



KURKIME ATEITĮ DRAUGE!

**PROJEKTAS „MAGISTRANTŪROS IR DOKTORANTŪROS STUDIJŲ MO-
DULIŲ KŪRIMAS IR PROGRAMŲ ATNAUJINIMAS STRATEGINĖSE BIO-
MOKSLŲ SRITYSE“**

Rekombinogenezė

Donatas Žvingila

Apsvarstė ir rekomendavo Vilniaus Universiteto Gamtos mokslų fakulteto taryba
(2008 m. kovo 5 d., protokolas Nr. 4).

Recenzavo: prof. habil. dr. Vytautas Rančelis
dr. Violeta Kleizaitė

Leidinių finansuoja Europos Sąjungos struktūrinių fondų paramos 2.5 priemonės projektas „Magistrantūros ir doktorantūros studijų modulių kūrimas ir programų atnaujinimas strateginėse modernių biomedicinos srityse“. Sutarties Nr. ESF/2004/2.5.0-03-430/BPD-199/ParS-12500-602, SFMIS Nr. BPD2004-ESF-2.5.0-03-05/0095). Projektą remia Lietuvos Respublika. Projektą iš dalies finansuoja Europos Sąjunga.

Mokomoji knyga skirta Vilniaus universiteto magistrantūros studijų programos „Genetika“ (62101B105) studentams.

LEIDINYS PLATINAMAS NEMOKAMAI

© D. Žvingila, 2008

© Vilniaus universitetas, 2008

ISBN 978-9955-25-439-3

TURINYS

Santrumpos	6
1. GENETINĖ REKOMBINACIJA	8
1.1. Genetinės rekombinacijos sąvoka	8
1.2. Rekombinacijos tipai	9
2. HOMOLOGINĖ REKOMBINACIJA	14
2.1. Homologinės rekombinacijos modeliai	15
2.2. Prokariotų homologinė rekombinacija	19
2.2.1. Rekombinacijos kelio sąvoka	19
2.2.2. Homologinės rekombinacijos baltymai <i>E.coli</i> ląstelėse	20
2.2.2.1. RecA baltymas	20
2.2.2.1.1. <i>RecA</i> baltymo biologinės funkcijos	20
2.2.2.1.2. <i>RecA</i> biocheminės savybės	22
2.2.2.1.3. Baltymai, giminiški <i>RecA</i>	26
2.2.2.2. RecBCD baltymas (egzonukleazė V)	28
2.2.2.3. RecE (egzonukleazė VIII) ir RecT	33
2.2.2.4. RecF, RecO ir RecR baltymai	34
2.2.2.5. RecG baltymas	35
2.2.2.6. RecJ baltymas	36
2.2.2.7. RecN baltymas	36
2.2.2.8. RecQ ir jam giminiški baltymai	37
2.2.2.9. RuvAB baltymai	40
2.2.2.10. RuvC baltymas	42
2.2.2.11. SbcB baltymas (egzonukleazė I)	43
2.2.2.12. SbcC ir SbcD baltymai	43
2.2.2.13. SSB baltymas	43
2.2.2.14. DNR topoizomerazės	45
2.2.3. Red rekombinacijos kelias	46
2.3. Eukariotų homologinė rekombinacija	47
2.3.1. Mejozės evoliucija	48
2.3.2. Su rekombinacija susiję reiškiniai, vykstantys mejozės metu	49
2.3.2.1. Chromosomų poravimasis ir sinapsė	50
2.3.2.1.1. <i>DGT</i> reikšmė homologinių chromosomų poravimesi	51
2.3.2.2. Sineptoneminis kompleksas	53
2.3.2.3. Chromosomų „puokštė“	56
2.3.2.4. Dvigrandžių trūkių susidarymas ir reparacija	57
2.3.2.4.1. <i>DGT</i> subbrandinimas	63
2.3.2.4.2. <i>Grandinės įterpimas ir DGT ištaisymas</i>	66
2.3.2.4.3. <i>Holidėjaus jungčių migracija ir skaldymas. Netaisyklingai suporuotų nukleotidų reparacija heteroduplekse</i>	68
2.3.2.5. Rekombinaciniai mazgeliai	69
2.3.2.6. Rekombinacija ir chromosomų pasiskirstymo į dukterines ląsteles sutrikimai	71
2.3.3. Eukariotų homologinės rekombinacijos baltymai ir jų savybės	71
2.3.3.1. Rad51 ir Dmc1 rekombinazės	73
2.3.3.2. Rad51 nukleoproteininio filamento susidarymo tarpininkai	78
2.3.3.3. Nuo <i>RAD51</i> nepriklausoma rekombinacija	80
2.3.4. Homologinė rekombinacija augaluose	81
2.3.5. Chromatino vaidmuo <i>DGT</i> šalinime homologinės rekombinacijos būdu	82
2.3.6. Rekombinacijos „karštieji“ taškai	84
2.3.7. Ektopinė rekombinacija	86
2.3.7.1. Ektopinės rekombinacijos mechanizmai	86
2.3.7.3. Pasikartojančių sekų evoliucija	88

