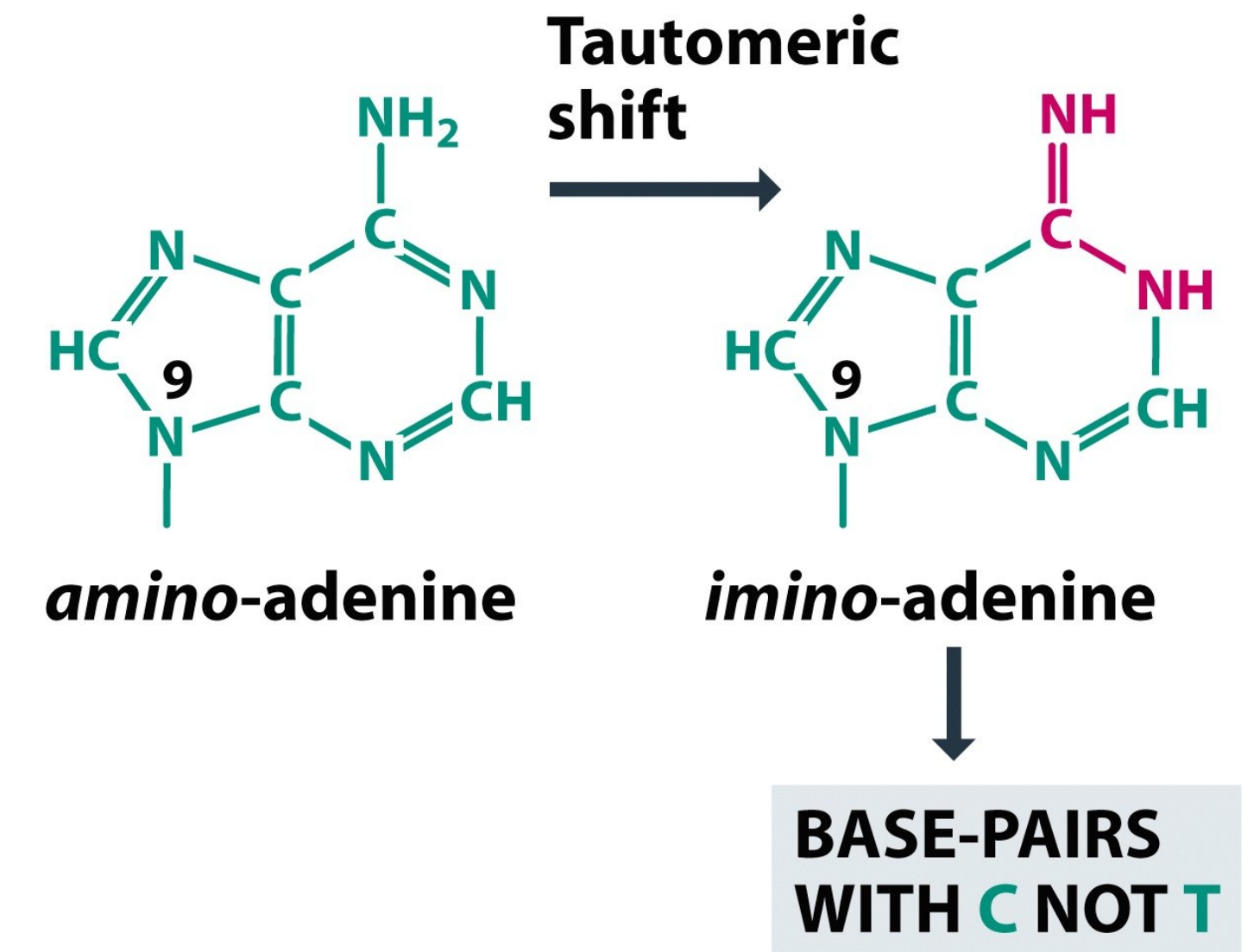


Figure 16-4 part 2 of 3 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

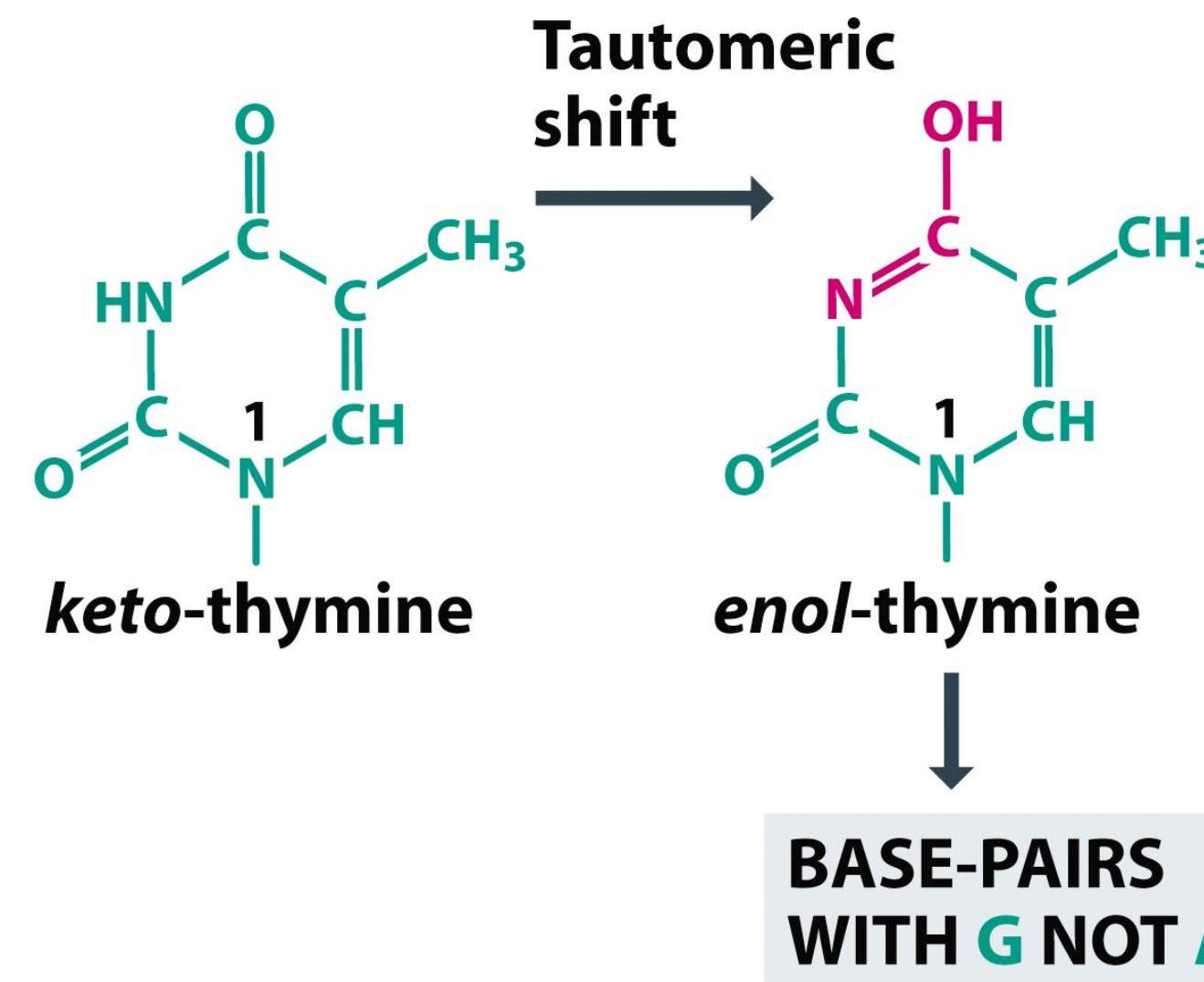


Figure 16-4 part 1 of 3 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

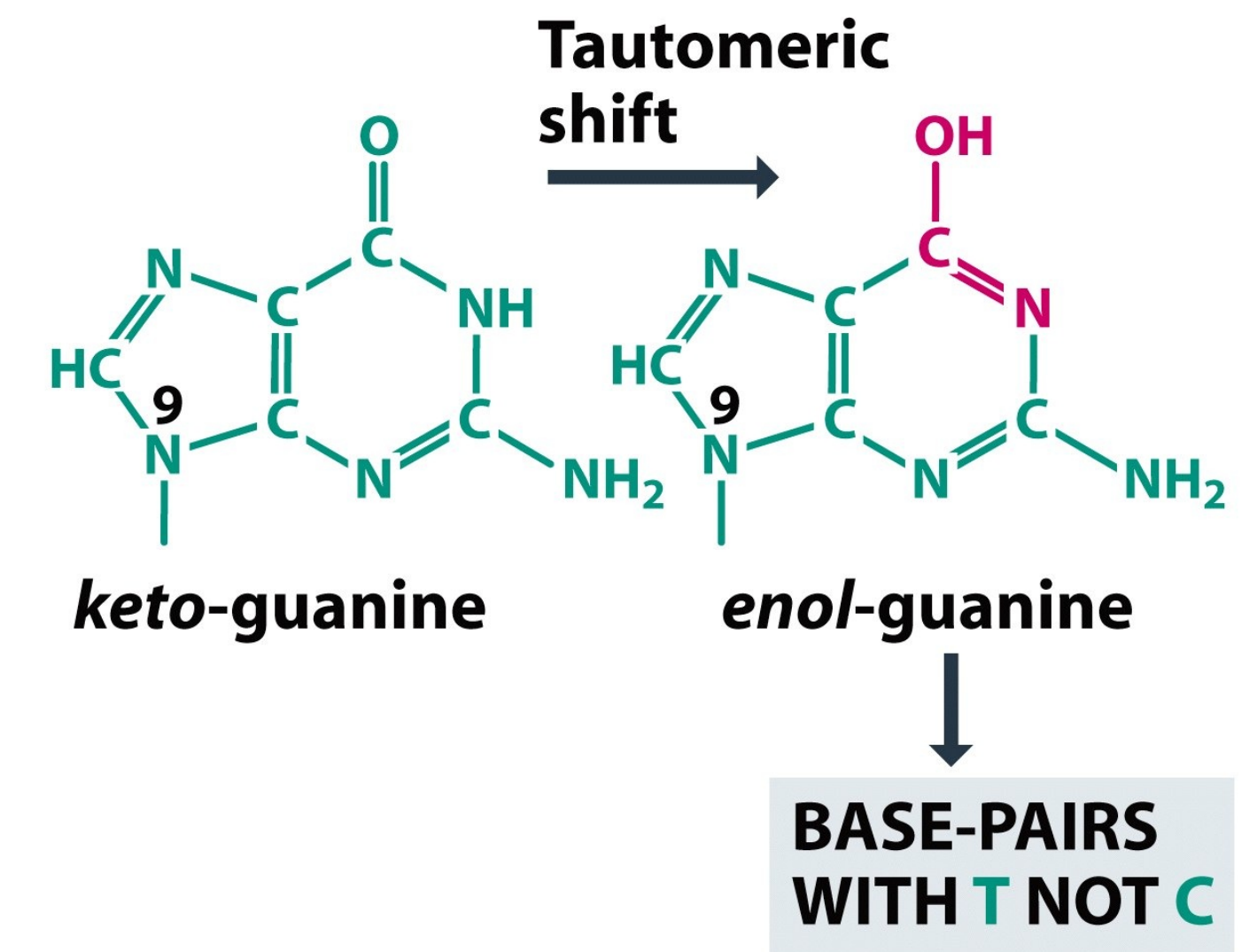


Figure 16-4 part 3 of 3 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Poślizg replikacji

- Przesunięcie nici matrycowej i potomnej o jedną (lub więcej) jednostkę (zachowane parowanie)
- Często w sekwencjach powtórzonych, powoduje insercje i delecje
- Wysoce zmienne sekwencje mikrosatelitarne
- Wykorzystywane jako markery w badaniach populacyjnych, kryminalistycznych itp.

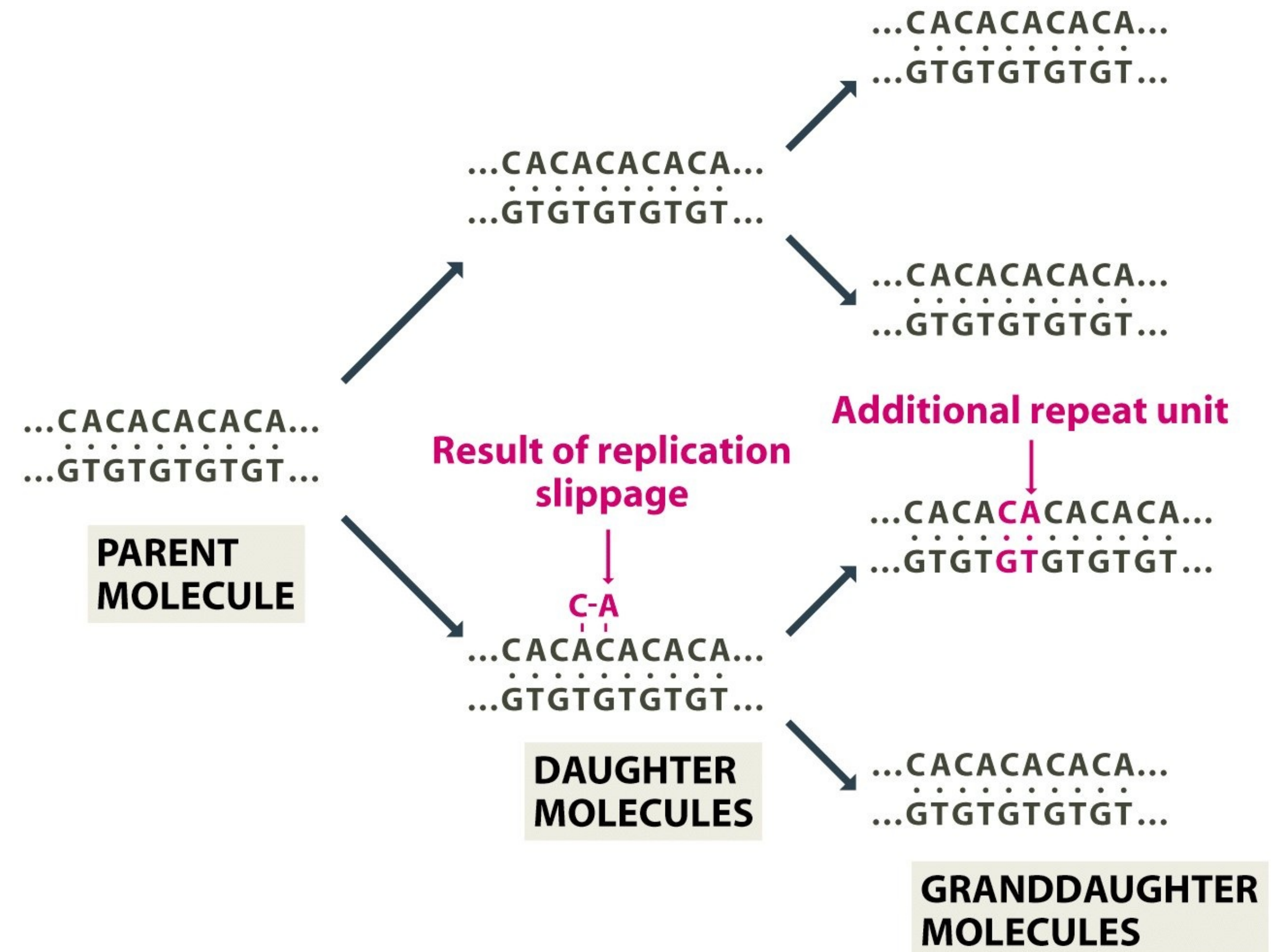


Figure 16-5 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Ekspansje trójkowe

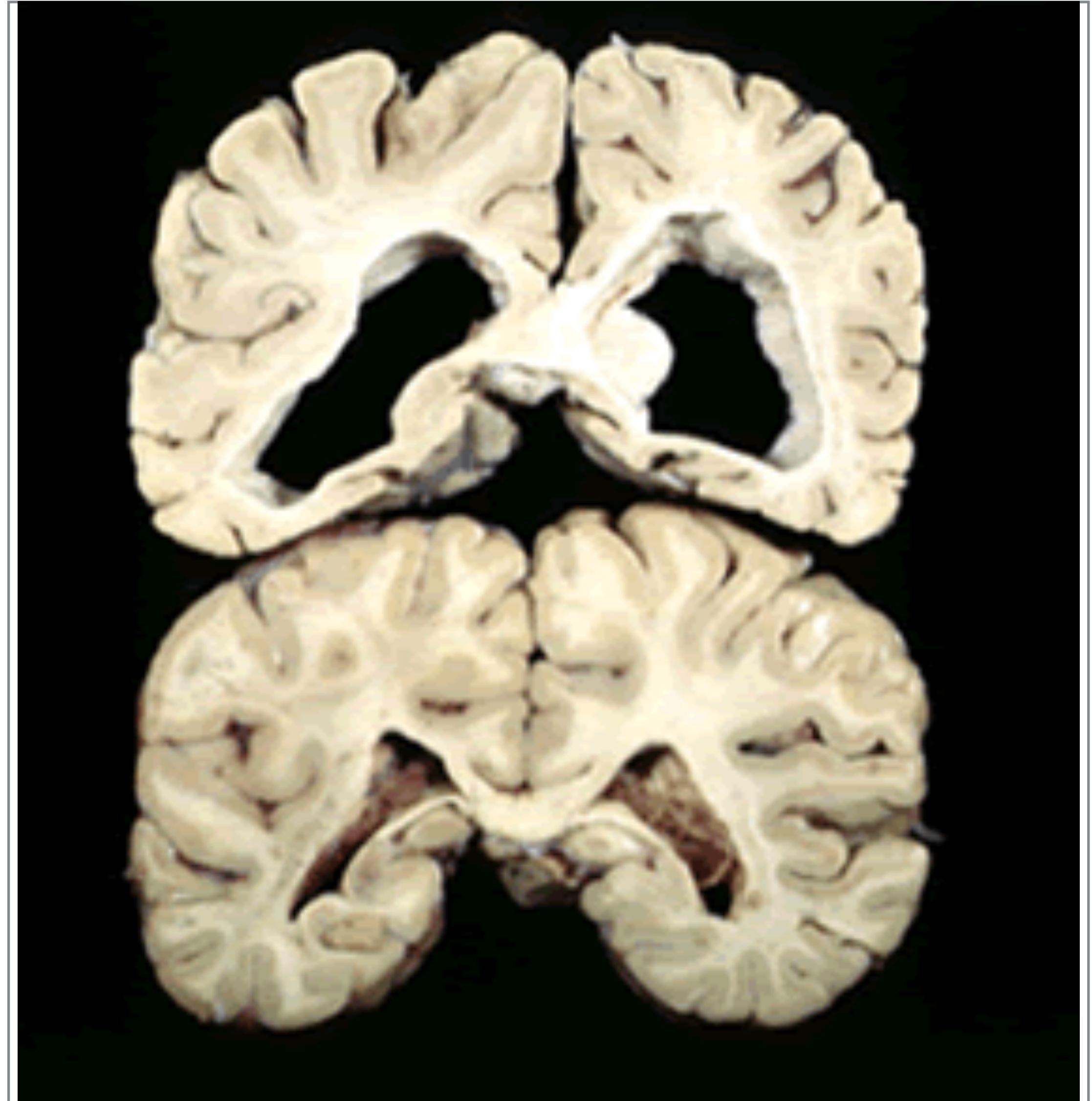
- Wydłużanie serii powtórzeń trójnukleotydowych
- Mechanizm złożony: możliwe zaburzenia naprawy DNA z wycinaniem
- Przyczyna szeregu chorób genetycznych
- Niekiedy efekt antycypacji:
 - liczba powtórzeń rośnie z pokolenia na pokolenie, aż osiągnie wartość krytyczną
 - fenotyp w każdym kolejnym pokoleniu coraz cięższy

Przykłady chorób związanych z ekspansją powtórzeń

- Zespół kruchego chromosomu X
 - norma (CAG)₆₋₃₅, chorzy (CAG)_{>60}
 - w sekwencji liderowej genu *FMR1*
- Choroba Huntingtona
 - norma (CAG)₆₋₃₅, chorzy (CAG)₃₆₋₁₂₁
 - w sekwencji kodującej genu *HTT*, trakt poliglutaminowy
 - cecha dominująca, agregacja białka
- Ataksja Friedreicha
 - norma (CTG)₅₋₃₇, chorzy (CTG)₄₀₋₂₀₀
 - w intronie genu *FXN*, zaburza splicing, obniżony poziom białka

Choroba Huntingtona

- Postępująca degeneracja tkanki mózgu
- Pierwsze objawy zwykle w wieku 35-45 lat
- Zaburzenia behawioralne, zaburzenia ruchu (płásawica), postępująca ciężka demencja
- Oczekiwany czas życia - ~20 lat od pojawienia się objawów



The human brain, showing the impact of HD on brain structure in the basal ganglia region of a person with HD (top) and a normal brain (bottom).