2.4. Homologinės rekombinacijos panaudojimas	89
2.4.1. Genų kartografavimas eukariotuose	90
2.4.1.1. Eukariotų genolapių sudarymo principai	90
2.4.1.2. Molekulinių žymenų panaudojimas genolapiuose	92
2.4.1.3. Kiekybinių požymių lokusų kartografavimo principai	98
2.4.2. Bakterijų genų kartografavimas	101
2.4.3. Nepusiausvira sankaba	103
2.4.4. Genetinių kamienų kūrimas HR būdu modifikuojant recipiento genomą	107
3. SAIT-SPECIFINĖ REKOMBINACIJA	110
3.1. Konservatyvioji sait-spezifinė rekombinacija	110
3.1.1. Integracijos-ekscizijos sistemos	110
3.1.2. Atskyrimo-ekscizijos sistemos	111
3.1.2.1. Transpozonų kointegratų atskyrimas	111
3.1.2.2. Plazmidžių segregacija	112
3.1.2.3. Ekscizija raidos metu	112
3.1.3. Inversijos sistemos	112
3.1.3.1. Hin, Gin, Cin, Pin sistemos	112
3.1.3.2. Fim sistema	113
3.1.3.3. FLP sistema	114
3.1.4. Konservatyviosios sait-spezifinės rekombinacijos mechanizmai	115
3.1.4.1. Reikalavimai substratinei DNR	115
3.1.4.2. Rekombinacijos baltymai	117
3.1.5. Šaflonai	120
3.1.6. Integronai	121
3.1.7. Konservatyviosios sait-spezifinės rekombinacijos panaudojimas genų inžinerijoje	122
3.2. Transpozicija	123
3.2.1. Prokariotų JGE klasifikacija ir struktūra	125
3.2.2. Eukariotų judrieji genomo elementai	126
3.2.3. JGE sekos-taikinio ypatybės	128
3.2.4. Transpozicijos mechanizmai	129
3.2.5. Alternatyvūs transpozicijos būdai	132
3.2.6. Transpozicijos reakcija	133
3.2.6.1. Transpozono atskyrimas nuo donoro DNR	133
3.2.6.2. Grandinės pernešimo reakcija	134
3.2.7. Transpozicijos baltymų savybės	135
3.2.8. Retrotranspozonai ir retropozonai	137
3.2.8.1. Mielių Ty retrotranspozonai	137
3.2.8.2. Vaisinės muselės (<i>D. melanogaster</i>) copia retrotranspozonai	139
3.2.8.3. Žmogaus retrotranspozonai	139
3.2.9. JGE panaudojimas	143
3.2.9.1. Genų įterpimas į generatyvines ląsteles	144
3.2.9.2. Transpozonų panaudojimas somatinių ląstelių genų inžinerijoje	144
3.2.9.3. Svarbesni stuburinių gyvūnų JGE, naudojami genų inžinerijoje	144
3.2.9.4. Transpozonų panaudojimas mutagenezėje	146
4. V(D)J REKOMBINACIJA	148
4.1. Pagrindinės V(D)J rekombinacijos savybės	148
4.1.1. RAG rekombinazė ir jos genai	151
4.2. DNR galų sujungimas V(D)J rekombinacijos metu	152
4.3. V(D)J rekombinacijos valdymas	154
4.4. RAG1/2 vykdoma DNR sekų transpozicija	154
5. ANTIKŪNŲ KLASIŲ KAITOS REKOMBINACIJA	156
6. NEDĖSNINGOJI (NEHOMOLOGINĖ) REKOMBINACIJA	160
6.1. Nedėsningoji rekombinacija bakterijose	160
6.2. Nehomologiškas DNR galų susijungimas (NGS) bakterijose	162