<http://kobiljak.msu.edu>

Mutageny

- Chemiczne
 - analogi zasad – błędnie wykorzystywane jako substraty
 - reagujące bezpośrednio z DNA – np. czynniki alkilujące, deaminujące, interkalujące, tworzące addukty
 - działające pośrednio – np. zwiększające produkcję reaktywnych form tlenu (nadtlenki, rodniki) w komórce
 - działające na polimerazę – np. jony Mn^{2+} (zamiast Mg^{2+}) jako kofaktory polimerazy γ powodują wzrost częstości błędów
- Fizyczne
 - Np. UV, promieniowanie jonizujące, temperatura
- Biologiczne
 - Wirusy i ruchome elementy genetyczne integrujące się do genomu

Mutagen chemiczny - przykład

- 5-bromouracyl
- analog tyminy, ale równowaga przesunięta w stronę formy enolowej, tworzącej pary z G

Base pairing with 5-bromouracil

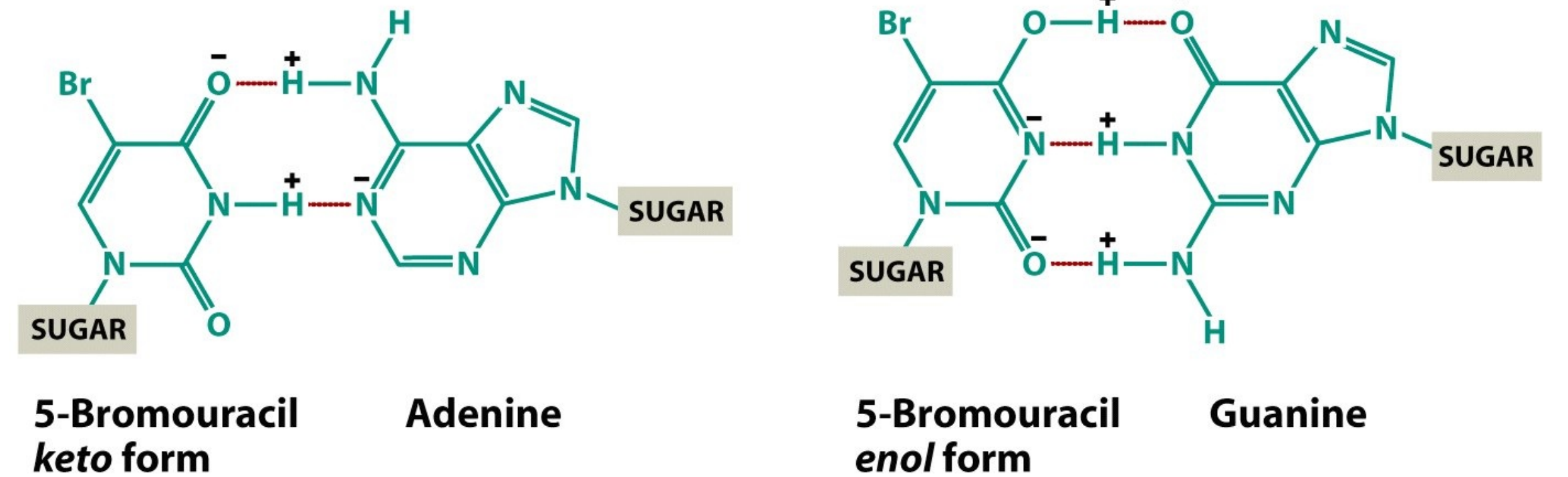


Figure 16-6b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

The mutagenic effect of 5-bromouracil

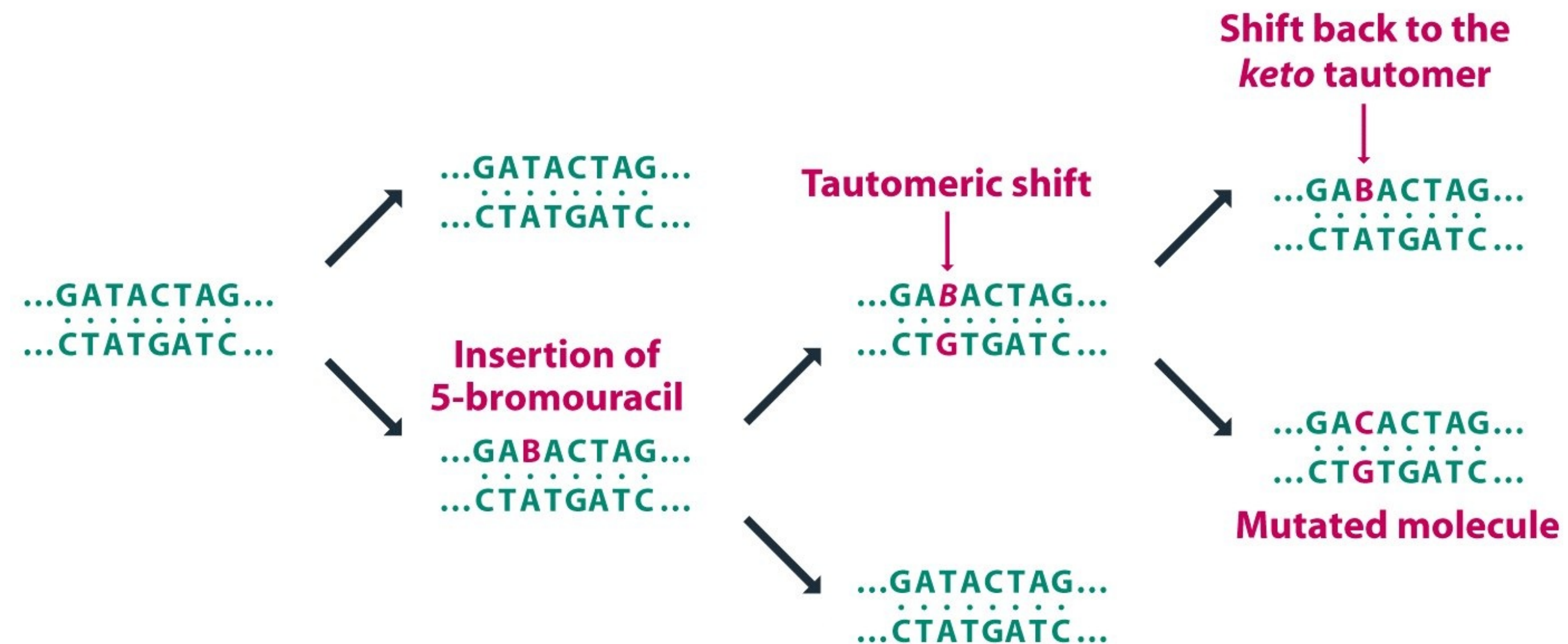
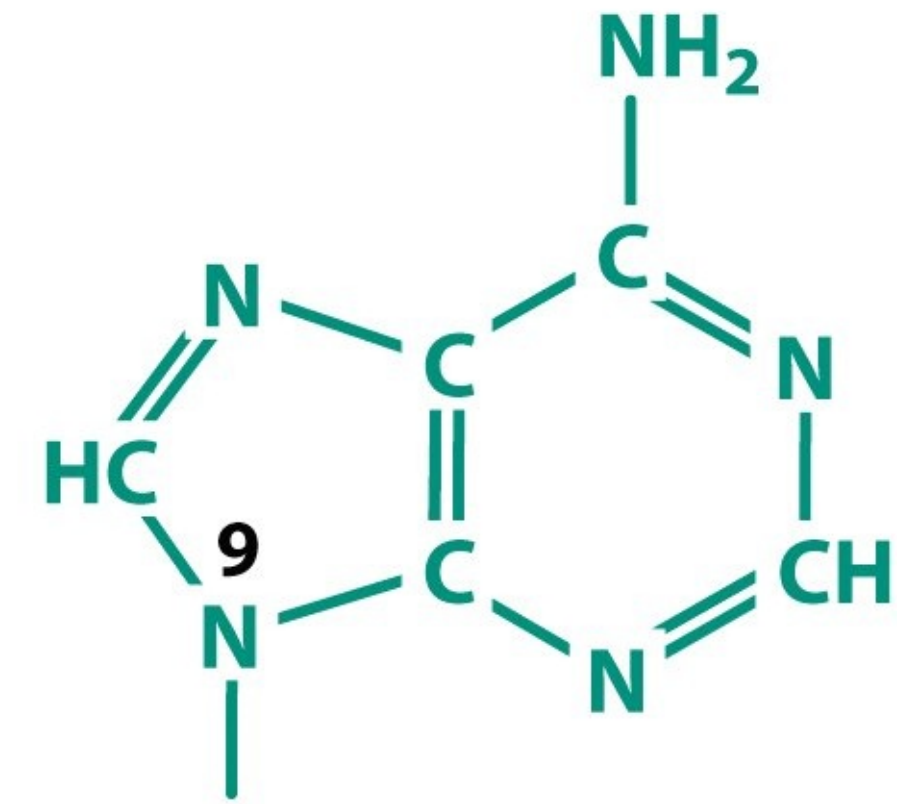


Figure 16-6c Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Mutageny chemiczne uszkadzające DNA

- EMS (metanosulfonian etylu)
 - alkiluje zasady azotowe
- Czynniki deaminujące (kwas azotawy, dwusiarczyn sodowy)
 - Deaminacja adeniny daje hipoksantynę:
paruje z C zamiast T
- Węglowodory policykliczne

Adenine



↓ **Deamination**

Hypoxanthine

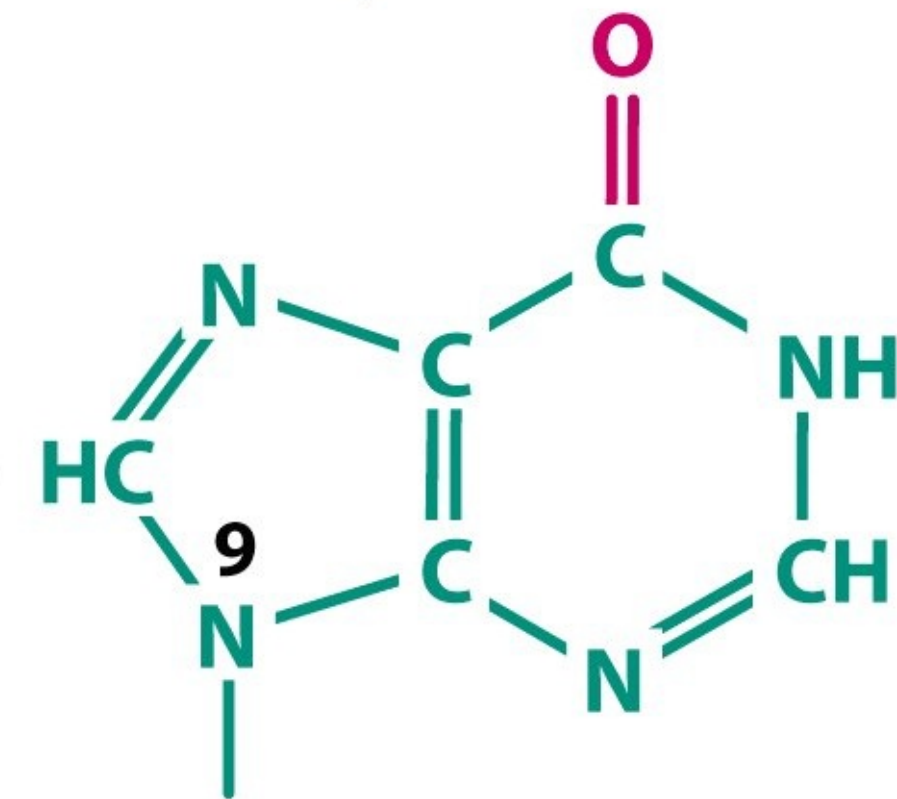


Figure 16-7 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Czynniki interkalujące

- Płaskie cząsteczki, wciskają się między pary zasad, zmieniają skok helisy – najczęściej insercje
- np. bromek etydyny, akryflawiny
- silniejsze działanie na niewielkie cząsteczki koliste (plazmidy, mtDNA)

Ethidium bromide

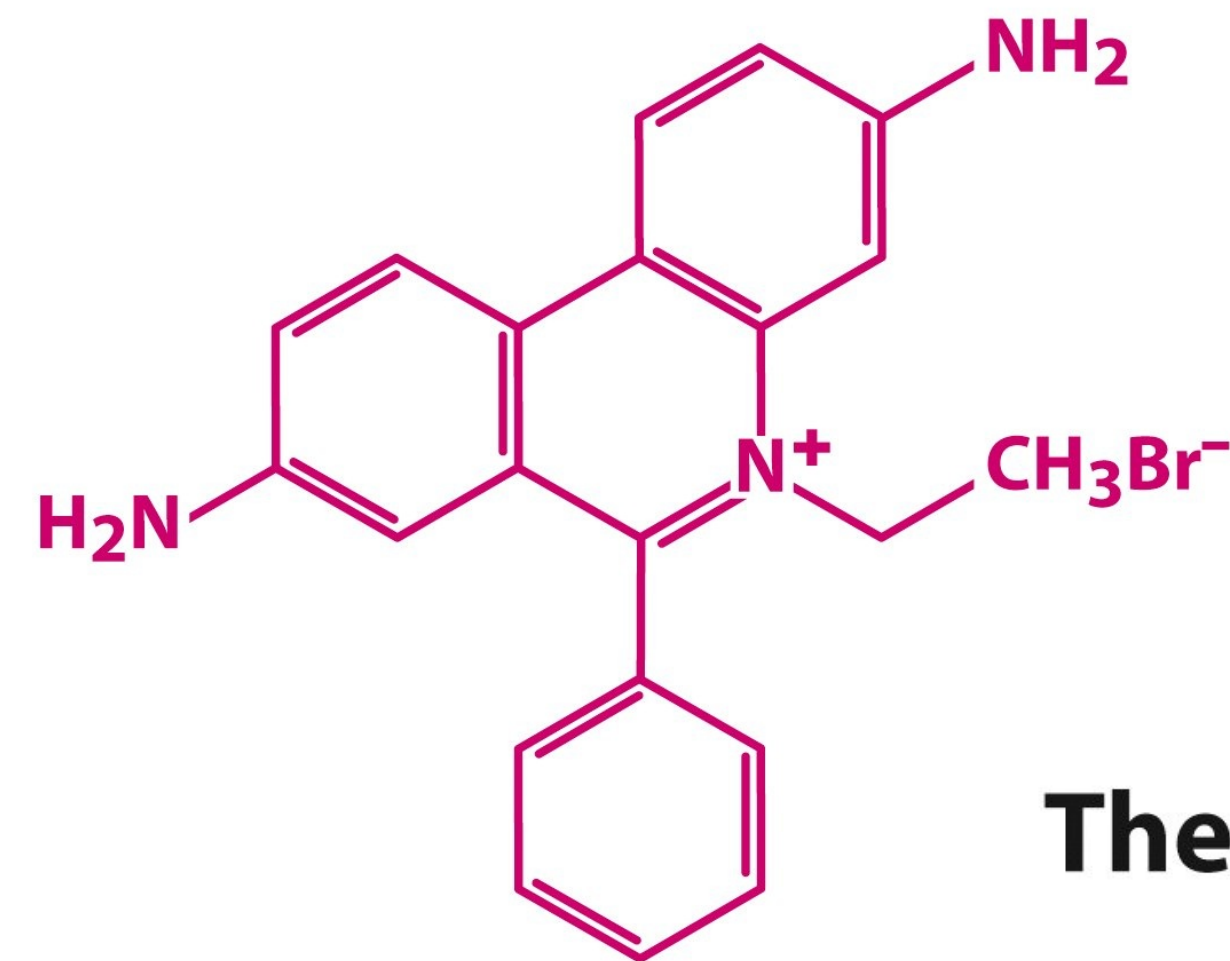


Figure 16-8a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

The mutagenic effect

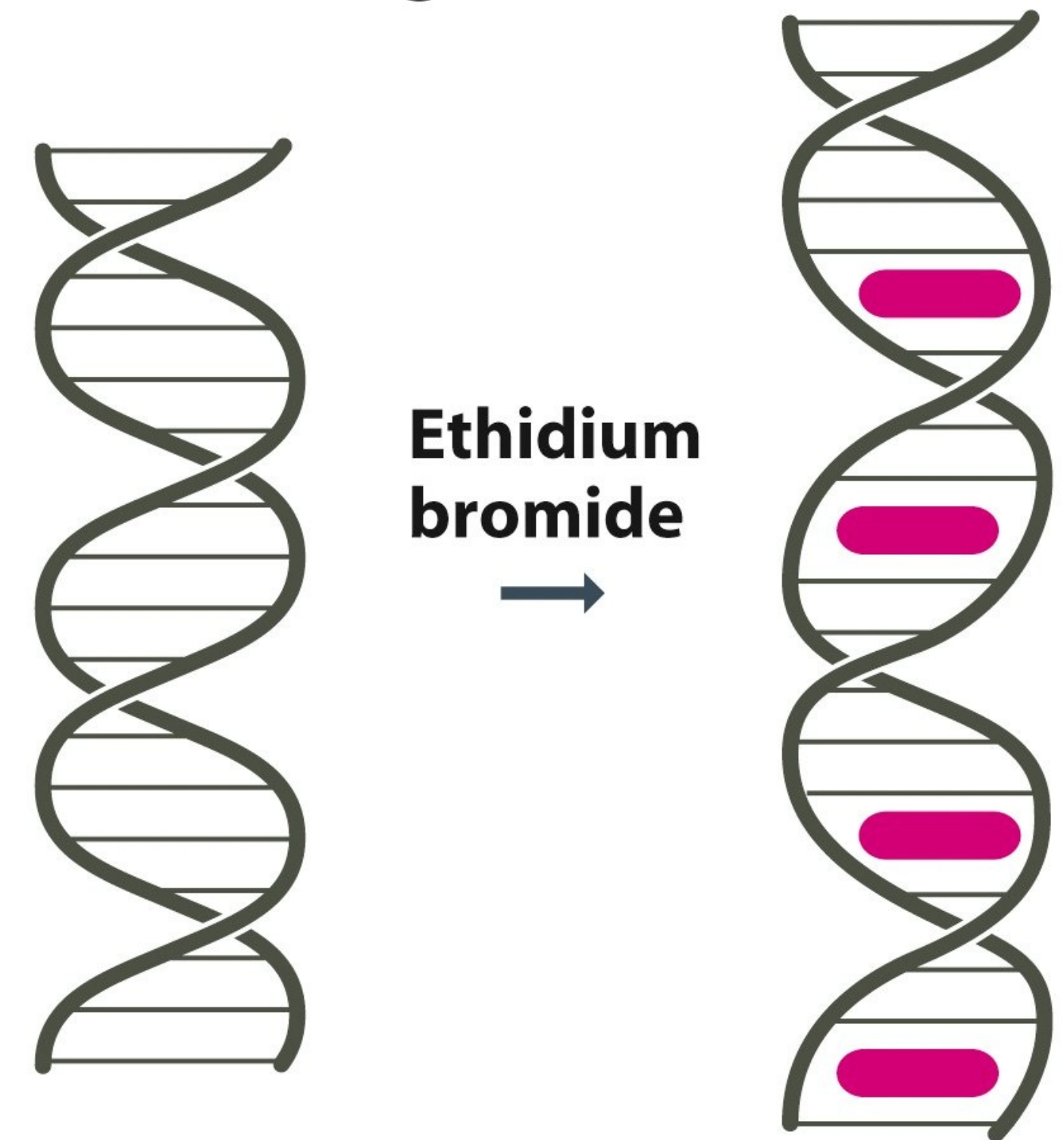


Figure 16-8b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Działanie UV

- Powstają fotoprodukty – np. dimery cyklobutyłowe sąsiadujących zasad (najczęściej T-T), uszkodzenia 6-4

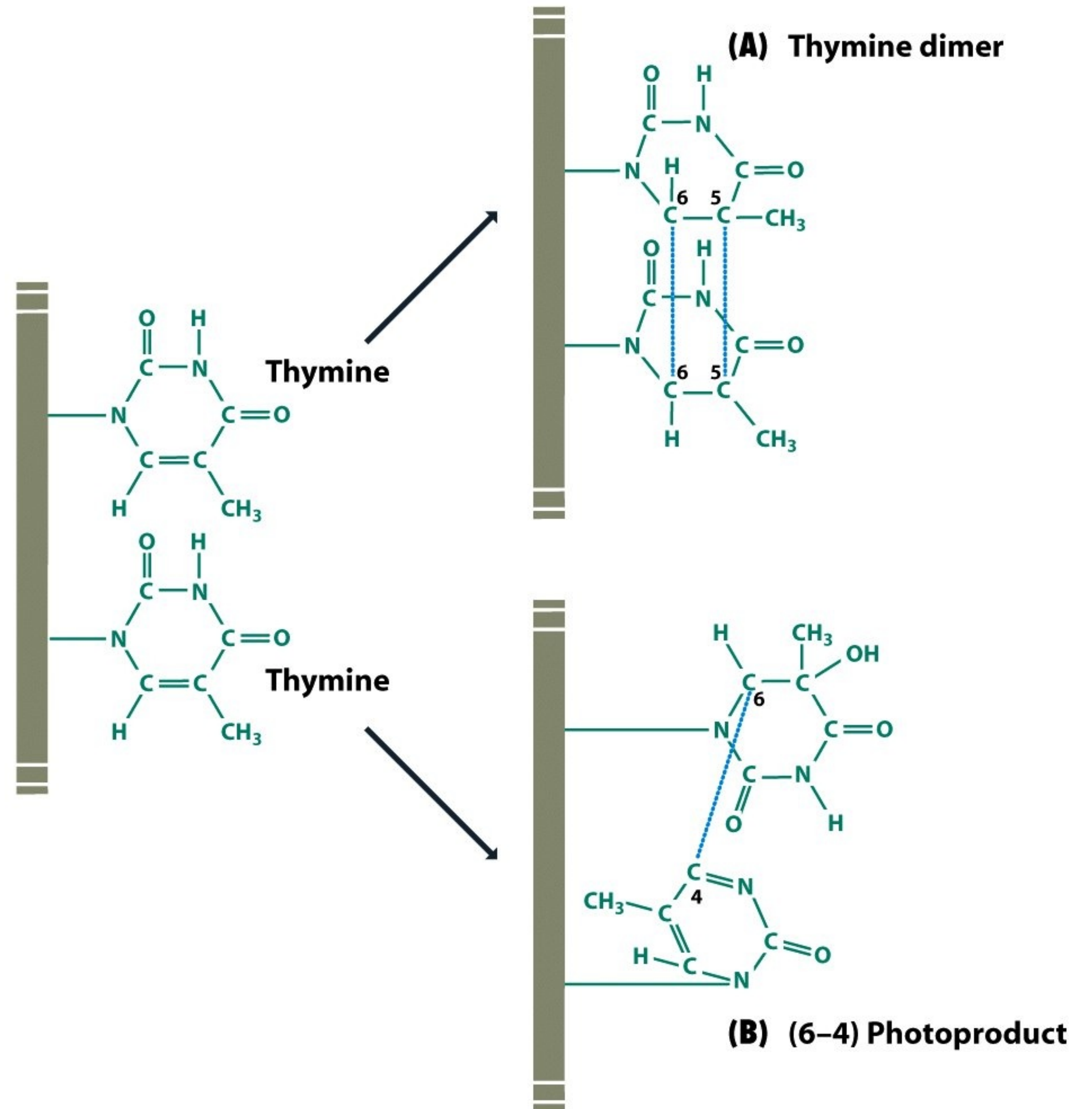
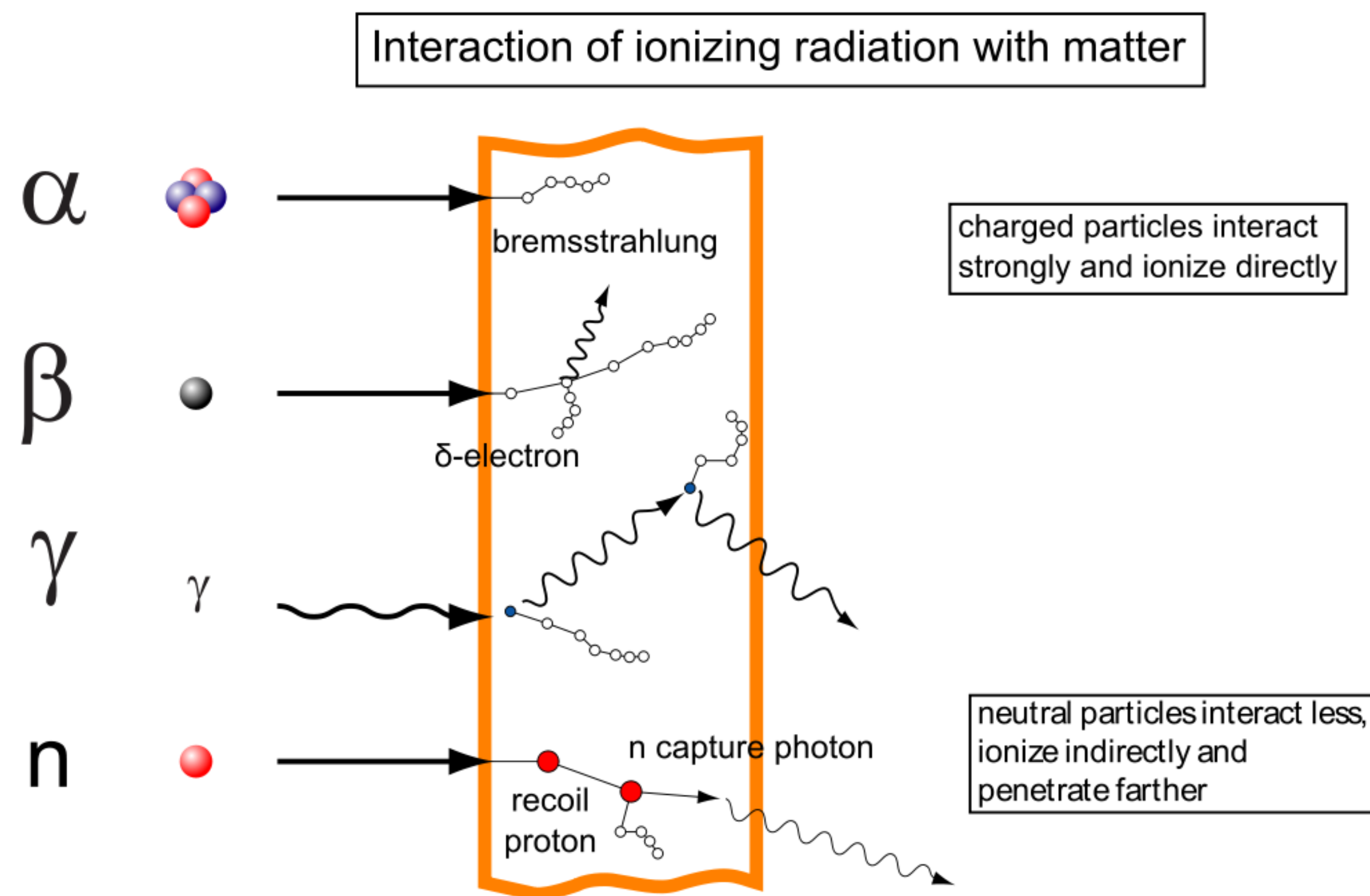