6.3. Nedėsningoji rekombinacija eukariotuose.....	163
6.3.1. Nehomologiškas DNR galų susijungimas	163
6.3.2. Nehomologiško DNR galų susijungimo mechanizmai.....	164
6.3.3. NGS žinduolių ląstelėse.....	165
6.3.4. NGS mielėse	168
6.3.4.1. Mielių NGS reakcijos modelis.....	170
6.3.5. Nehomologiškų DNR galų susijungimo būdai	170
7. T-DNR REKOMBINACIJA	172
7.1. Įsijungimą skatinantys augalo veiksniai	174
7.2. T-DNR įsijungimas į augalo ląstelės genomą	174
8. RNR REKOMBINACIJA	177
Literatūra:	179

Santrumpos

ASR – atviro skaitymo rėmelis
AT – atvirkštinė transkriptazė
ATP – adenozino 5' trifosfatas
bp – bazių pora
cM – centimorgana
dgDNR – dvigrandė DNR
DGT – dvigrandžiai DNR trūkiai
DNR – deoksiribonukleorūgštis
DNR-PK – nuo DNR priklausanti proteinkinazė
DNR-PKcs – DNR-PK katalizinis subvienetas
FBE – FB elementai
GK – genų kasetė
HJ – Holidėjaus jungtis
HR – homologinė rekombinacija
Ig – imunoglobulinas
IR – invertuotos pasikartojančios sekos
JGE – judrieji genomo elementai
JS – jonizuojamoji spinduliuotė
kbp – kilobazė (1000 bp)
KG – kandidatinis genas
KKR – klasių kaitos rekombinacija
KPL – kiekybinių požymių lokusas
KSSR – konservatyvioji sait-specifinė rekombinacija
LTR – ilgos galinės sekos
Mbp – megabazė (milijonas bazių porų)
MMC – mitomicinas C
MMS – metilo metano sulfonatas
MRN – Mre11, Rad50 ir Nbs1 baltymų kompleksas
MRX – Mre11, Rad50 ir Xrs2 baltymų kompleksas
NGS – nehomologiškas DNR galų sujungimas
NR – nedėsningoji (nehomologinė) rekombinacija
NS – nepusiausvira sankiba
PIK – fosfatidilinozitolio kinazė (-ės)
RFLP – restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmo žymenys

RNP – ribonukleoproteininis kompleksas
RNR – ribonukleorūgštis
RSS – rekombinacijos signalinė seka
SK – sineptoneminis kompleksas
SNP – vieno nukleotido polimorfizmo žymenys
TdT – terminalinė deoksinukleotidiltransferazė
UV – ultravioletinė spinduliuotė
vgDNR – viengrandė DNR
VGT – viengrandžiai DNR trūkiai
VPD – į virusą panaši dalelė

1. GENETINĖ REKOMBINACIJA

1.1. Genetinės rekombinacijos sąvoka

Genetinė rekombinacija (lot. *re* – veiksmo pasikartojimas, *combinatio* – jungimasis, derinimasis) – tai nukleorūgščių molekulių tarpusavio sąveika, kurios metu kiekybiškai arba kokybiškai pakinta jose esanti genetinė informacija. Rekombinacija dažniausiai vyksta dalyvaujant baltymams, nors kai kurie jos atvejai, nustatyti retrovirusuose, rodo, kad galima ir be jų. Galima manyti, kad genetinės rekombinacijos reiškinys „užgimė“ pirmykščiame vandenyne, kai tik jame atsirado nukleorūgščių molekulių. Manoma, kad tai buvo RNR pasaulis, o pirmieji genomai, vadinami protogenomais, tikriausiai buvo sudaryti iš šio cheminio junginio (Gilbert, 1986; Robertson & Ellington, 1998). Jeigu tolesnė genomų evoliucija vyko „aklojo laikrodininko“, kaip vaizdingai gamtinę atranką pavadino R. Dawkins, veikiamą tai rekombinacija buvo ir išlieka pagrindinis „žaliavos“ jam tiekėjas (Dawkins, 2000). Be rekombinacijos genomai būtų statiškos, mažai kintamos struktūros. Ilgą laiką palaipsniui besikaupiančios mutacijos sukeltų tam tikrus nukleotidų sekų pokyčius genomuose, tačiau jų gebėjimas evoliucionuoti be rekombinacijų būtų labai ribotas.

Bėgant laikui, kito ne tik genomai, bet ir pačios rekombinacijos molekuliniai mechanizmai. Pačius primityviausius neseniai buvo galima tik įsivaizduoti. Tačiau nauji RNR rekombinacijos tyrimai rodo, kad ji gali vykti tarp RNR molekulių nedalyvaujant jokiems tarpininkams (Chetverin, 1999; Chetverin, 2004). Labai nedideliu dažniu RNR molekulės sąveikauja vidinėmis sritimis ir reakcijoje dalyvauja 2'-OH grupės.

Pirmiausia buvo atrasta eukariotų rekombinacija. Todėl, kai kalbame apie organizmus, genetinė rekombinacija galime vadinti tokį vyksmą, kurio metu gaunami palikuonys, turintys naujus derinius dviejų ar daugiau paveldimų faktorių, kuriais skyrėsi jų tėvai. Genomų, padalytų į atskiras chromosomas, atsiradimas sukūrė prielaidas naujai genetinės informacijos rekombinacijos galimybei. Lytiškai besidauginančiuose diploidiniuose organizmuose homologinės chromosomos į gametas pasiskirsto nepriklausomai, taip susidaro gametos, turinčios naujas genų kombinacijas. Toks kombinacinis kintamumas lemia, kad, susiliejus vyriškosioms ir moteriškosioms gametoms, atsiranda organizmas, kuris turi galbūt unikalų tam tikros rūšies genomą. Kombinacinis kintamumas nors ir paprastas, tačiau labai svarbus rekombinacijos mechanizmas, kuriam nereikia fizinių DNR pokyčių. Tačiau jam būtina chromosomų genetinė įvairovė. Jeigu vieno individo chromosomos būtų identiškos kitų tos pačios rūšies atstovų chromosomoms, tai, nepaisant kombinacinio kintamumo ir lytinio dauginimosi, atsiradę palikuonys būtų genetiškai vienodi. Chromosomų genetinę įvairovę nulemia du mechanizmai: mutacijos ir sukibusių genų rekombinacija. Pastaroji gali būti skirstoma į homologinę, sait-specifinę, transpoziciją ir nedėsningąją (nehomologinę).

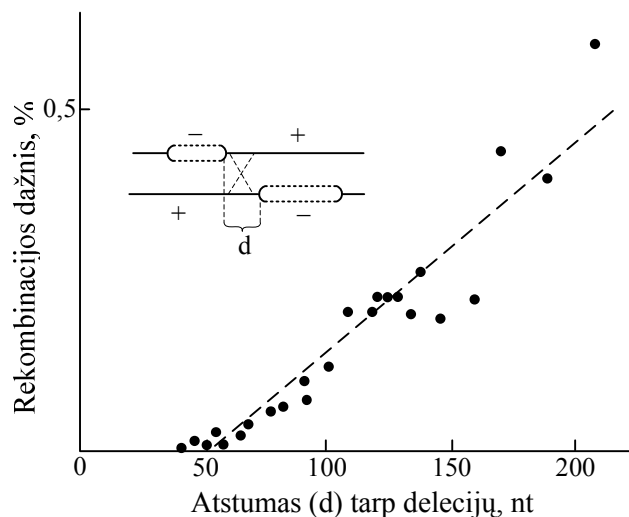
Ląstelės rekombinacinė struktūra gana konservatyvi, todėl pagrindiniai šio proceso etapai yra universalūs visiems gyviems organizmams. Pagrindiniai universalūs etapai šie:

- trūkių atsiradimas DNR molekulėse;
- viengrandžių DNR fragmentų susidarymas;
- heteroduplekso (hibridinio DNR fragmento) susiformavimas;
- geno konversija ir (ar) krosingoveris.

Vis dėlto pamatysime, kad rekombinacijos mechanizmai yra nepaprastai įvairūs ir gana sudėtingi. Genetinės rekombinacijos pasekmės išryškėja ne tik organizmų kartose. Rekombinacija nuolat vyksta kiekvieno individo genome. Tai gali sukelti genų veiklos pokyčius, individo somatinių ląstelių įvairovės susidarymą, DNR pažaidų šalinimą.

1.2. Rekombinacijos tipai

Dažniausiai rekombinacija (be kombinacinio kintamumo) skirstoma į **homologinę, sait-specifinę, transpoziciją ir nedėsningąją (nehomologinę)**. Toks skirstymas gana sąlyginis, tačiau patogus ir visuotinai priimtas. Vis dėlto yra keletas rekombinacijos reiškinių (klasių kaitos rekombinacija, V(D)J rekombinacija, T-DNR rekombinacija), kurie turi labai savitų bruožų arba ypatybių, būdingų daugiau nei vienam rekombinacijos tipui. Todėl apie šiuos reiškinius bus kalbama atskirai nepriskiriant jų nė vienam iš išvardytų tipų.