Figure 16-9 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Promieniowanie jonizujące

- Główny efekt: pęknięcia dwuniciowe (DSB)
- Efekt bezpośredni
- Efekt pośredni: wolne rodniki tworzone pod wpływem interakcji promieniowania (np. z wodą)



Naprawa DNA

- U *E. coli* częstość błędów polimerazy 1:10⁷ wstawianych nukleotydów
- Ogólna częstość błędów przy replikacji: 1:10¹⁰ – 1:10¹¹ wstawianych nukleotydów
- Za zmniejszenie częstości błędów replikacji o 3-4 rzędy wielkości odpowiadają systemy naprawy DNA

Systemy naprawy DNA

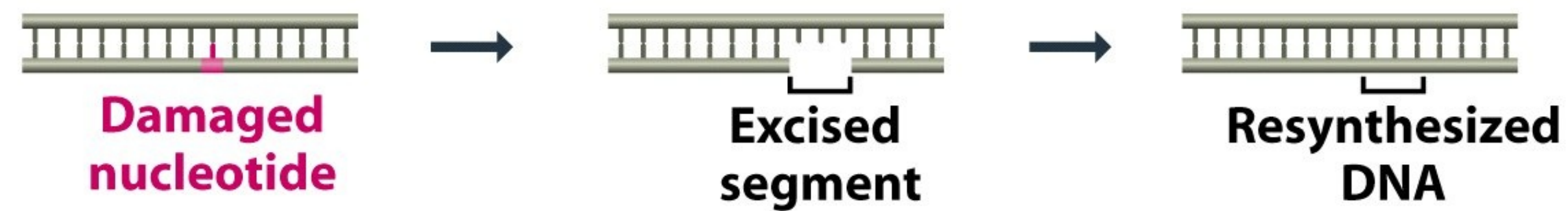
- Naprawa bezpośrednia (DR)
- Naprawa przez wycinanie i resyntezę (ER)
 - Naprawa przez wycinanie zasad (BER)
 - Naprawa przez wycinanie nukleotydów (NER)
 - Naprawa błędnie sparowanych nukleotydów (MMR)
- Naprawa pęknięć dwuniciowych (DSBR)
 - system łączenia końców niehomologicznych (NHEJ)
 - rekombinacja homologiczna (HR)

Systemy naprawy DNA

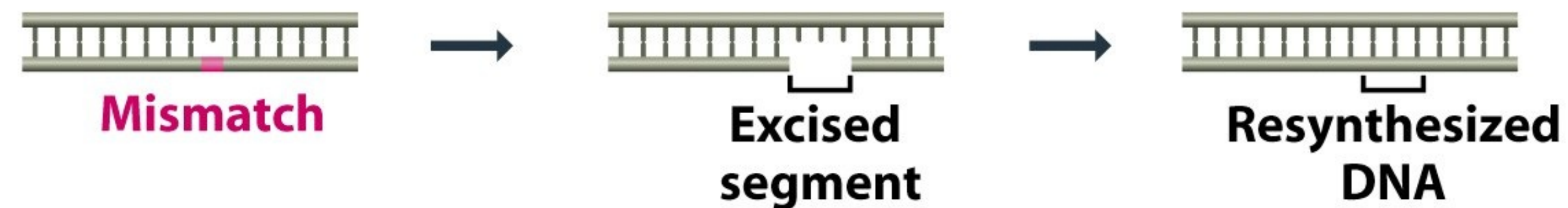
(A) Direct repair



(B) Excision repair



(C) Mismatch repair



(D) Nonhomologous end-joining



Naprawa bezpośrednia

- Naprawa pęknięć jednoniciowych przez ligazę
- Odwrócenie reakcji alkilacji
 - np. MGMT (metylotransferaza O⁶-metyloguanino DNA) – usuwa grupy alkilowe z atomu 6 guaniny
- Fotoreaktywacja dimerów cyklobutylowych
 - fotoliza DNA
 - Występuje u mikroorganizmów i wielu zwierząt, ale brak u ssaków łożyskowych, w tym u człowieka (jej rolę przejmuje system NER – tzw. naprawa ciemna)
- Wspólna cecha – bez resyntezy DNA (udziału polimeraz)

Naprawa przez wycinanie zasad (BER)

- Usunięcie uszkodzonej zasady azotowej przez specyficzną glikozydazę DNA
- Powstaje miejsce AP (apurynowe/ apirymidynowe) - bez zasady azotowej
- Endonukleaza AP oraz fosfodiesteraza usuwają resztkę nukleotydu
- Luka wypełniana jest przez polimerazę

Removal of a damaged base by DNA glycosylase

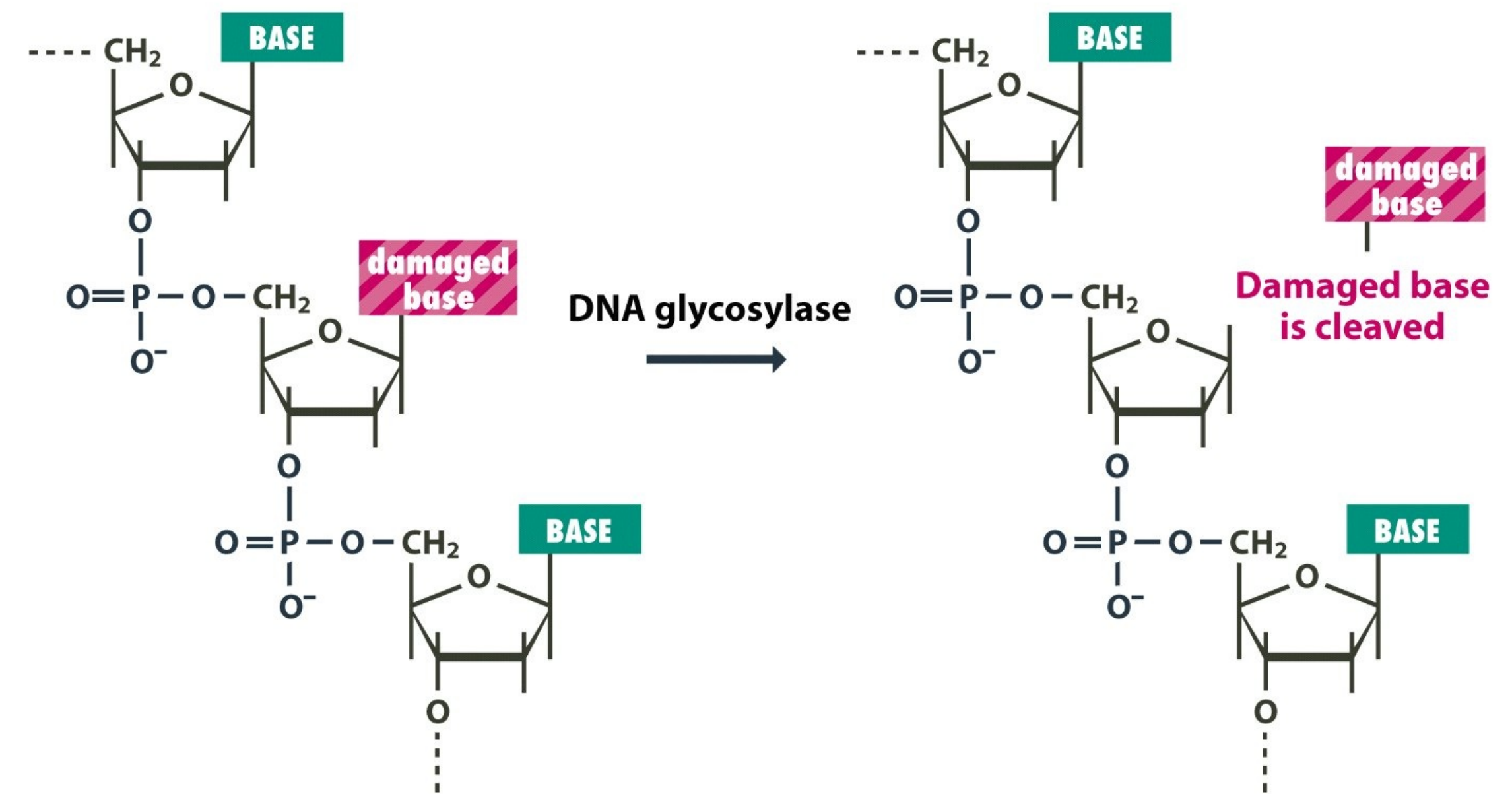


Figure 16-22a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Outline of the pathway

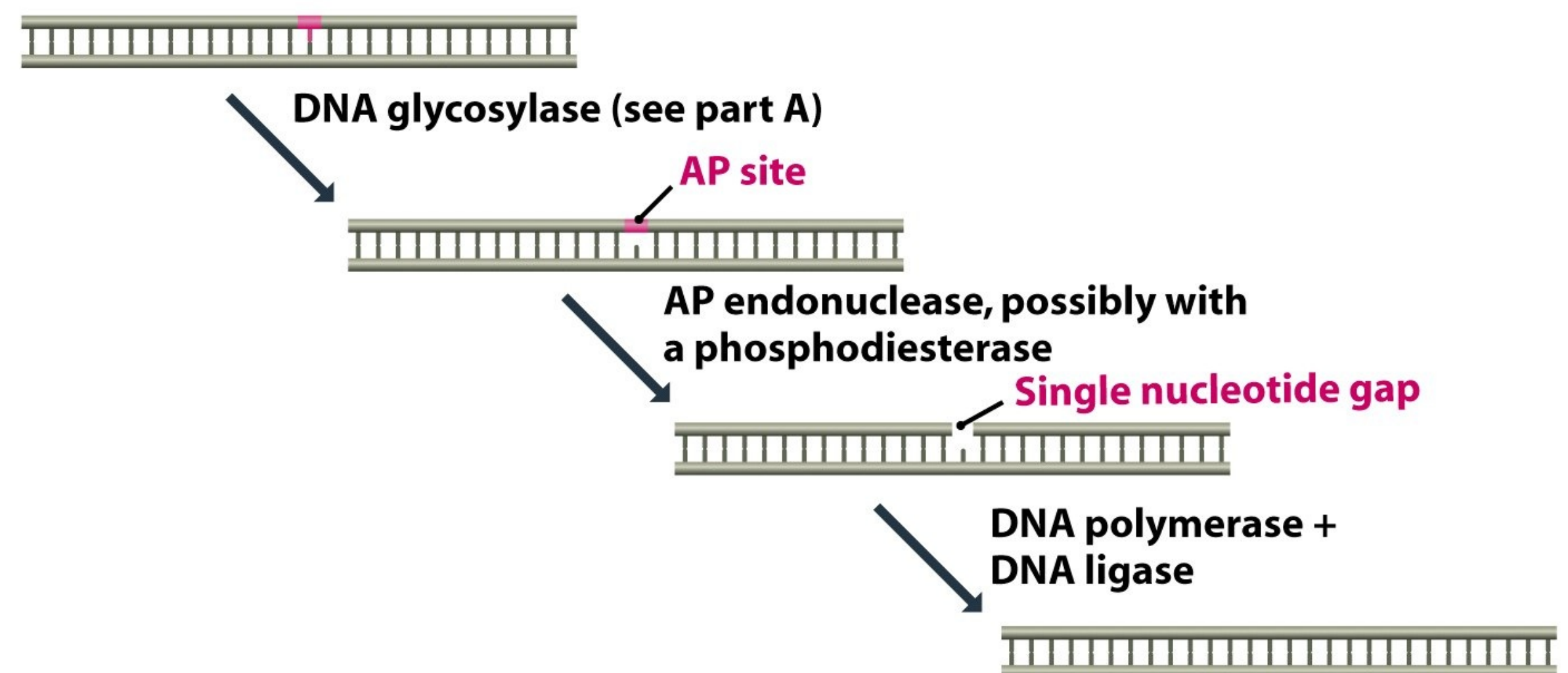


Figure 16-22b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Glikozydazy – przykłady (ssaki)

Glikozydaza DNA	Specyficzność
MBD4	Uracyl
MPG	Etenoadenina, hipoksantyna, 3-metyloadenina
NTH1	Glikol cytozynowy, dihydrouracyl, formamidopirymidyna, glikol tyminowy
OGG1	Formamidopirymidyna, 8-oksoguanina
SMUG1	Uracyl
TDG	Etenocytozyna, uracyl
UNG	Uracyl, 5-hydroksyuracyl

Tabela jest tylko przykładem – nie uczyć się na pamięć!

Naprawa przez wycinanie nukleotydów (NER)

- Uszkodzenia zaburzające strukturę podwójnej helisy
- U bakterii dwa systemy
 - krótkich łańcuchów (wycinane ~12 nt)
 - długich łańcuchów (wycinane ~ 2 kb)
- U Eukaryota
 - wycinane ~25-30 nt

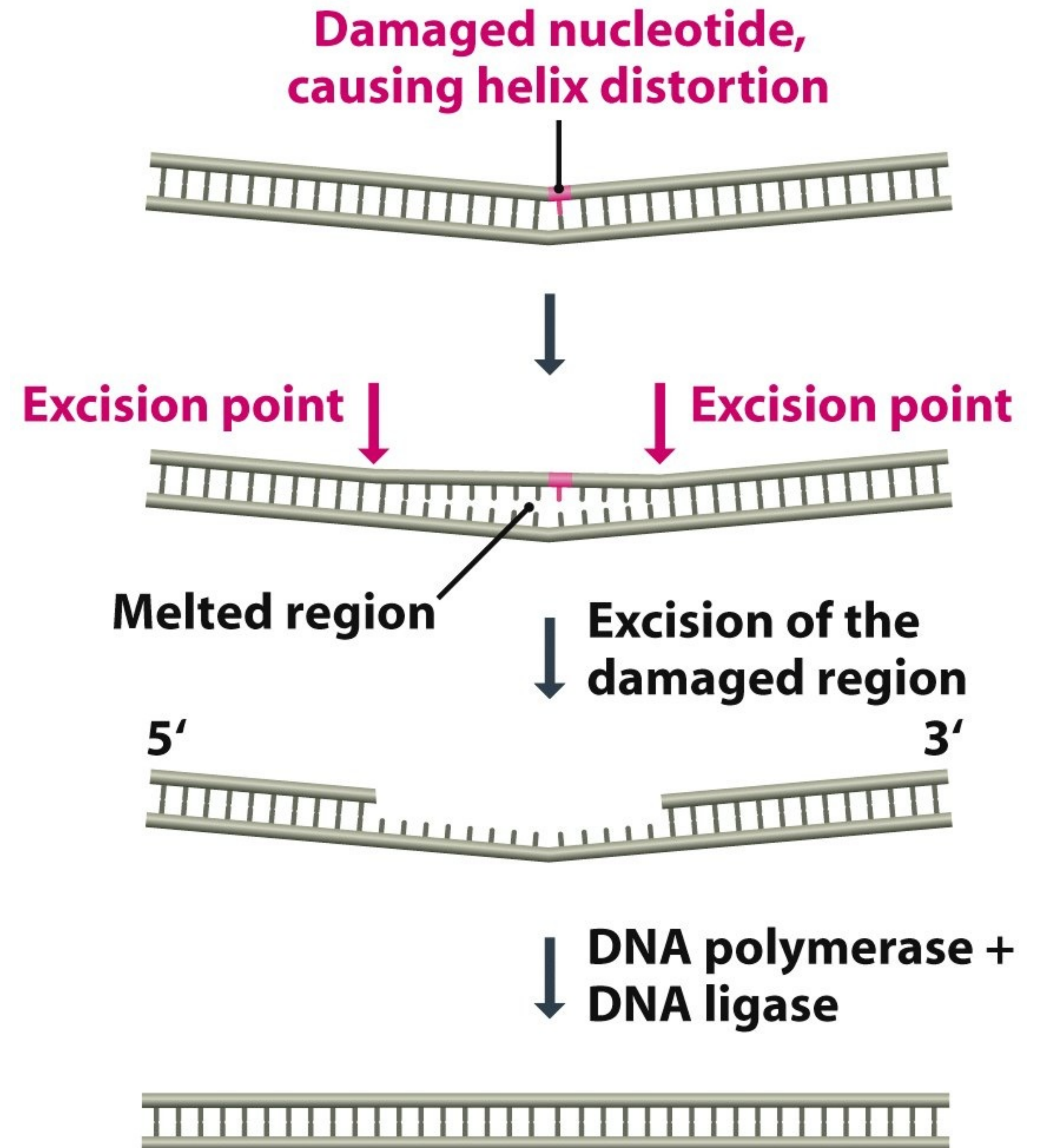


Figure 16-24 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Rodzaje NER u Eukaryota

- Globalna genomowa NER (GG-NER)
 - rozpoznawane i naprawiane uszkodzenia w obszarach nietranskrybowanych i transkrybowanych
 - uszkodzenia rozpoznawane przez białka DDB (*DNA-damage binding*) i XPC-RAD23B
- NER sprzężona z transkrypcją (TC-NER)
 - naprawa w obszarach transkrybowanych jest szybsza i wydajniejsza, niż w nieaktywnych
 - wykrywane zatrzymanie transkrypcji w miejscu uszkodzenia
 - TFIIH uczestniczy w rozpoznaniu uszkodzenia i nacięciu DNA

Xeroderma pigmentosum

- Skóra pergaminowata i barwnikowa
- Choroba autosomalna recesywna związana z mutacjami genów kodujących białka systemu NER (8 grup complementacji)
- Około 1:1 000 000 (USA, Europa) do 1:250 000
- Defekt GG-NER
- U człowieka to NER odpowiada za naprawę fotoproduktów
- Działanie światła słonecznego wywołuje liczne przebarwienia i nowotwory skóry (ryzyko wzrasta do 10 000 razy)
- Nie ma lekarstwa – pacjenci muszą całkowicie unikać światła słonecznego



Zespół Cockayne'a

- Defekt naprawy TC-NER
- Mutacje genów ERCC6 i ERCC8
- Choroba autosomalna recesywna, częstość ~1:200 000
- zahamowanie wzrostu
- niepełnosprawność intelektualna, małogłowie
- progeria
- Inna choroba związana z defektem TC-NER: trichotiodystrofia (~1:1 000 000)



Naprawa błędnie sparowanych nukleotydów (MMR)

- W odróżnieniu od DR, BER i NER nie dotyczy uszkodzeń w DNA, tylko błędów replikacji – wstawionych niewłaściwych nukleotydów (np. błędy wynikające z tautomerii zasad)
- Rozpoznawane zaburzenie podwójnej helisy, błędny nukleotyd wraz z otoczeniem (nawet do 1 kb) usuwany, po czym polimeraza uzupełnia lukę
- Problem: jak rozpoznać, która nić jest rodzicielska (i ma właściwy nukleotyd), a która potomna (z błędem)

Naprawa błędnie sparowanych nukleotydów (MMR)

- U bakterii nić rodzicielska jest metylowana
- U Eukaryota metylacja też może mieć znaczenie (u ssaków, u drożdży już nie), ale są inne mechanizmy (sprzężenie z replikacją, białka naznaczające nić rodzicielską)