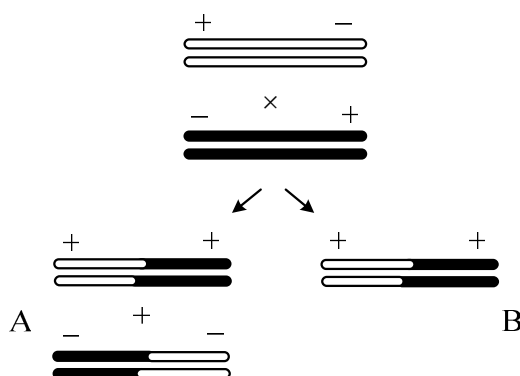


1 pav. Rekombinacijos dažnio priklausomumas nuo homologinio fragmento ilgio tarp mainuose dalyvaujančių fago T4 mutantų DNR molekulių (Singer ir kt., 1982)

Homologinė, arba bendroji genetinė rekombinacija – tai genetiniai mainai tarp nukleorūgščių molekulių, turinčių identiškas arba labai panašias (homologines) sritis. Tačiau būtinas tam tikras homologinių DNR sekų ilgis. Jei homologijos saito ilgis yra trumpesnis už tam tikrą kritinį dydį, tai homologinė rekombinacija nevyks, nes su DNR negalės sąveikauti specifiniai homologiją atpažįstantys ir procesą vykdantys baltymai. Homologijos saito ilgio įtaka rekombinacijos dažniui buvo tiriama įvairiuose biologiniuose objektuose. Nustatyta, kad ji labai priklauso tiek nuo

sąveikaujančių molekulių savybių, tiek nuo paties objekto. *E. coli* ląstelėse šis dydis yra apie 20–40 bp, *Bacillus subtilis* ~70 bp, mielėse – 150-250 bp, žinduolių ląstelėse – 200 bp. Pirmame paveiksle pavaizduotas fago T4 mutantų rekombinacijos dažnio priklausomumas nuo homologijos. Šių mutantų rekombinacija nevyksta, jei sąveikaujančių molekulių homologinių fragmentų ilgis mažesnis nei 50 bp.

DNR dupleksų homologinė rekombinacija dar gali būti skirstoma į konservatyviają ir nekonservatyviają. Jeigu rekombinacijos produktų susidaro tiek, kiek jų buvo ir prieš ją, tai yra konservatyvioji rekombinacija. Jeigu rekombinantinių molekulių susidaro mažiau, tai yra nekonservatyvioji rekombinacija (2 pav.).

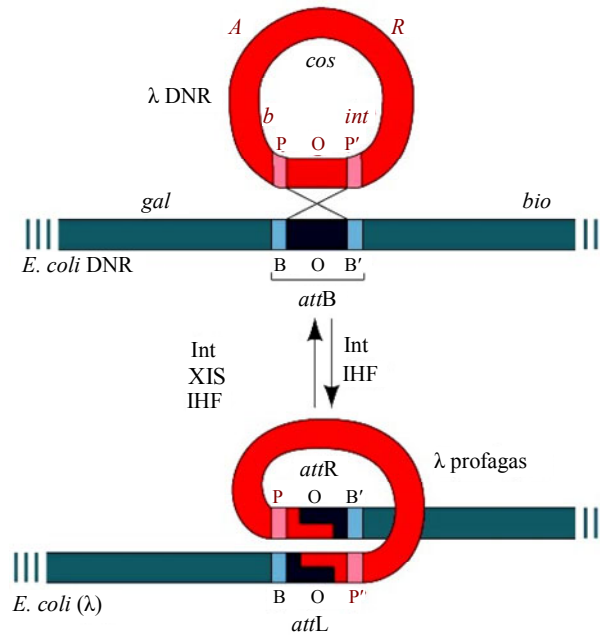


2 pav. Konservatyvioji (A) ir nekonservatyvioji (B) rekombinacija (Takahashi ir kt., 1992)

Manoma, kad *Escherichia coli* ląstelėse RecF keliu vykstanti rekombinacija yra nekonservatyvioji. Rekombinuojant dviem DNR dupleksams, susidaro rekombinacinė molekulė ir DNR galai, kurie pradeda kitą nekonservatyviosios rekombinacijos etapą. Remiantis šiomis prielaidomis galima paaiškinti linijinių multimerinių plazmidžių formų susidarymą vykstant mainams RecF keliu.

Sait-specifinė rekombinacija istoriškai buvo vadinamos dvi reiškinų grupės: konservatyvioji sait-specifinė rekombinacija ir transpozicija. Kadangi rekombinacijos mechanizmai abiem atvejais labai skiriasi, todėl dabar jau kalbama apie du atskirus rekombinacijos tipus: konservatyviają sait-specifinę rekombinaciją (arba tiesiog sait-specifinę rekombinaciją) ir transpoziciją (Leach, 1996).

Svarbiausias sait-specifinės rekombinacijos požymis yra tai, kad ją vykdo baltymai, kurie atpažįsta tik tam tikras specifines sekas ir katalizuoja jų genetinius mainus. Tarp sąveikaujančių DNR sekų dažniausiai yra homologija, nes jas atpažįsta tas pats baltymas arba homologija reikalinga tarpiniams šios reakcijos etapams. Tačiau svarbiausias vaidmuo šio tipo rekombinacijoje tenka ne sekų homologijai, bet sąveikai tarp baltymo ir DNR bei tarp baltymų. Konservatyviosios sait-specifinės rekombinacijos pavyzdys – fago λ integracija į *E. coli* chromosomą ir ekskizija iš jos (3 pav.). Svarbiausias čia yra Int baltymas, kuris atpažįsta *attP*, *attB* sekas bei tarp jų vykdo rekombinaciją. λ insercijai reikia, kad *attB* sekos ilgis būtų ne trumpesnis kaip 21 bp, o *attP* – 234 bp. Be to, *attP* saitas turi būti superspiralizuotas. Tarp *attP* ir *attB* sekų 15 bp yra identiškos.



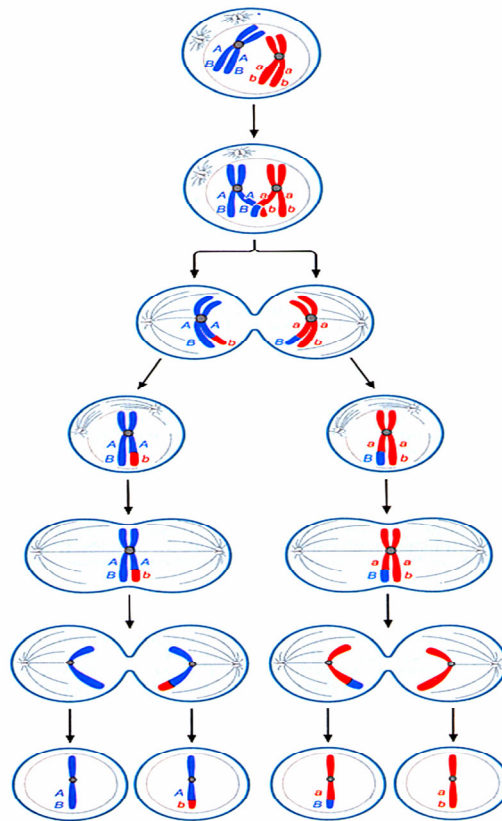
3 pav. Fago λ ir *E. coli* sait-spezifinė rekombinacija (pagal Weisberg ir Landy, 1983)

Transpozicinė rekombinacija panaši į sait-spezifinę tuo, kad jos metu taip pat vyksta sąveika tarp baltymo ir DNR bei tarp baltymų molekulių. Tačiau baltymai, katalizuojantys transpoziciją, dažniausiai specifiskai atpažįsta tik vieną iš rekombinacijoje dalyvaujančių sekų, transpozicijai svarbios genomo judraus elemento sekos, esančios jo galuose. Jas atpažįstantis baltymas dažnai vadinamas transpozaze.