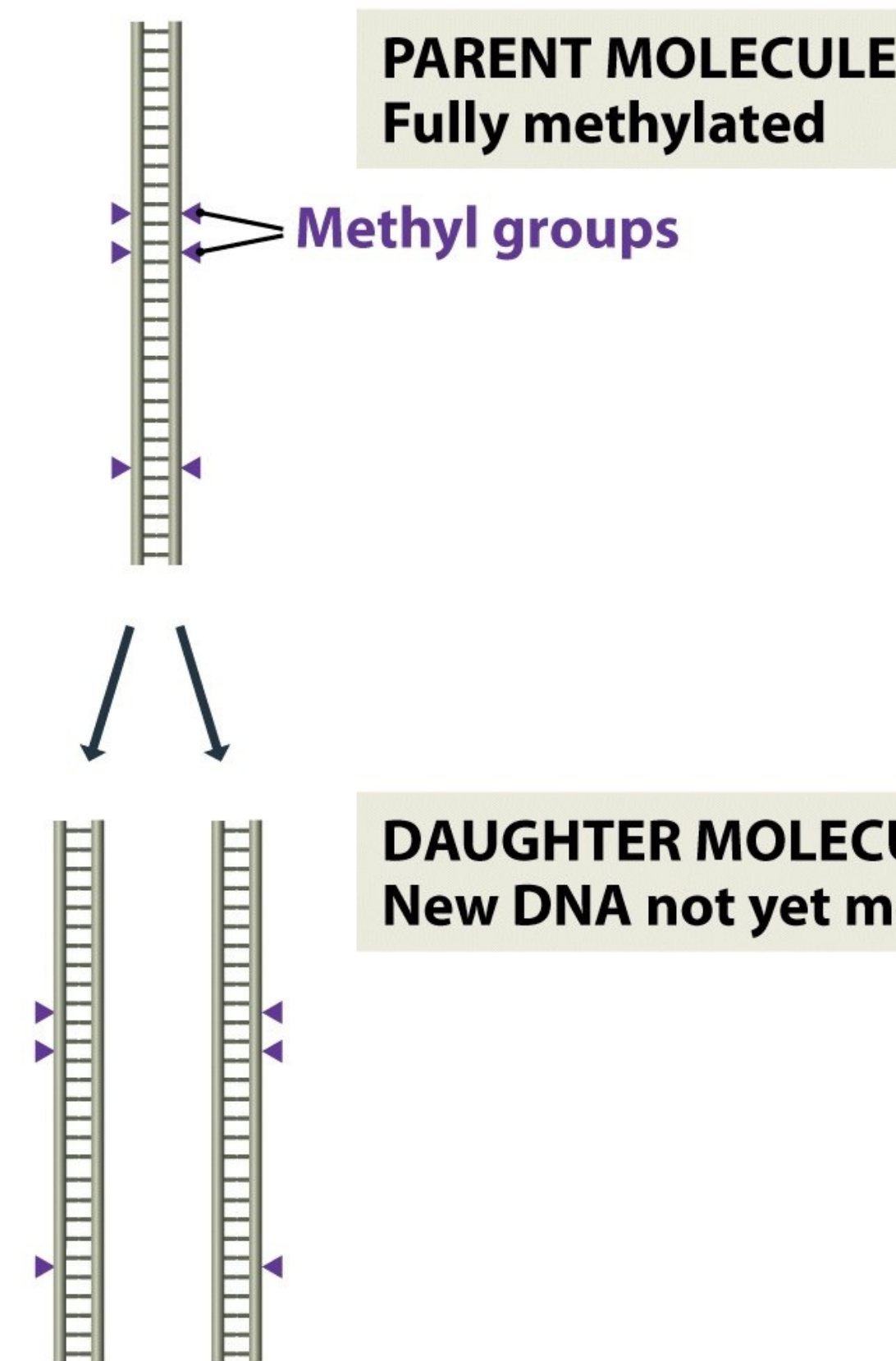


Figure 16-25 part 1 of 2 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

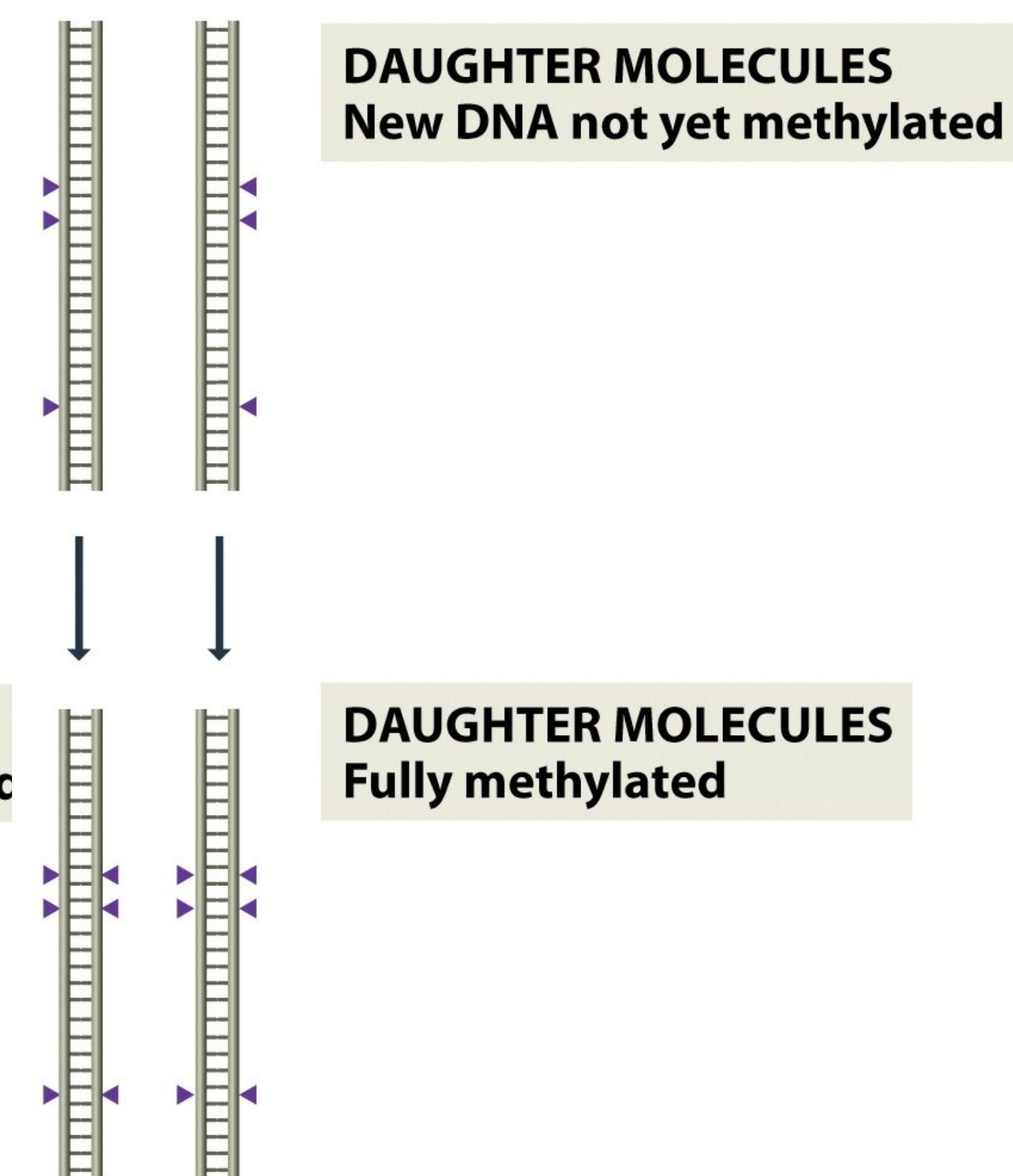
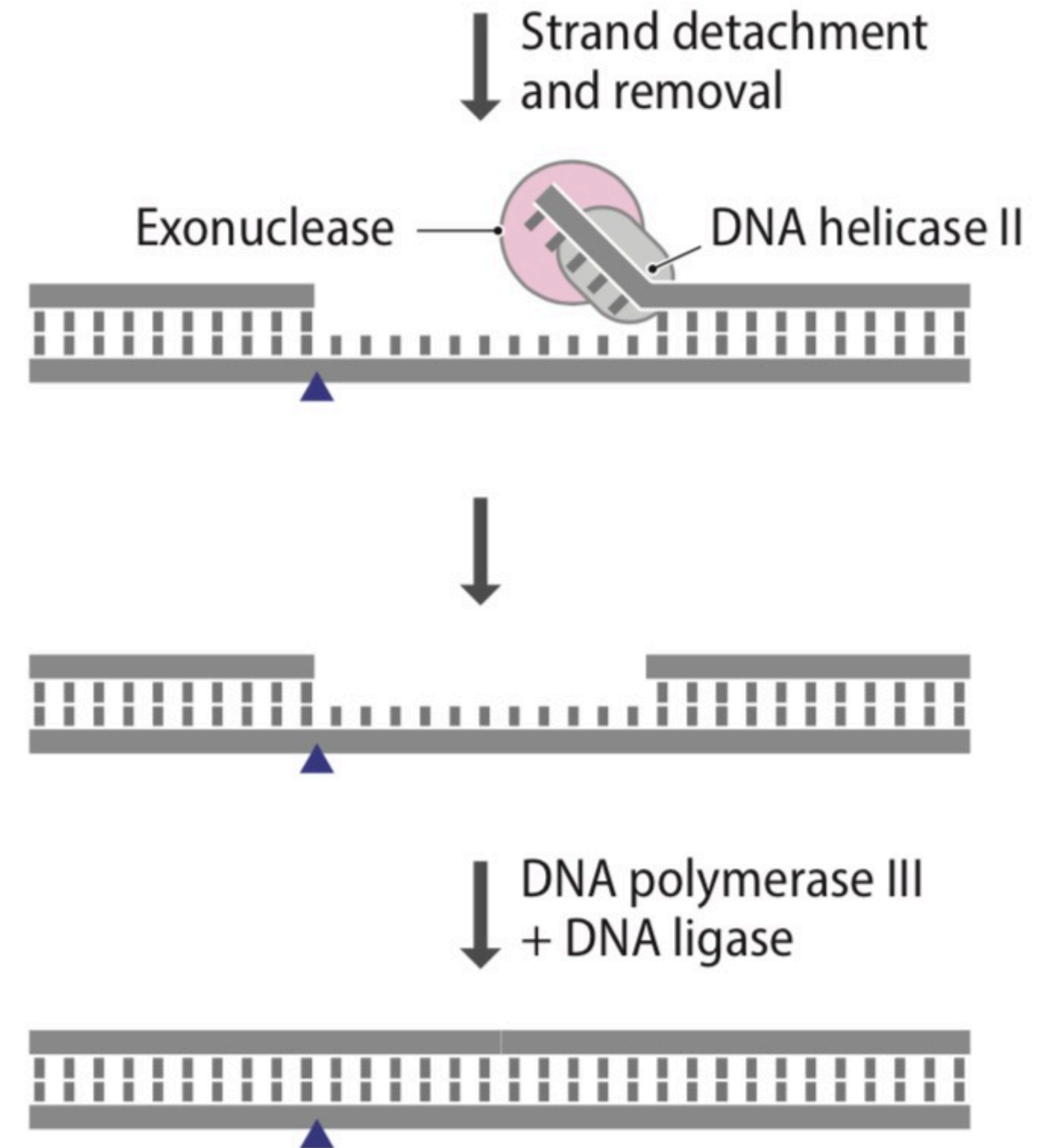
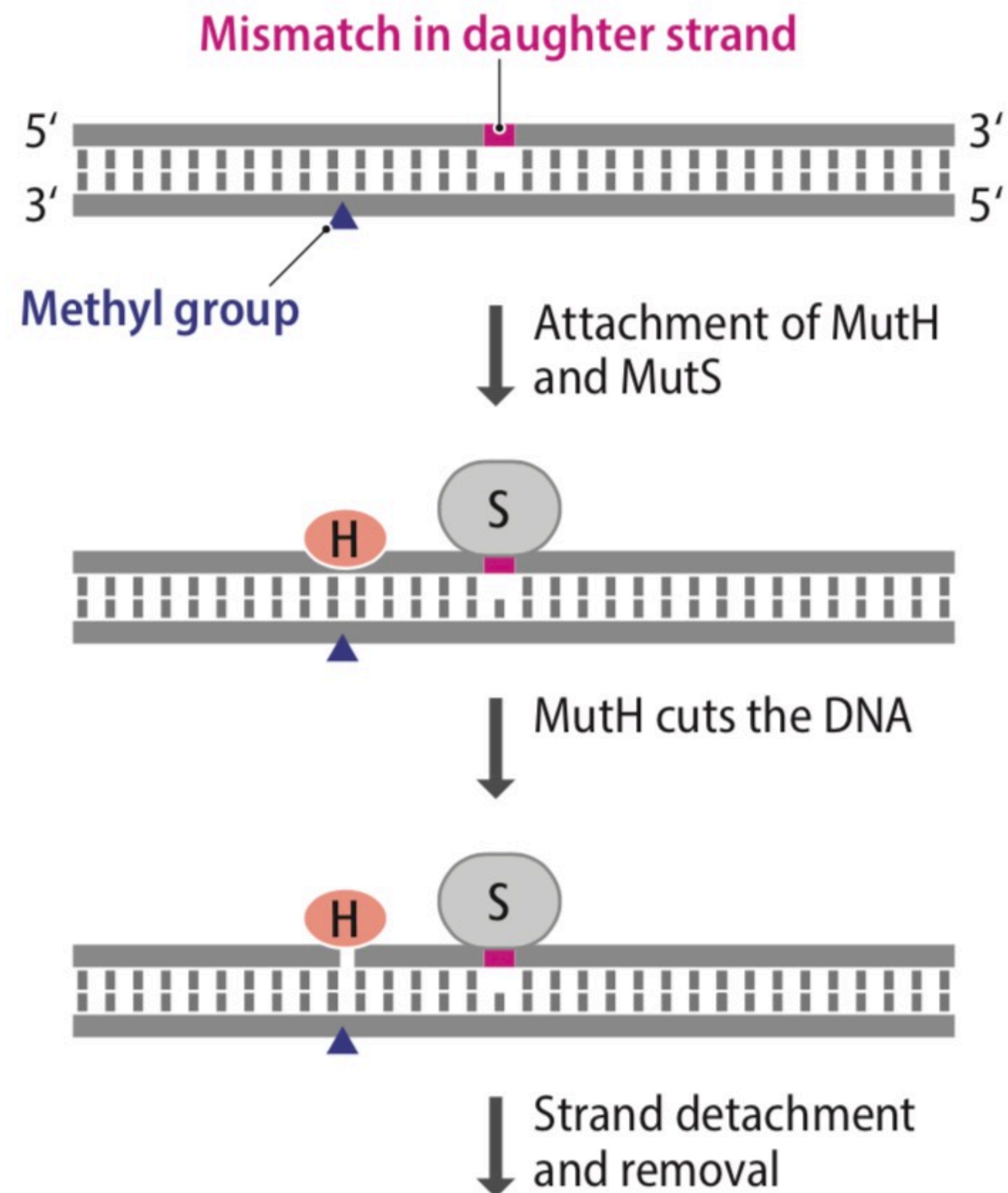


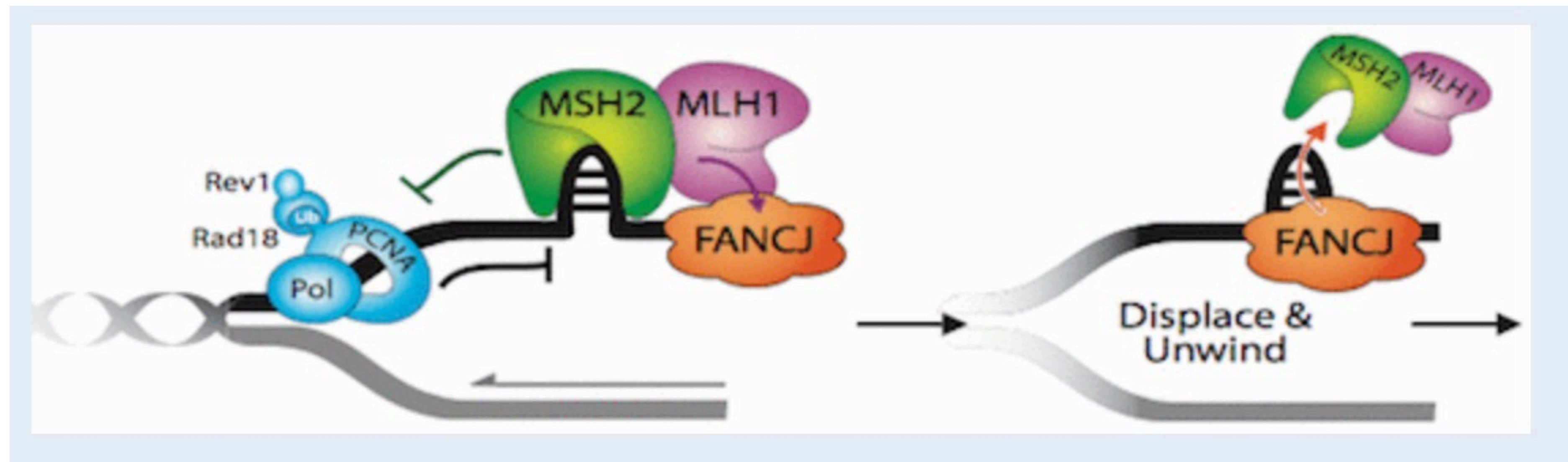
Figure 16-25 part 2 of 2 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Naprawa błędnie sparowanych nukleotydów (MMR)



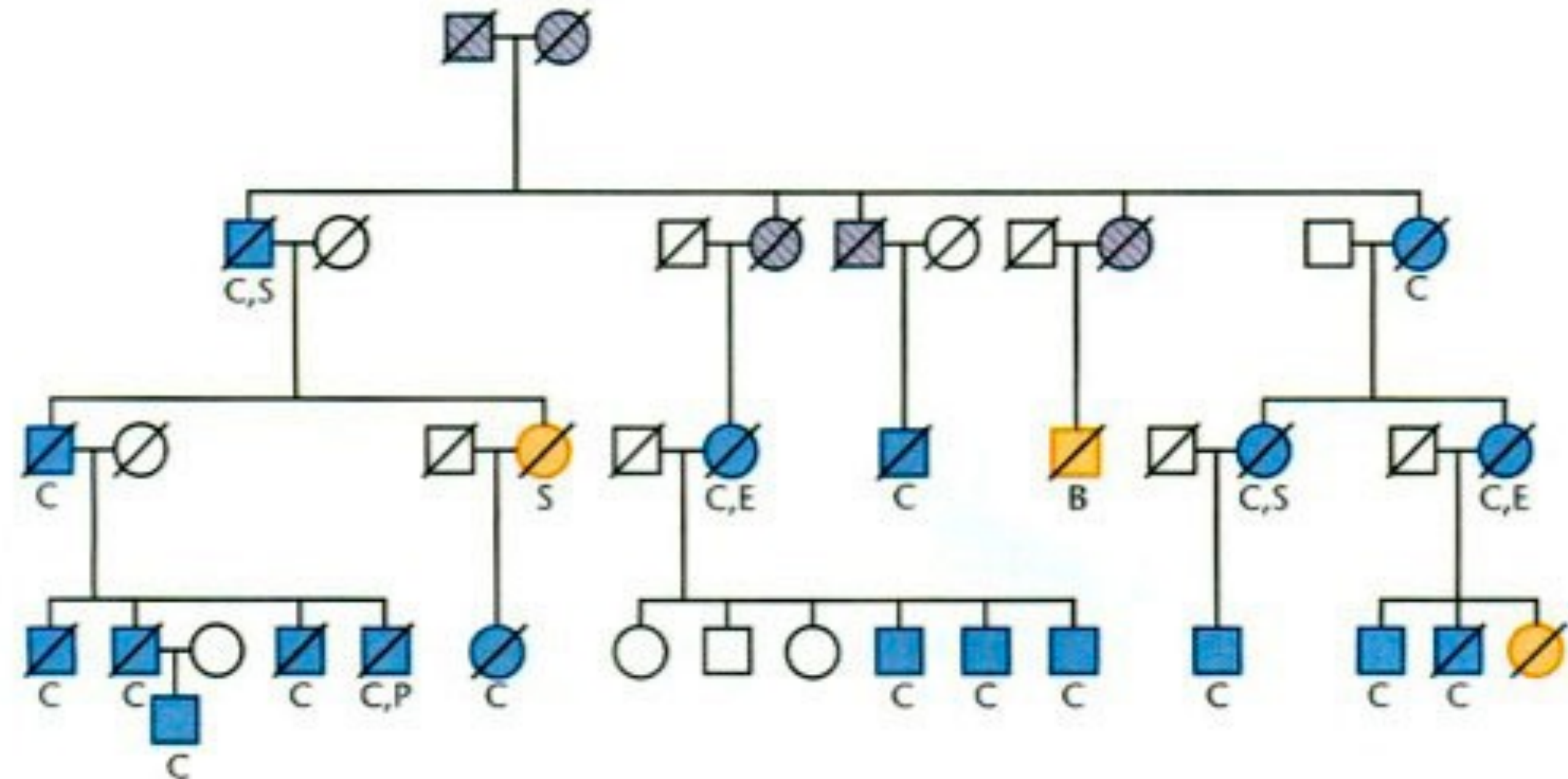
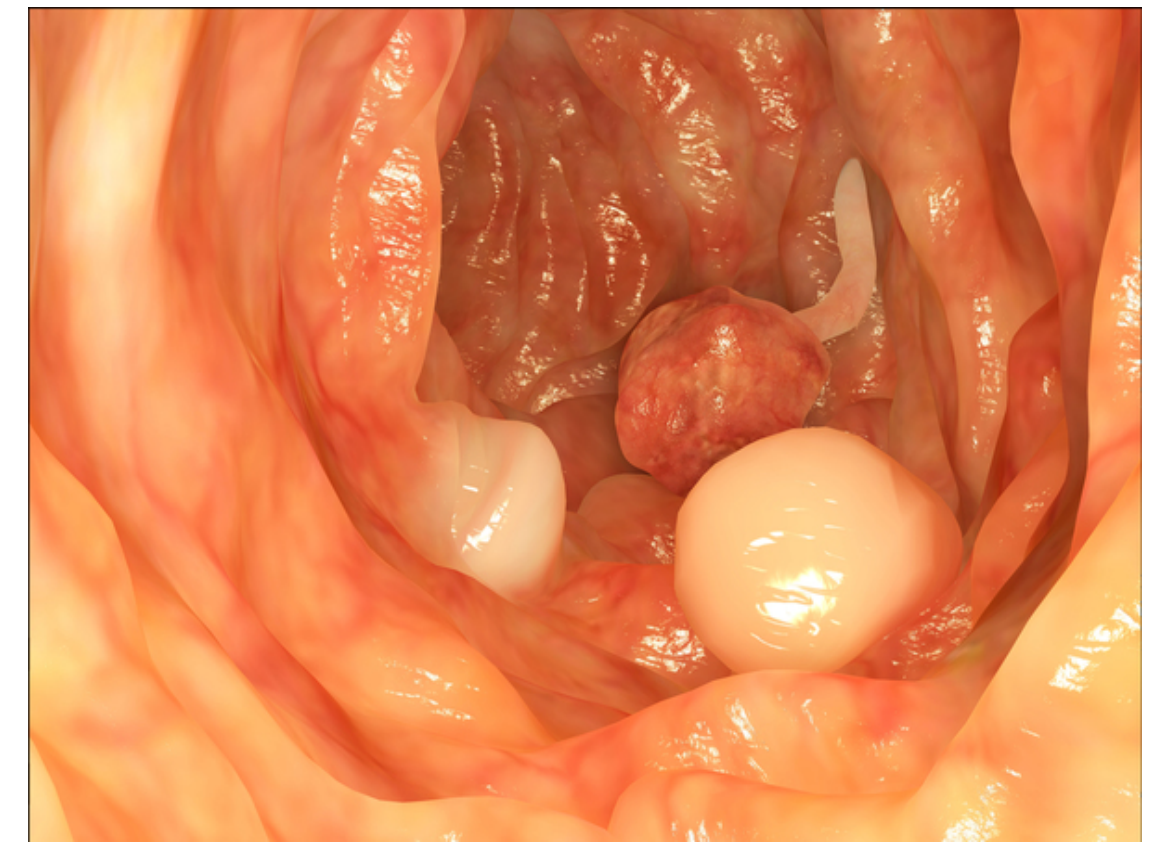
MMR i wiązania krzyżowe wewnątrz DNA

- Białka szlaku MMR biorą też udział w naprawie wiązań krzyżowych w DNA (wiązań kowalencyjnych w obrębie tej samej nici)
- Defekt - niedokrwistość Fanconiego



HNPPCC

- Dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością (HNPPCC), zespół Lyncha
- 5% wszystkich raków jelita grubego
- Mutacje utraty funkcji różnych genów (6) związanych z naprawą DNA, najczęściej systemem MMR



Nobel 2015 (chemia)

- Tomas Lindahl, za opisanie mechanizmu BER
- Aziz Sanjar, za opisanie mechanizmu NER
- Paul Modrich, za opisanie mechanizmu MMR



Naprawa pęknięć DNA

- Pęknięcia w jednej nici są łatwe do naprawienia: polimeraza + ligaza. Białka PARP chronią jednoniciowe fragmenty przed dalszą degradacją
- Pęknięcia dwuniciowe są trudniejsze do naprawienia
 - Powstają np. w wyniku działania promieniowania jonizującego
 - Blokują replikację, nienaprawione mogą doprowadzić do utraty dużych fragmentów chromosomu podczas podziału

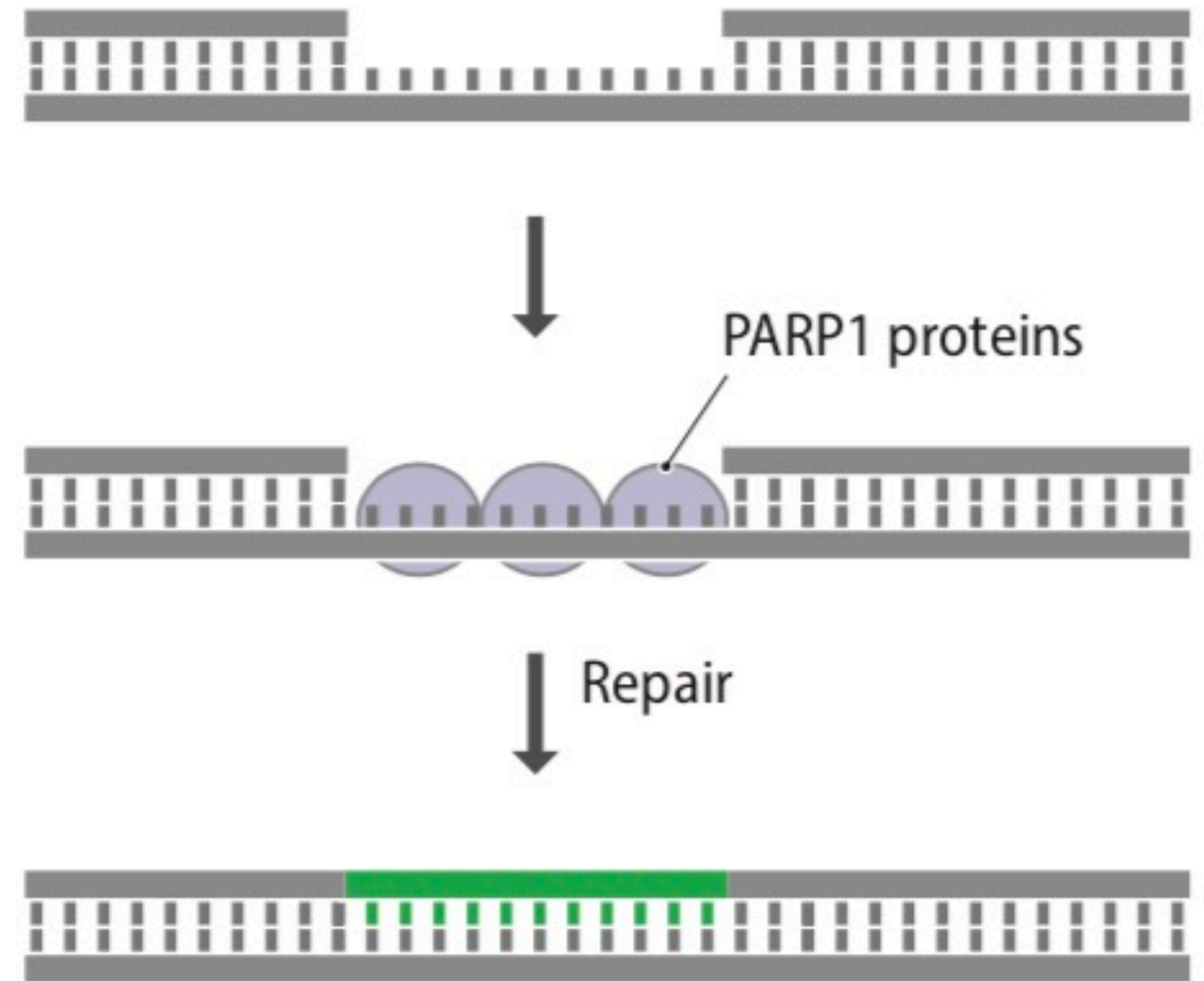


Figure 16.19 Single-strand break repair.

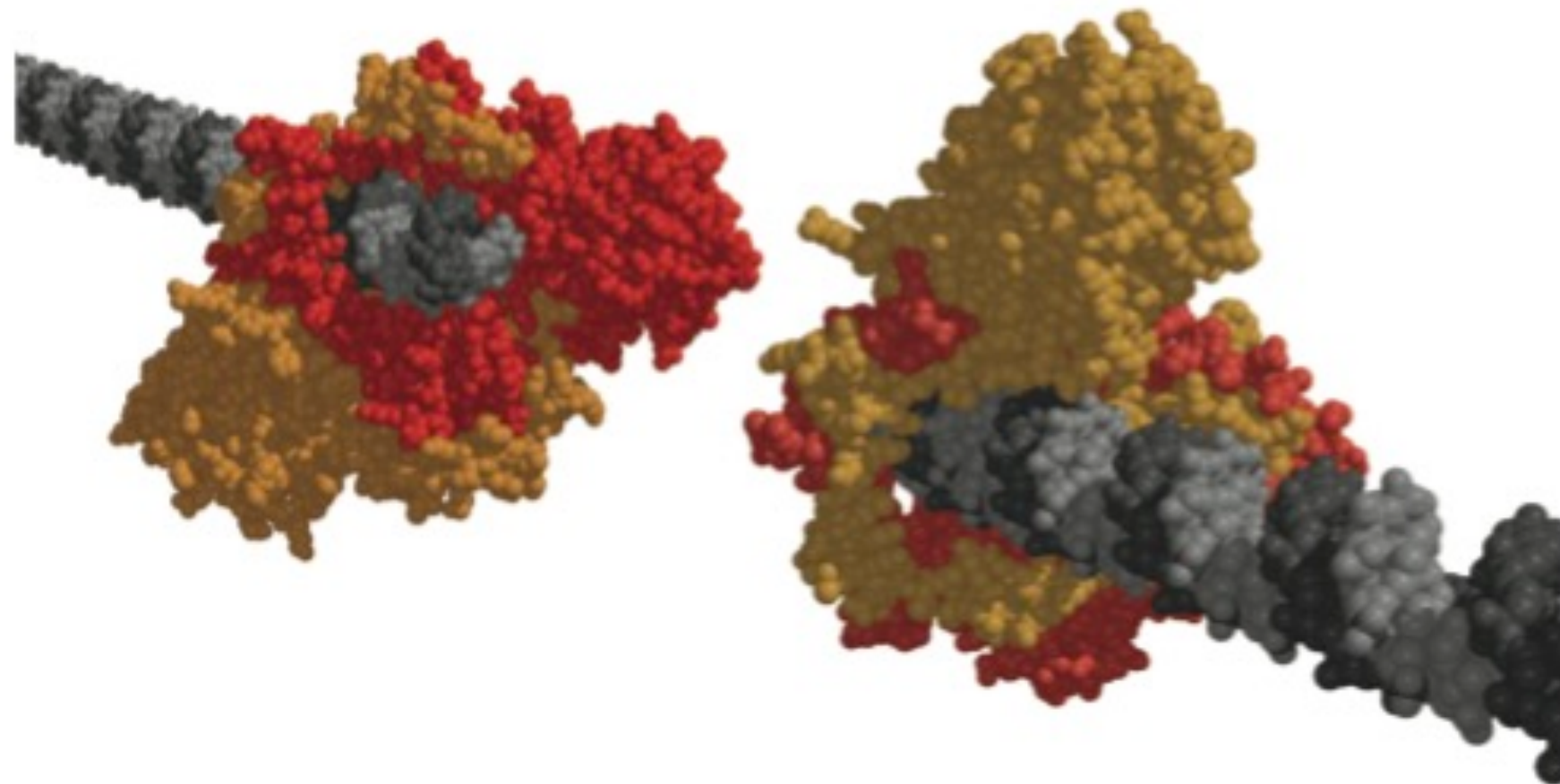
Naprawa pęknięć dwuniciowych

- DSBR (*double-strand break repair*)
- Dwa mechanizmy:
 - Rekombinacja homologiczna (HR). Główny mechanizm naprawy DSB u bakterii.
 - Łączenie końców niehomologicznych (NHEJ).
- Wybór mechanizmu u Eukaryota zależy od typu komórek i fazy cyklu komórkowego
 - NHEJ - całość cyklu
 - HR - głównie faza S i G2 (zwłaszcza u organizmów haploidalnych)

Łączenie końców niehomologicznych

- Non-homologous end joining (NHEJ)
- Występuje u Eukaryota, uproszczony wariant może też u bakterii

(B) Ku proteins bound to DNA



The nonhomologous end-joining repair process

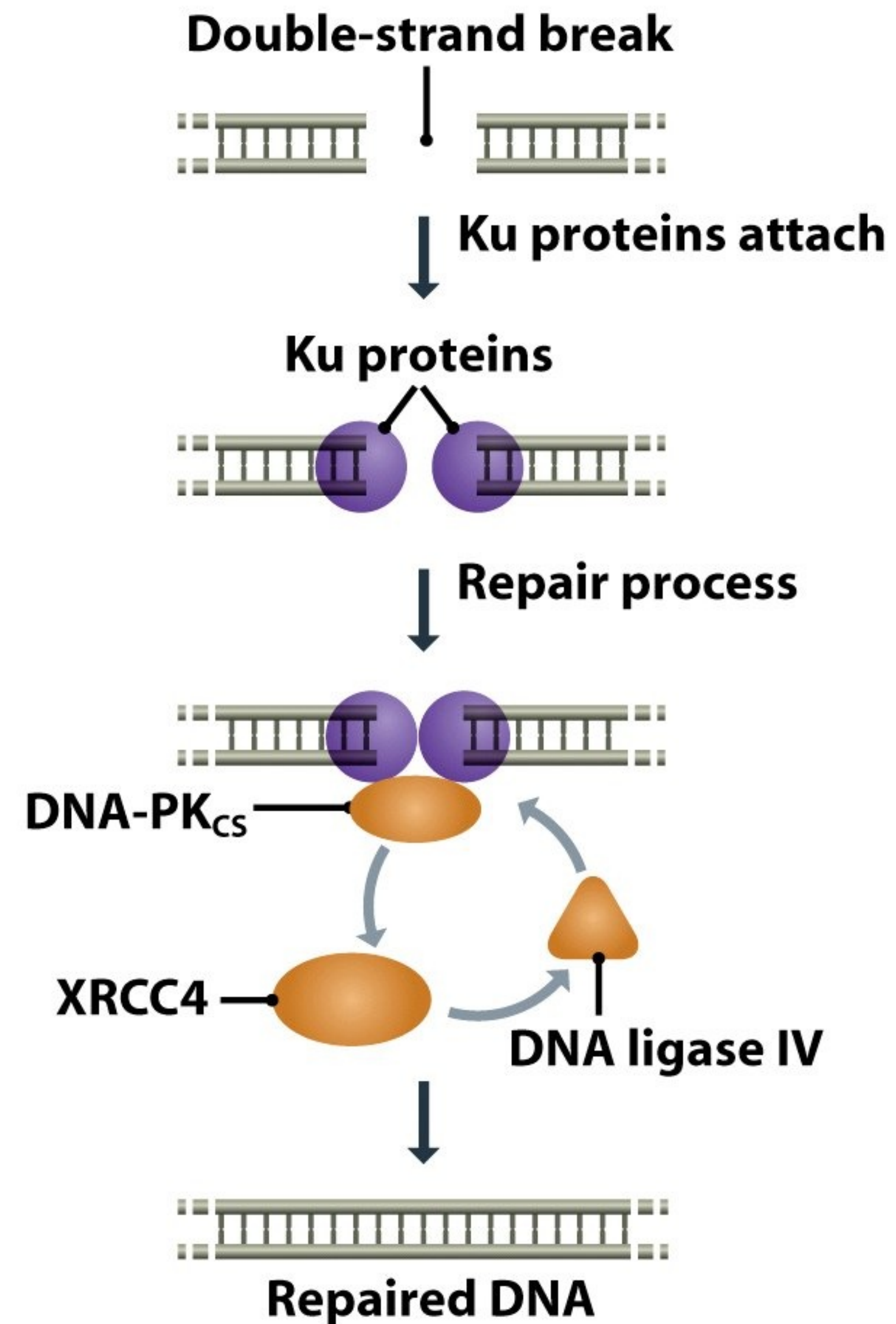


Figure 16-28a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Rekombinacja

Literatura

- Brown, rozdział 17
- Allison, rozdział 7

Rekombinacja

- Procesy pęknięcia i ponownego łączenia łańcuchów nukleotydowych
 - Opisana w związku z *crossing-over*
 - Pierwotna funkcja – naprawa pęknięć nici po replikacji, odblokowywanie widełek replikacyjnych
 - *Crossing-over* utrzymuje chromosomy homologiczne razem – ułatwia segregację
 - Bardzo ważna funkcja dla zapewnienia ewolucyjnej dynamiki genomu (wtórna)

Rekombinacja a płęć

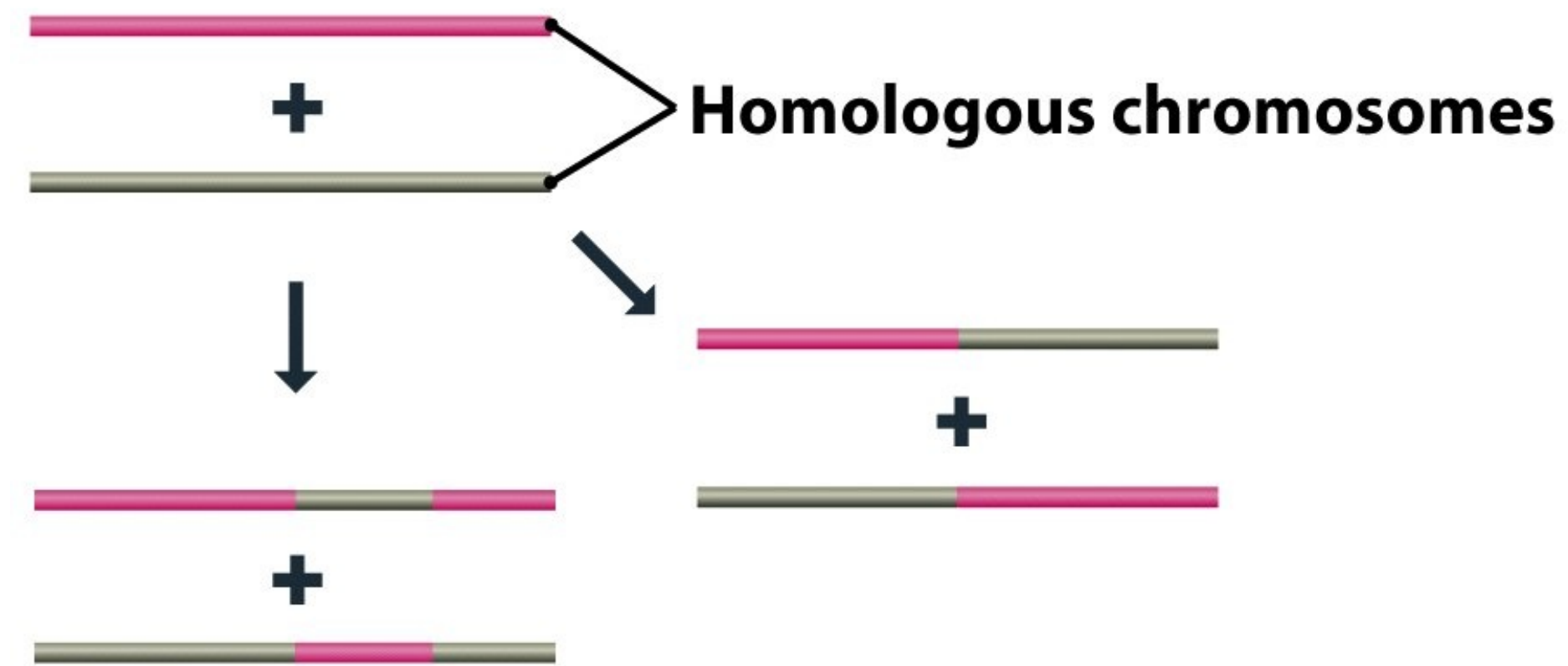
- Rekombinacja (*crossing-over*) jest waźna dla procesów płciowych
- Ale nie jest to jej pierwotna funkcja
- Mechanizm starszy i bardziej rozpowszechniony, niź płęć
- Pierwotna i głuwna funkcja - DSBR

Rekombinacja homologiczna

- Rekombinacja homologiczna (ogólna)
- zachodzi między fragmentami DNA o znacznej homologii
- pomiędzy dwiema cząsteczkami lub w obrębie jednej
- crossing-over, naprawa DNA

Homologous recombination

Between different molecules



Within a single molecule

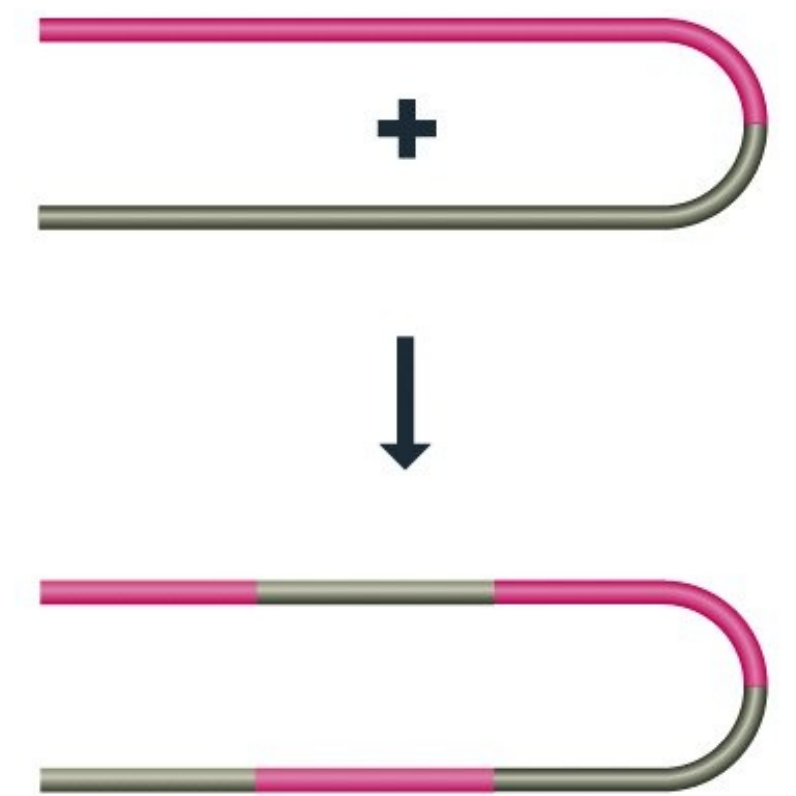


Figure 17-1a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Rekombinacja umiejscowiona

- Zachodzi między cząsteczkami mającymi jedynie krótki obszar homologii
- Regulowana przez specyficzne enzymy
- Np. integracja genomów fagowych