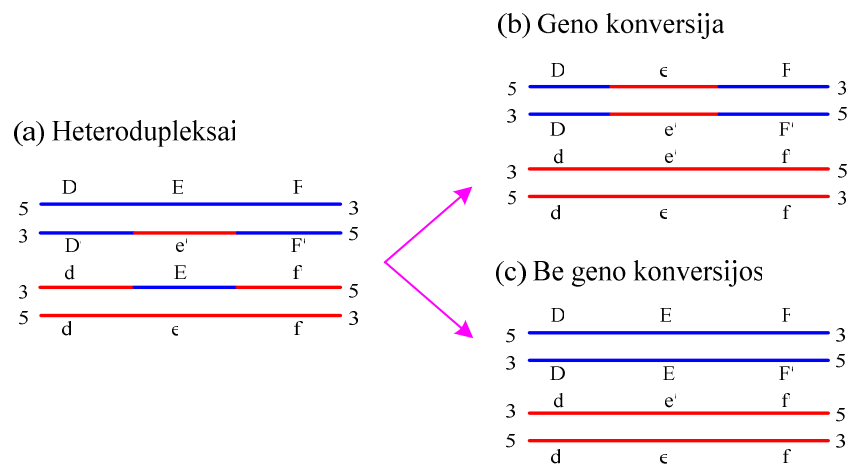
Nedėsningoji (nehomologinė) rekombinacija vyksta tarp molekulių, neturinčių jokios homologijos arba ji labai maža. Retais atvejais, ypač bakterijose, šį procesą lemia ląstelės sistemų, nepritaikytų rekombinacijai, klaidos. Kai kurie autoriai (pavyzdžiui, Leach'as) siūlo šio tipo rekombinacijos reiškinius skirstyti į dvi grupes: „galų sujungimo“ ir „grandinių slystelėjimo“ (Leach, 1996). Tačiau toks grupavimas neatspindi visos nedėsningos rekombinacijos reiškinių įvairovės.

Įvairios rekombinacijos sistemos gali koegzistuoti toje pačioje ląstelėje. Tačiau įdomu tai, kad jų indėlis į bendrąją rekombinaciją įvairiose organizmų grupėse yra skirtingas. Mikroorganizmuose vyrauja homologinė rekombinacija. O augalų ląstelėse vienam homologinės rekombinacijos atvejui tenka 100–10 000 nedėsningos rekombinacijos įvykių.

Dažnai vartojami terminai „reciprokinė“ ir „nereciprokinė rekombinacija“. Reciprokinė rekombinacija – tai simetriški dviejų DNR dupleksų mainai. Tipiškas reciprokinės rekombinacijos pavyzdys yra mejozinis krosingoveris, kurio metu homologinės chromosomos apsikeičia vienodais savo fragmentais (4 pav.). Nereciprokinė rekombinacija – tai nesimetriškas apsikeitimas genetinė informacija. Šiuo atveju informacija perduodama tik viena kryptimi. Ryškiausias nereciprokinės rekombinacijos pavyzdys eukariotuose yra geno konversija. Šis reiškinys pirmiausia buvo aptiktas grybuose ir pasireiškė netipiškais skilimo santykiais: 5:3, 6:2 (vietoje 4:4). Geno konversijos priežastys gali būti dvejopos: reparacija heteroduplekse arba dvigrandžio trūkio reparacija (5 pav.).

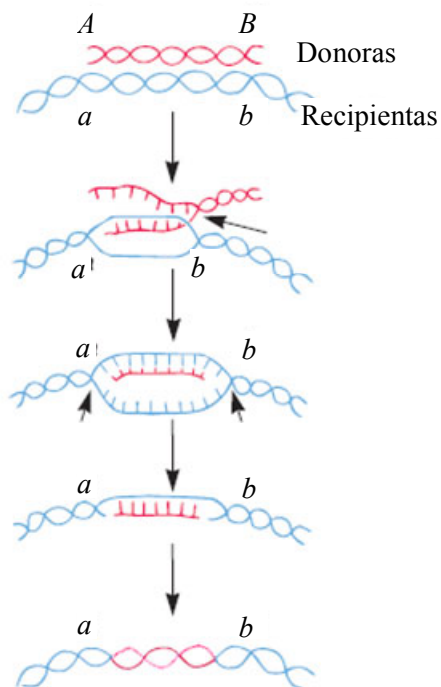


4 pav. Mejozinis krosingoveris – reciprokinės rekombinacijos pavyzdys. Jo metu tarp homologi- nių chromosomų vyksta simetriški genetiniai mainai (pagal Watson ir kt., 2004)



5 pav. Heteroduplekso reparacijos pasekmės: a) skirtingos kilmės hibridinės DNR fragmentai, susidarę rekombinacijos metu; b) heteroduplekso reparacija, kurios metu vyksta geno konversija. Nesuporuoti nukleotidai heteroduplekse ištaisomi pagal recesyvinio alelio DNR seką. Dėl šios priežasties dominuojantis alelis E (E') virsta recesyviu e (e'); c) heterodupleksas ištaisomas pagal originalią DNR seką ir geno konversija nevyksta. obiweb.bcgsc.ca/medgen/medgen520/Block6.htm

Nereciprokinė rekombinacija taip pat vyksta transformacijos, transdukcijos ir konjugacijos metu (6 pav.). Šiuo atveju, vykstant mainams, recipiento DNR fragmentas sunyksta ir išlieka tik iš donoro gauti aleliai.