Site-specific recombination

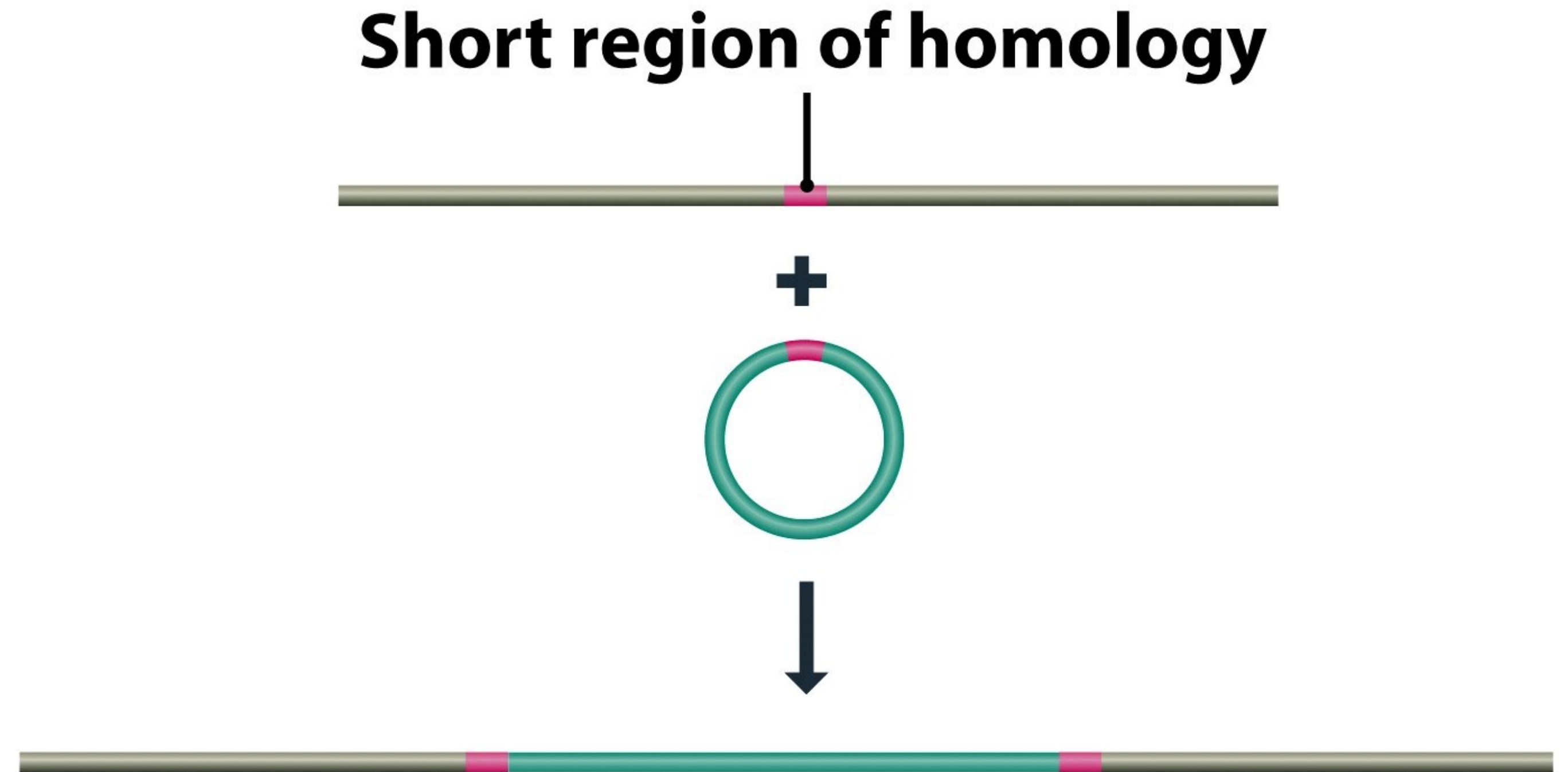


Figure 17-1b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Rekombinacja umiejscowiona

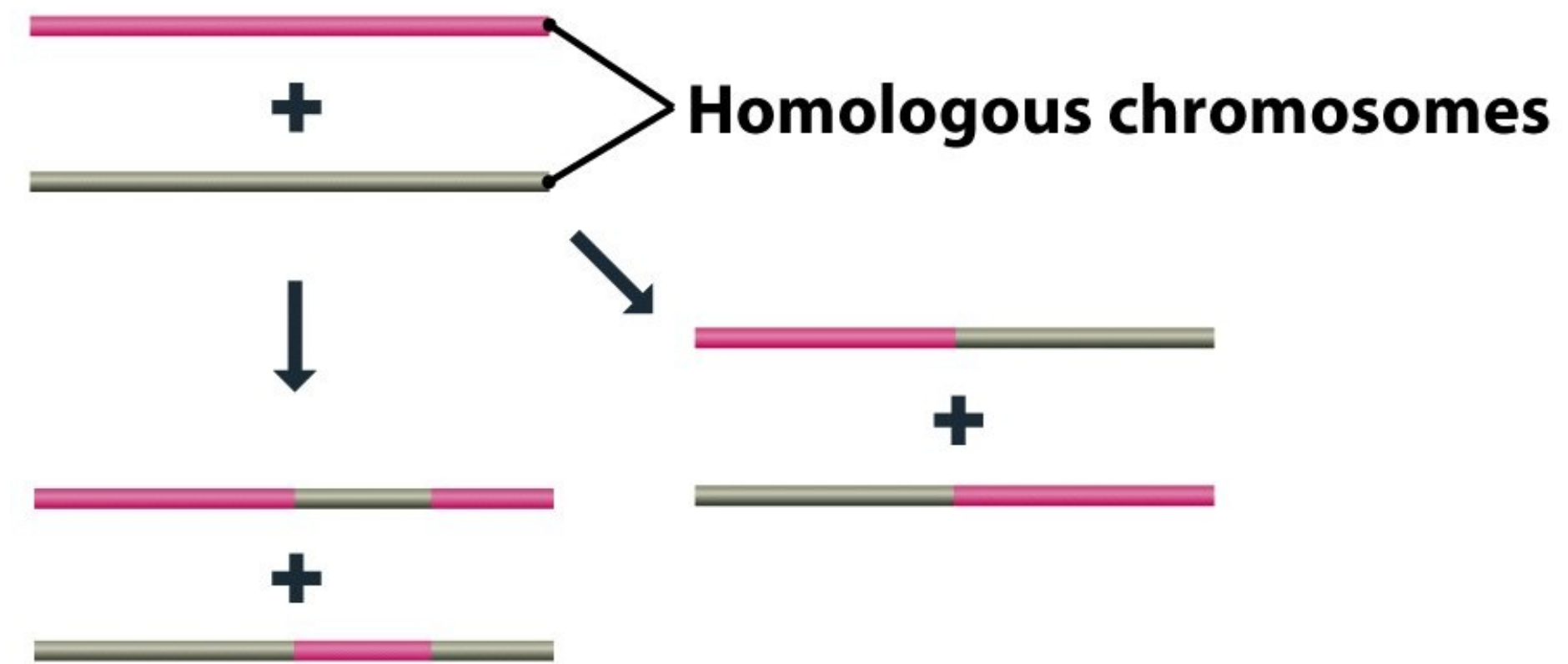
- Przykłady
 - Integracja faga (np. λ) do genomu
 - Wykorzystywana przez ruchome elementy genetyczne (transpozony, wirusy, niektóre introny)
 - Specyficzne enzymy – rekombinazy (np. integraza λ)
 - Wykorzystywana w inżynierii genetycznej (system rekombinazy Cre)
 - Delecje warunkowe
 - Usuwanie markerów selekcyjnych

Rekombinacja homologiczna

- Rekombinacja homologiczna (ogólna)
- zachodzi między fragmentami DNA o znacznej homologii
- pomiędzy dwiema cząsteczkami lub w obrębie jednej
- crossing-over, naprawa DNA

Homologous recombination

Between different molecules



Within a single molecule

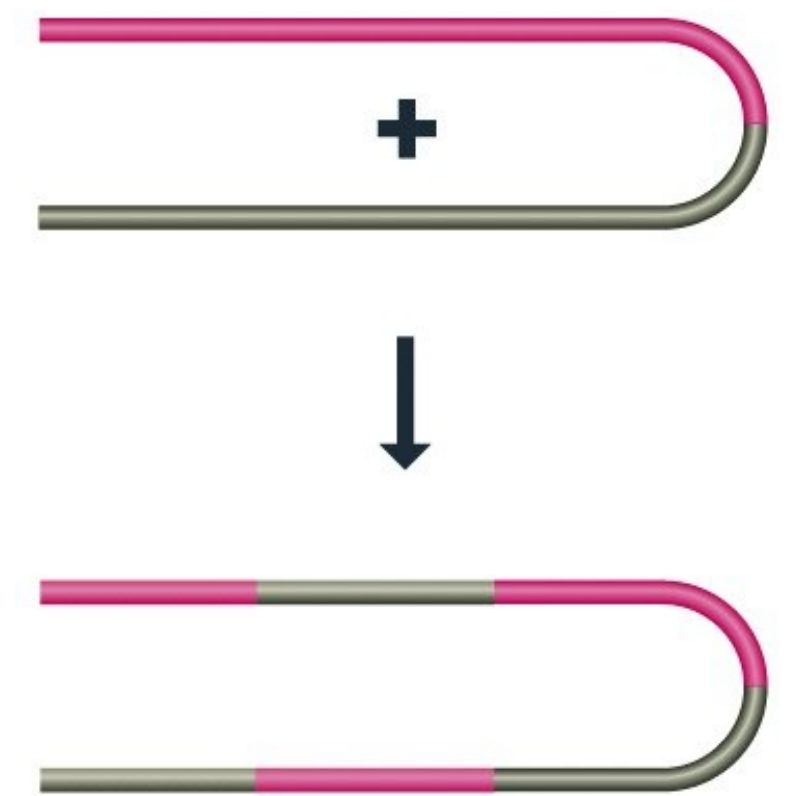


Figure 17-1a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Rekombinacja umiejscowiona

- Zachodzi między cząsteczkami mającymi jedynie krótki obszar homologii
- Regulowana przez specyficzne enzymy
- Np. integracja genomów fagowych

Site-specific recombination

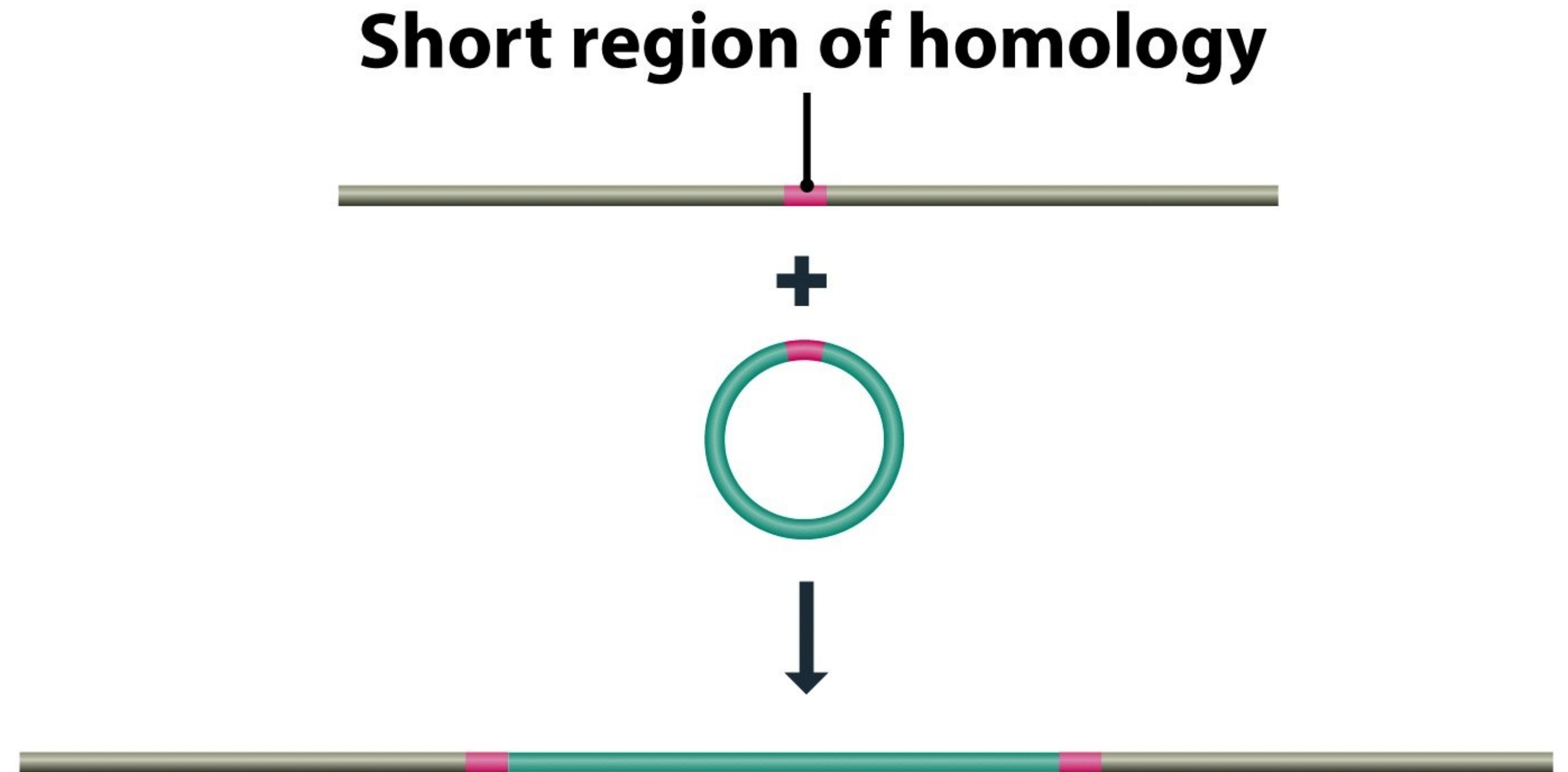


Figure 17-1b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Modele rekombinacji homologicznej

- Holliday
- Meselson-Radding

The Meselson-Radding modification

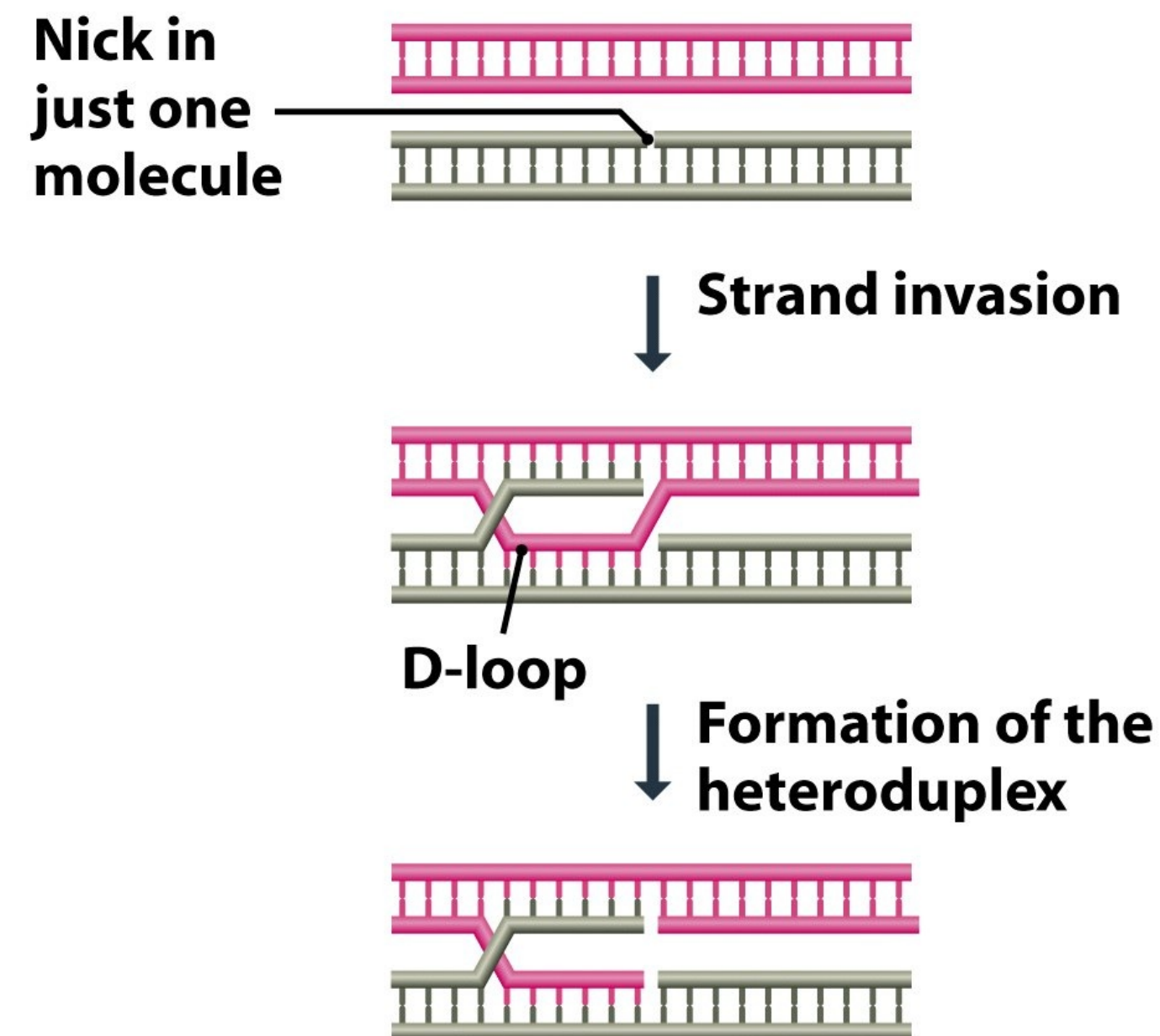


Figure 17-3b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

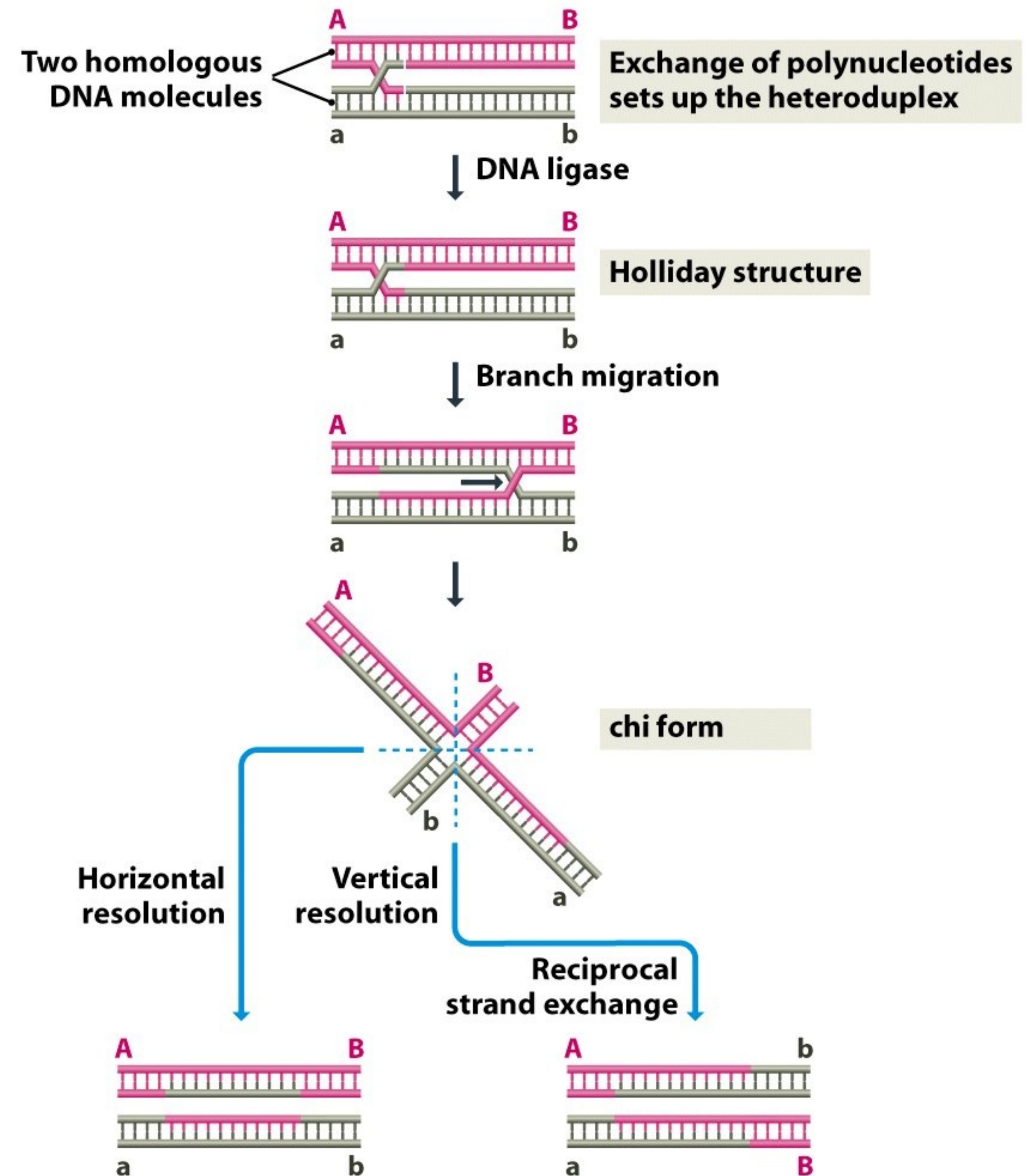
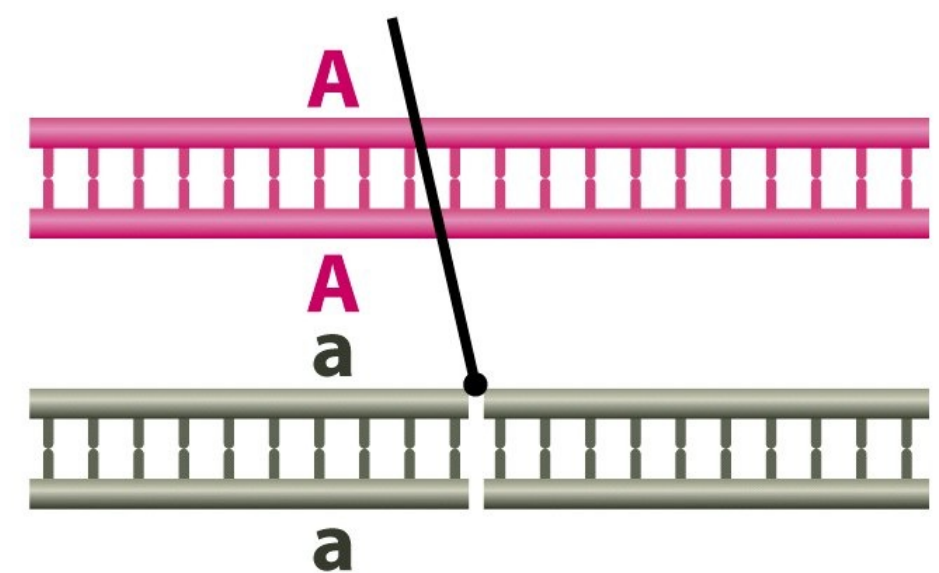


Figure 17-2 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Model pęknięć dwuniciowych

Double-strand cut



Exonuclease trims the cut strands

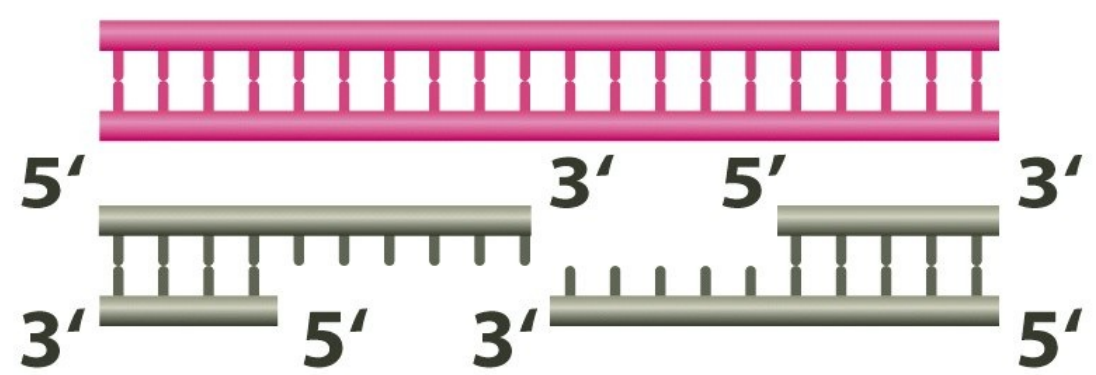
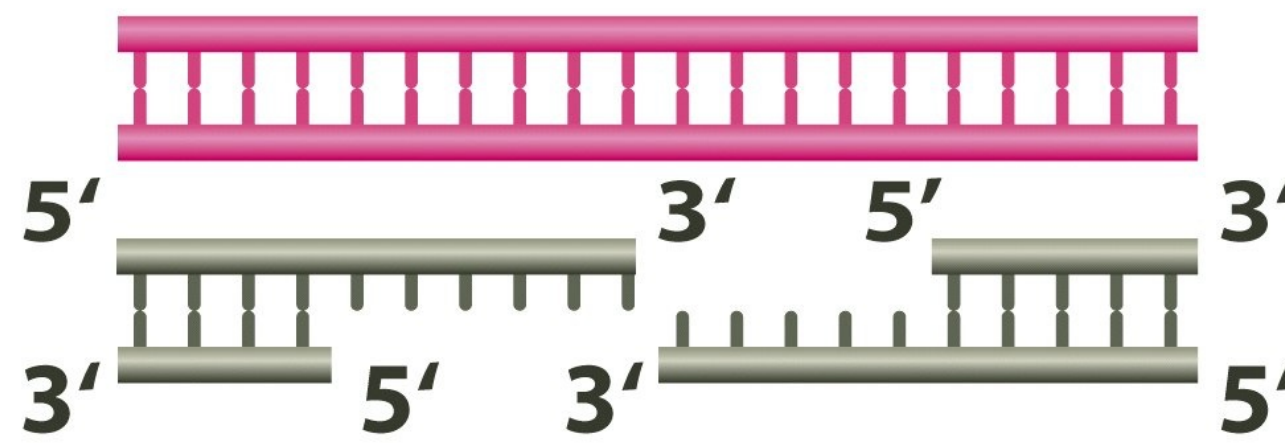


Figure 17-5 part 1 of 6 Genomes 3 (© Garland Science 2007)



Strand invasion

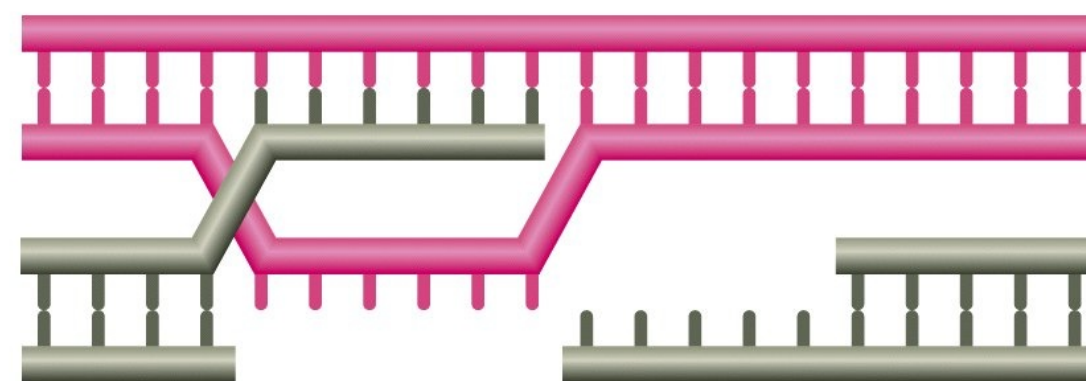
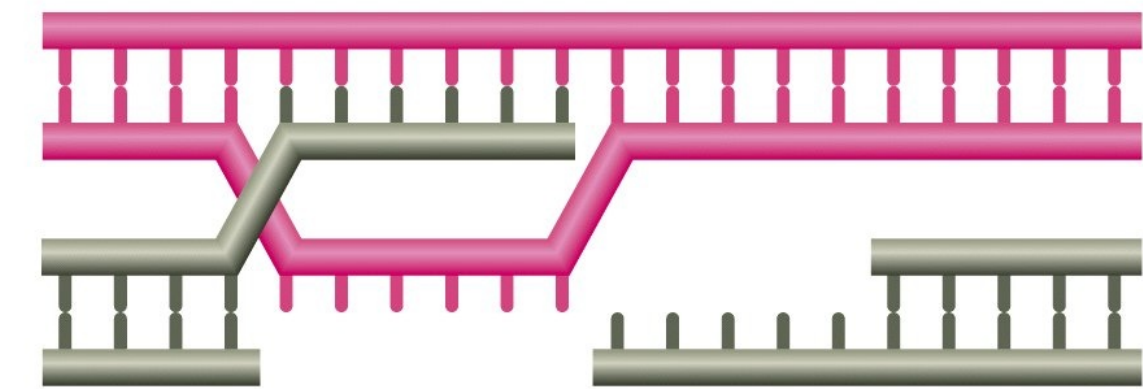


Figure 17-5 part 2 of 6 Genomes 3 (© Garland Science 2007)



Strand extension

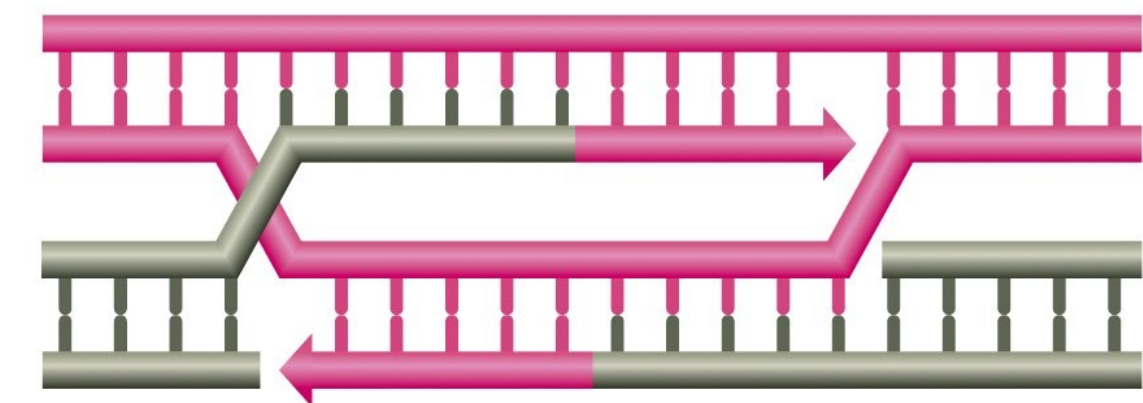
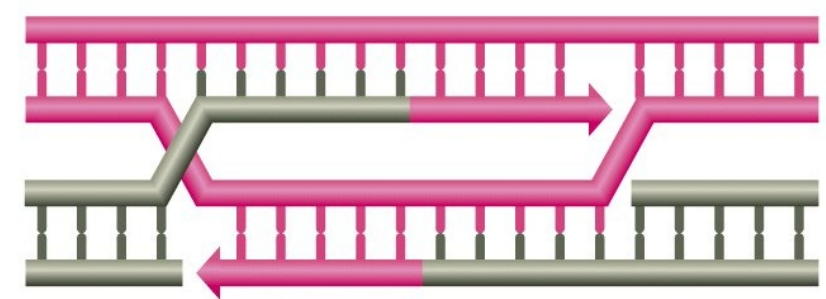
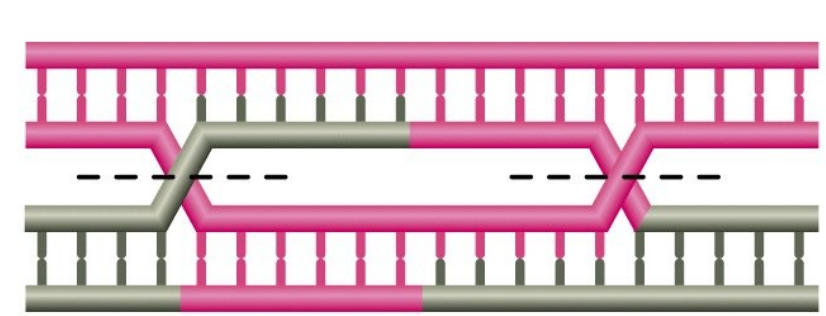


Figure 17-5 part 3 of 6 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Model pęknięć dwuniciowych

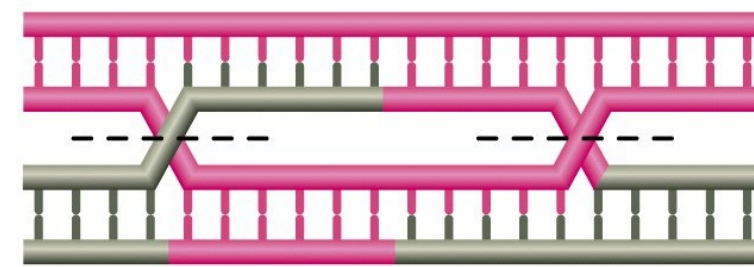


↓ **Ligase joins up the gaps**



Heteroduplex with two Holliday junctions

Figure 17-5 part 4 of 6 Genomes 3 (© Garland Science 2007)



Heteroduplex with two Holliday junctions

↓ **Cleavage of the Holliday junctions**

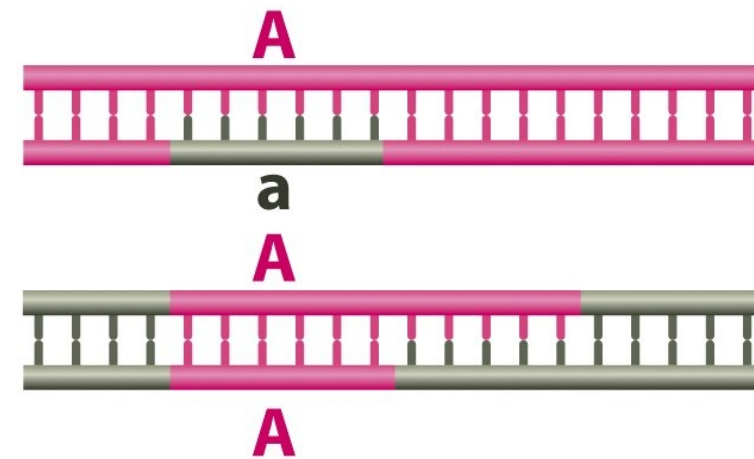
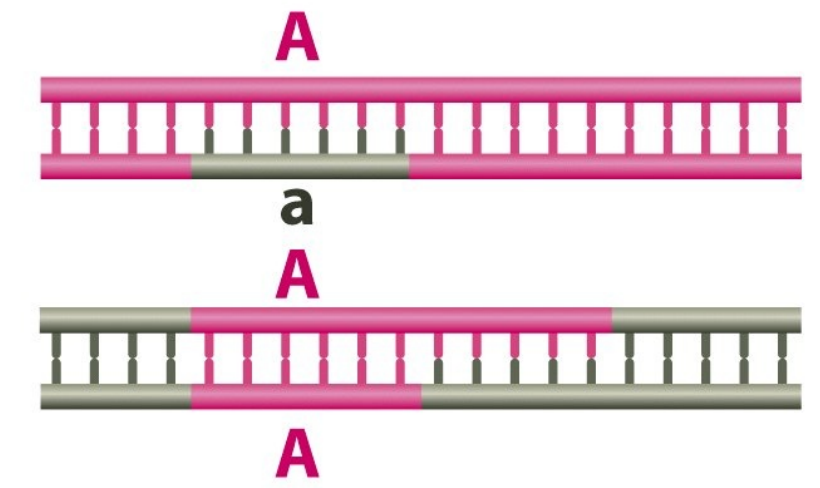


Figure 17-5 part 5 of 6 Genomes 3 (© Garland Science 2007)



↓ **Mismatch repair**

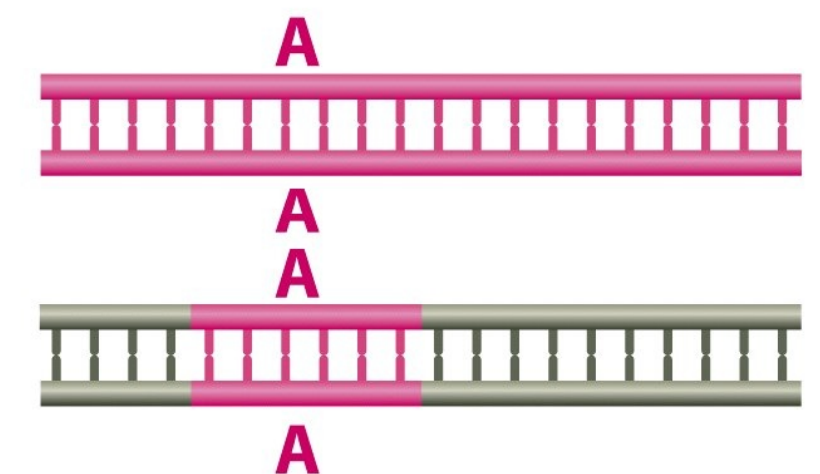
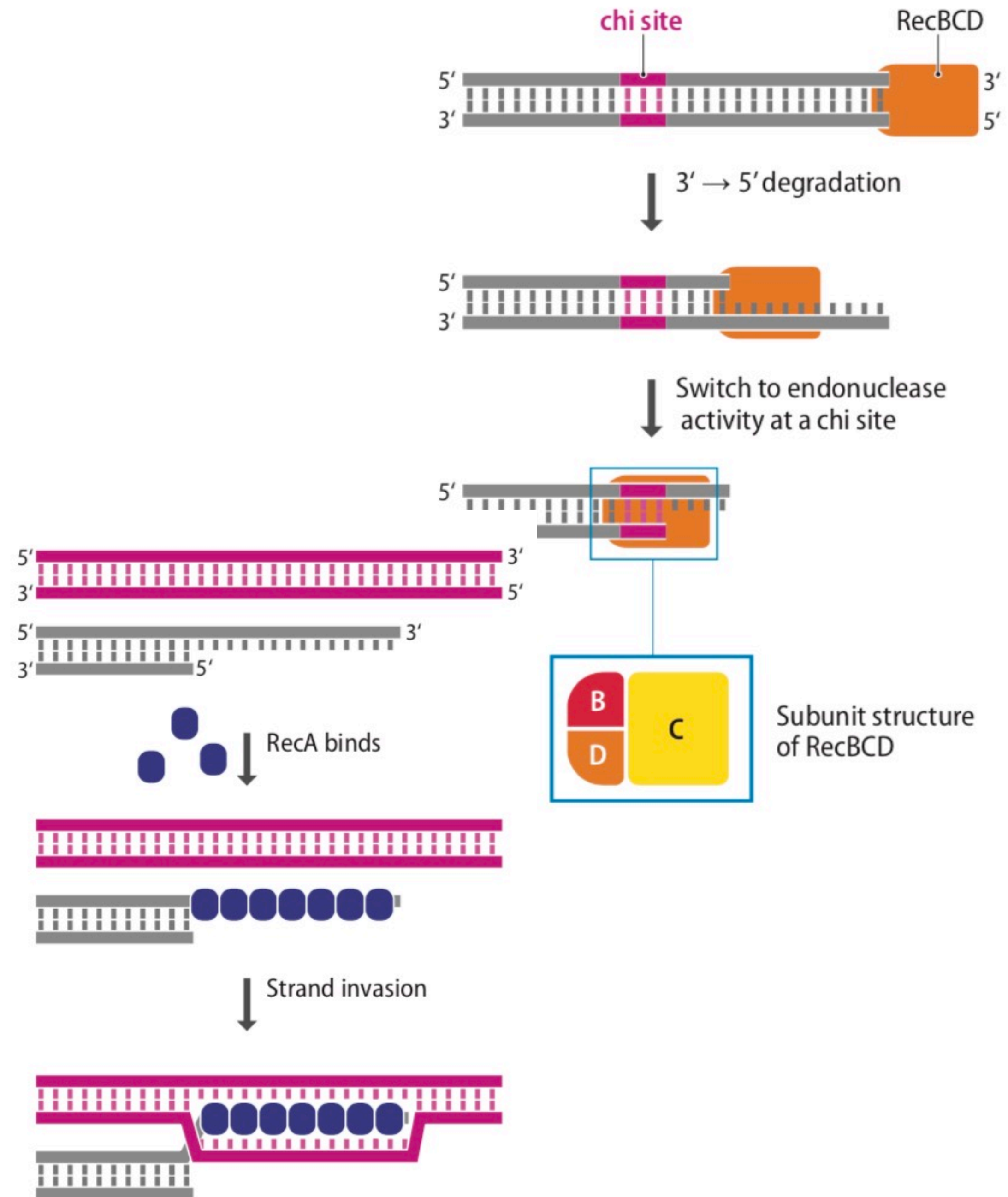


Figure 17-5 part 6 of 6 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

- Konwersja genu przez MMR zmienia rozkład alleli po mejozie z 2:2 na 3:1
- Możliwe jest wiele sposobów rozcięcia podwójnej struktury Hollidaya, dających wymianę nici, brak wymiany, konwersję itp

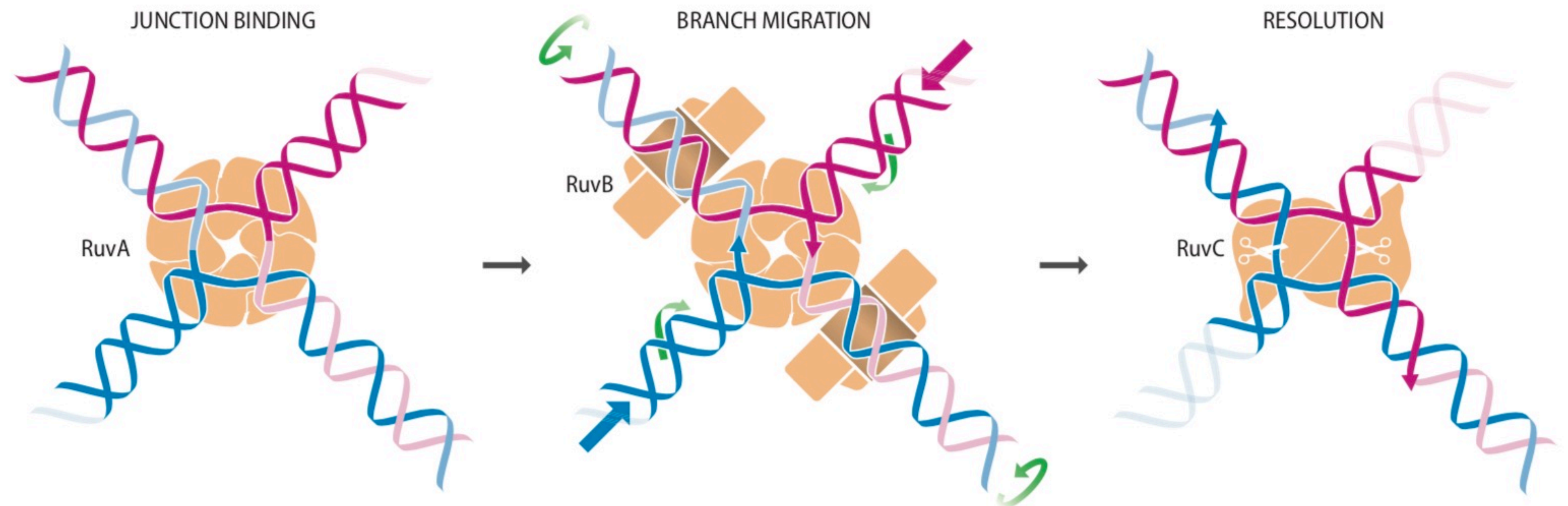
Maszyneria rekombinacyjna

- Wiele różnych wariantów, niektóre enzymy zachowane od bakterii do ssaków, inne specyficzne
- Kompleks *RecBCD* – tworzy dwuniciową cząsteczkę z wolnym jednoniciowym końcem. Helikaza + nukleaza
 - inny warianty: *RecFOR*
- *RecA* wiąże jednoniciowe obszary DNA
- u Eukaryota: białka Rad (np. Rad51 - odpowiednik *RecA*)



Maszynaria rekombinacyjna

- Migracja rozgałęzienia i rozcięcie struktury Hollidaya - białka Ruv (resolwazy)
- Resolwazy eukariotyczne: Gen1/Yen1 (rodzina nukleaz Rad1/XPG)



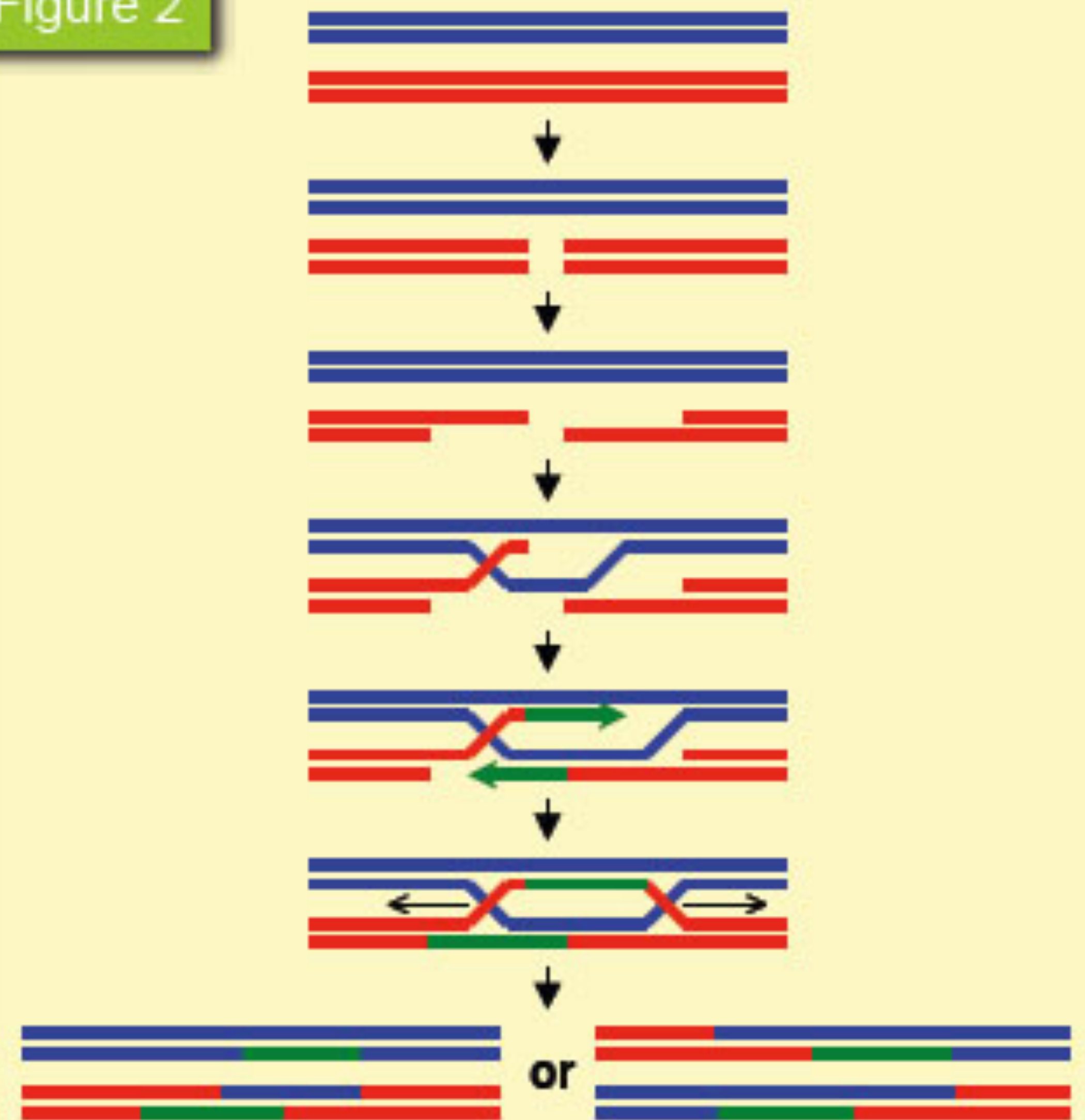
Naprawa pęknięć przez rekombinację

- Postreplikacyjna - w fazie stacjonarnej
- Replikacyjna - zapobieganie kolapsowi replikacji przy pęknięciach matrycy
 - Gdy maszyneria widełek replikacyjnych napotka miejsca z uszkodzeniami DNA, w nici potomnej powstaje luka. Replikacja często się zatrzymuje (kolaps widełek replikacyjnych)
 - Naprawa polega na wykorzystaniu nieuszkodzonej cząsteczki potomnej do uratowania replikacji
- **Główna i pierwotna funkcja rekombinacji**

Naprawa pęknięć dwuniciowych przez rekombinację

- Pęknięcia dwuniciowe często powodowane są przez promieniowanie jonizujące
- Mutanty defektywne w rekombinacji – większa wrażliwość na promieniowanie (mutanty rad drożdży)

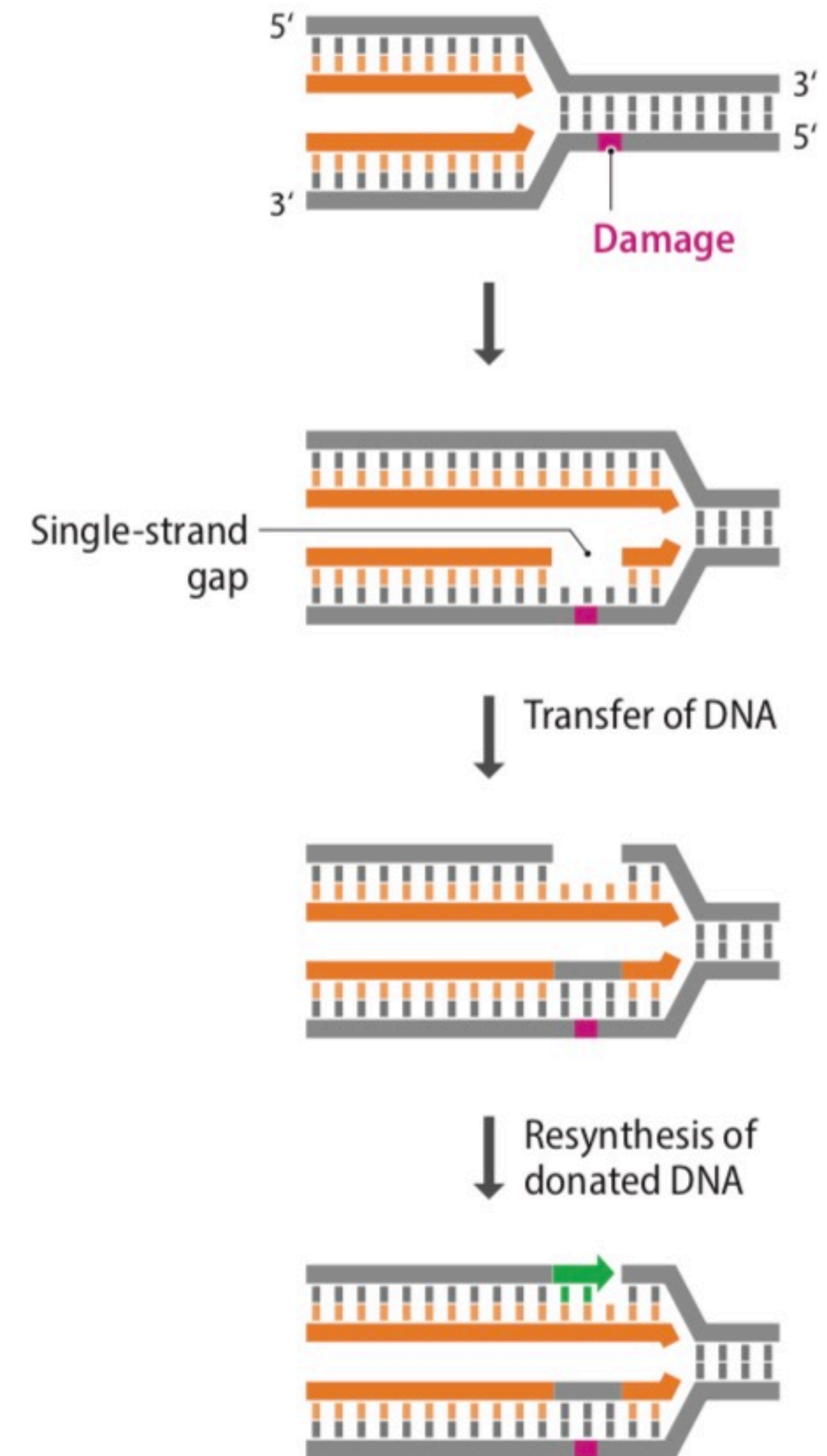
Figure 2



**Homologous Recombination
(HR)**

Rekombinacja a uszkodzenia DNA

- Uszkodzenia powodujące powstanie pęknięć jednoniciowych w nici potomnej
- U bakterii - system RecFOR



Naprawa przez rekombinację - replikacyjna

- Próba replikacji pękniętej nici – kolaps widełek

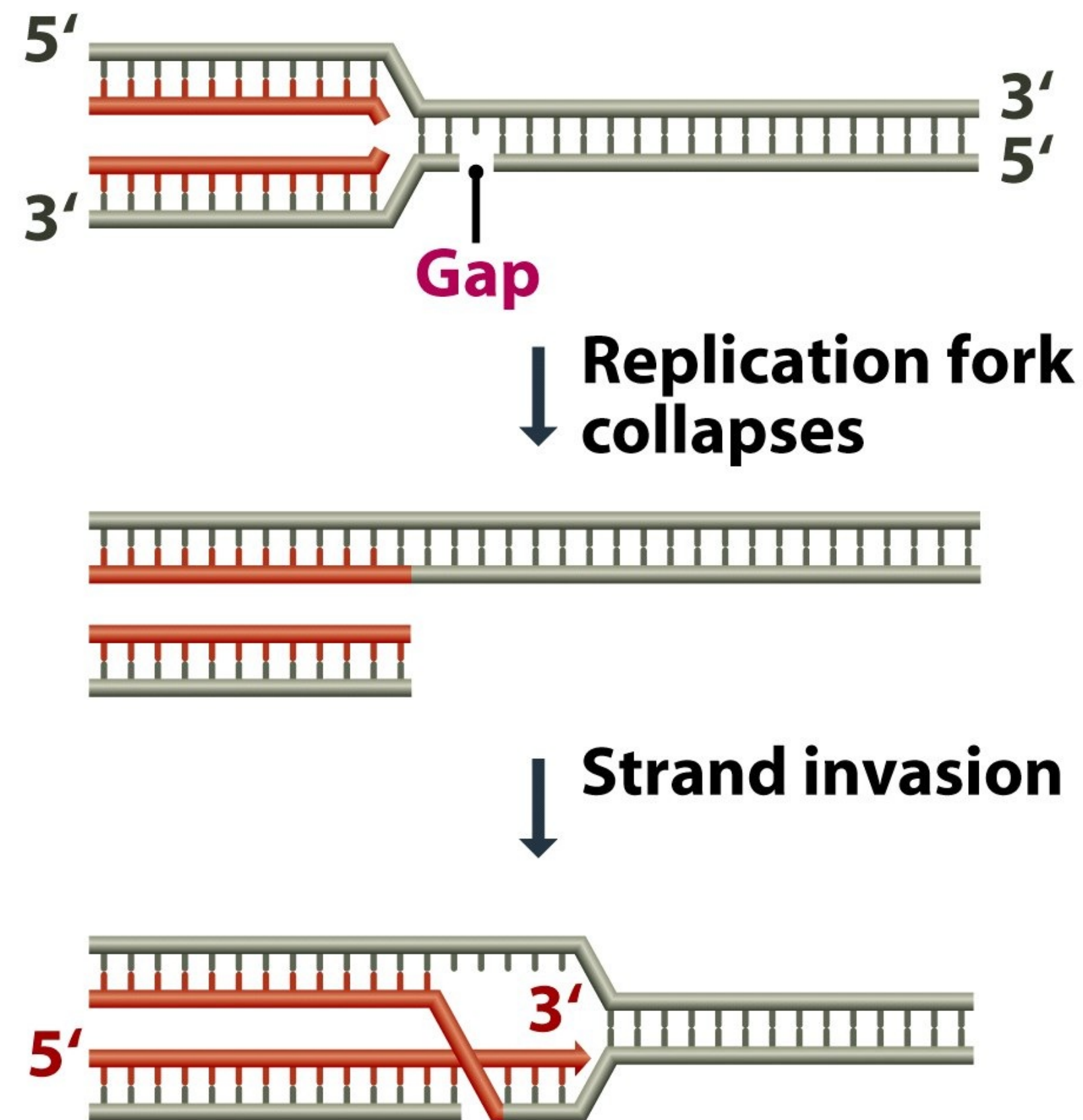


Figure 17-11 part 1 of 2 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

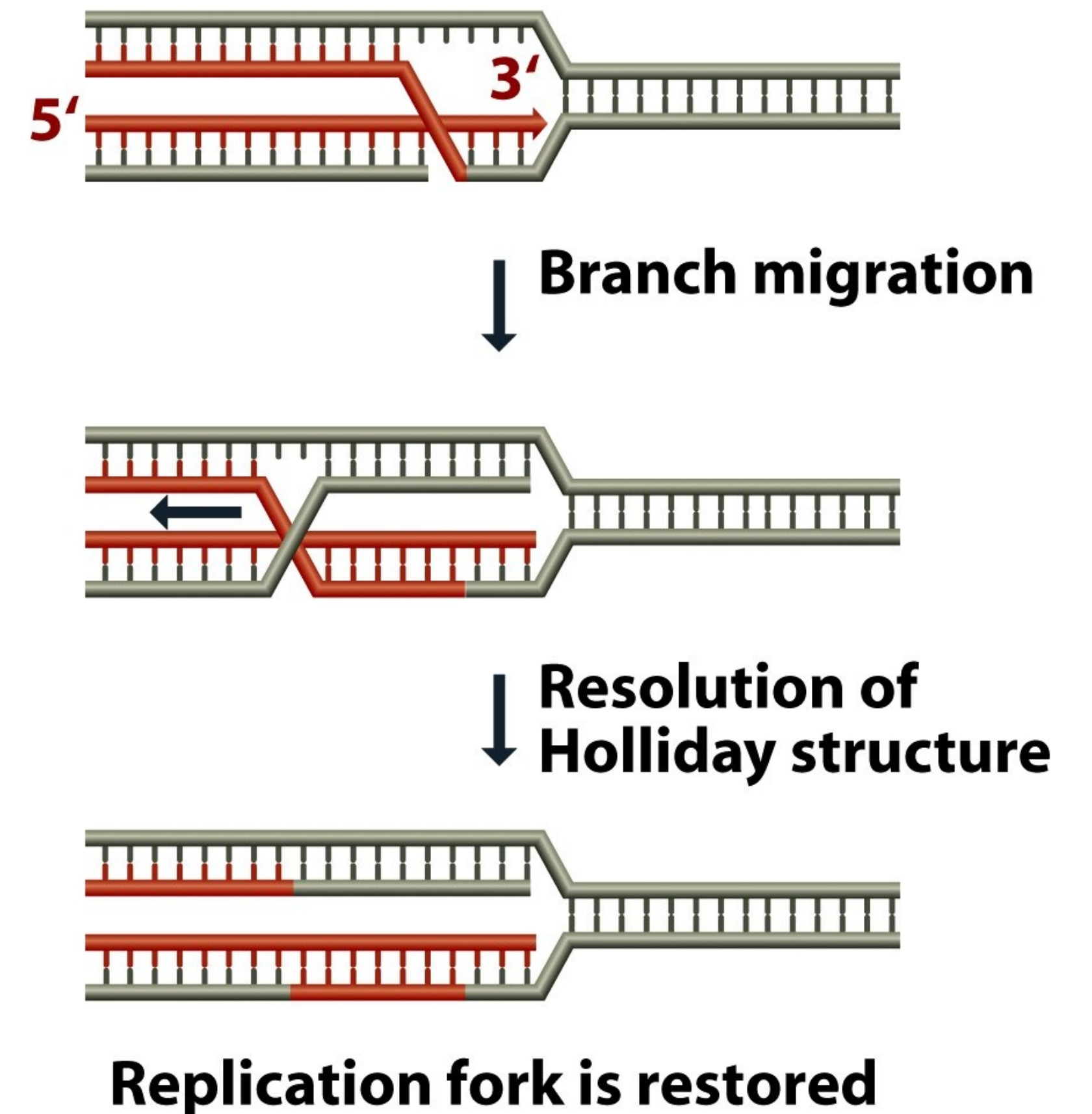


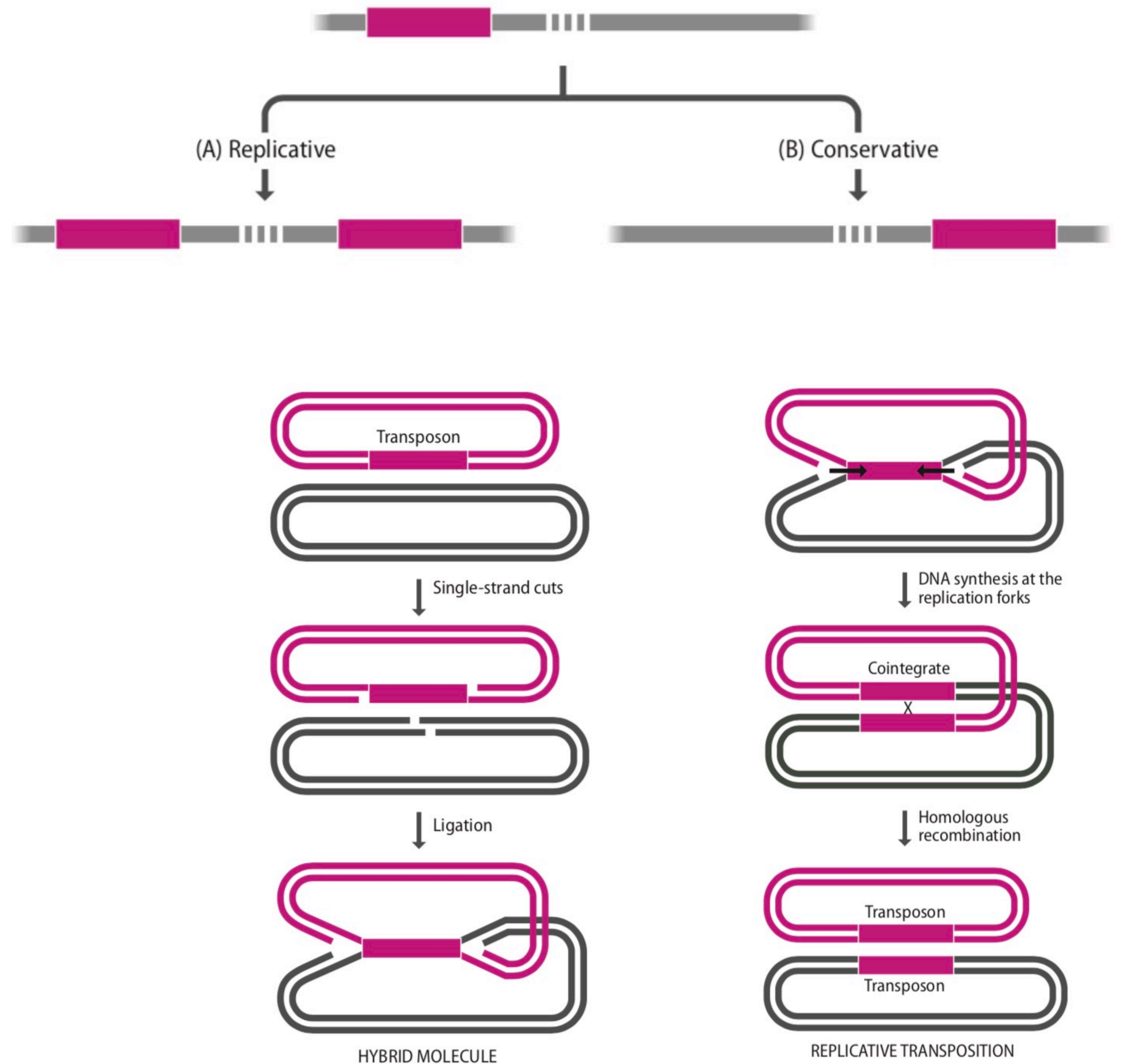
Figure 17-11 part 2 of 2 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Funkcje rekombinacji

- Naprawa pęknięć i utrzymywanie widełek replikacyjnych – najstarsza i podstawowa funkcja
- Pomaga w parowaniu chromosomów homologicznych – u Eukaryota
- Generuje różnorodność genotypów w rozmnażaniu płciowym (Eukaryota) – funkcja wtórna

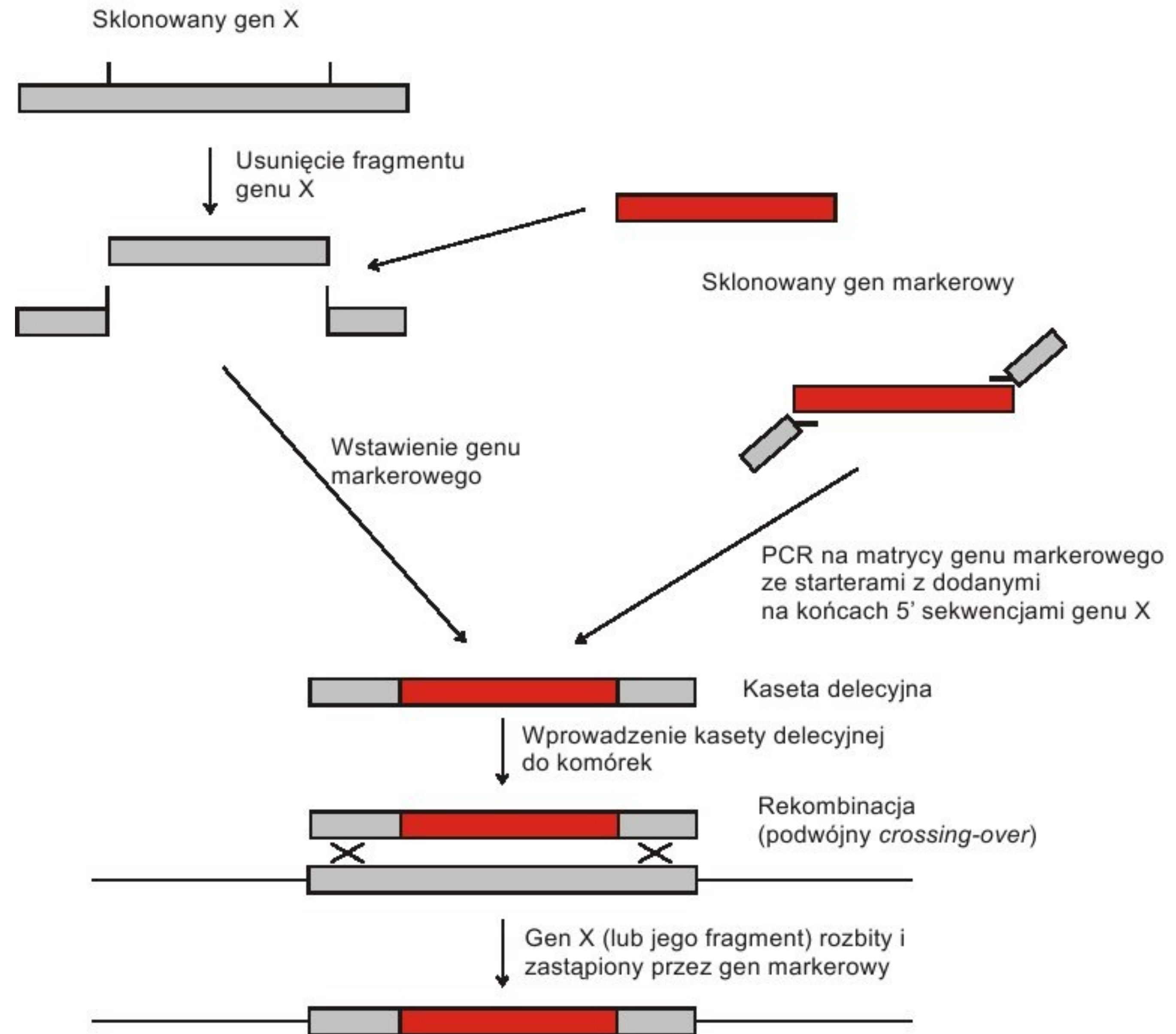
Transpozycja

- Różnorodne mechanizmy
- Ruchome elementy genetyczne, np.
 - transpozony
 - niektóre wirusy/fagi
 - elementy insercyjne
- Rekombinacja wykorzystywana do wstawienia w nowe miejsce genomu



Rekombinacja i inżynieria genetyczna

- Wprowadzenie do komórki liniowej cząsteczki DNA - wolne końce, sygnał do rekombinacji



Rekombinacja i inżynieria genetyczna

- CRISPR/Cas9 - przecięcie DNA przez Cas9 indukuje naprawę DSBR
- NHEJ jeżeli nie ma donora - powstaje delecja
- częstość ~5%, ale jeżeli nie powstanie, to Cas9 znowu tnie
- HR jeżeli jest donor