6 pav. Nereciprokinė rekombinacija, vykstanti bakterijų transformacijos, transdukcijos ar konjugacijos metu (rodyklėmis pažymėtos endonukleazių veikimo vietos)

Be minėtų rekombinacijos tipų dažnai išskiriama dar viena homologinės rekombinacijos reiškinų grupė, kuri vadinama ektopine rekombinacija. Tai mainai tarp pasikartojančių genų ar pasikartojančių sekų, dažnai esančių nealelinėse padėtyse.

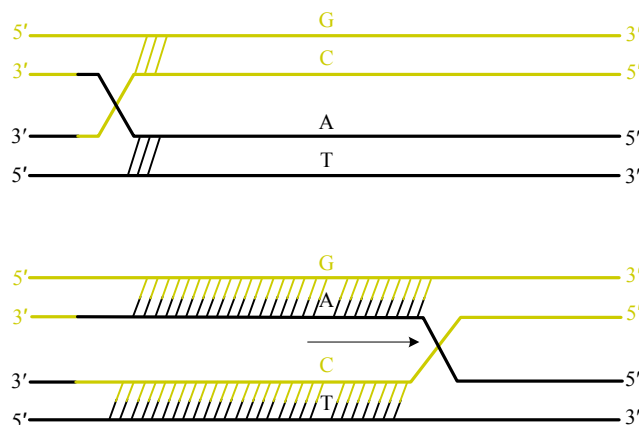
2. Homologinė rekombinacija

Morganas (T. H. Morgan), tyrinėdamas vaisines mušes, vienas pirmųjų susidomėjo homologinės rekombinacijos reiškiniu – krosingoveriu (angl. *crossing-over*). Bandydamas paaiškinti jo mechanizmą, Morganas iškėlė hipotezę, kad mejozės metu, poruojantis homologinėms chromosomoms, įvyksta trūkiai ir jos apsieičia fragmentais. Taip susidaro nauji sukibusių genų alelių deriniai. Šį reiškinį Morganas ir jo mokiniai panaudojo genų padėčiai chromosomose nustatyti.

Nepaisant Morgano iškeltos ir vėlesnių hipotezių, rekombinacijos molekuliniai mechanizmai ilgą laiką buvo neaiškūs. Iki 1960 m. nebuvo žinoma, ar homologinė rekombinacija vyksta iš pradžių reduplikuojant dalį vienos chromosomos, o po to – dalį kitos, ar ji susijusi tik su chromosomų trūkiais ir nauju susidariusių galų sujungimu. Šiuos skirtingus požiūrius išreiškė „matricų kaitos” ir „trūkio-susijungimo” hipotezės (Leach, 1996). Kad rekombinacija gali būti susijusi su chromosomos trūkiu, pirmieji nustatė Mezelsonas (M. Meselson), Weigfe ir Kellenbergeris (G. Kellenberger), tirdami fago λ rekombinaciją. Vėliau M. Mezelsonas ir Sthalis (F. Sthal) įrodė, kad homologinė rekombinacija gali vykti be žymesnės DNR replikacijos.

Vis dėlto vienareikšmiškai atsakyti į šį klausimą nepavyko iki šiol. Dabar yra žinoma daugybė rekombinacijos sistemų ir rekombinacijos tarpiniai produktai gali būti subrandinami labai įvairiai. Tai priklauso nuo jų DNR struktūros ir dalyvaujančių fermentų. Pavyzdžiui, įrodyta, kad tam tikra dalis retrovirusų rekombinacijos įvykių visiškai atitinka „matricų kaitos” hipotezę.

Rekombinaciją galima sąlyginai skirstyti į tris stadijas: iniciaciją, reparaciją ir molekulių atskyrimą.



7 pav. Holidėjaus jungtis (HJ) ir jos migracija (rodyklė rodo HJ migracijos kryptį)

Iniciacijos metu suartinamos sąveikaujančios molekulės, palyginamas jų nukleotidų sekos panašumas. Kadangi homologinė rekombinacija labai tikslus procesas, tai ji gali prasidėti tik tarp identiškų sekų. Todėl homologija turi būti atpažįstama ir, jeigu ji yra pakankama, reakcija gali vykti toliau. Tada arba susidaro X pavidalo jungtis (-ys), dar vadinama Holidėjaus (Holliday) jungtimi (7 pav.), arba vyksta viengrandžių DNR molekulių galų sulipimas (X jungtis nesusidaro). Abiem atvejais

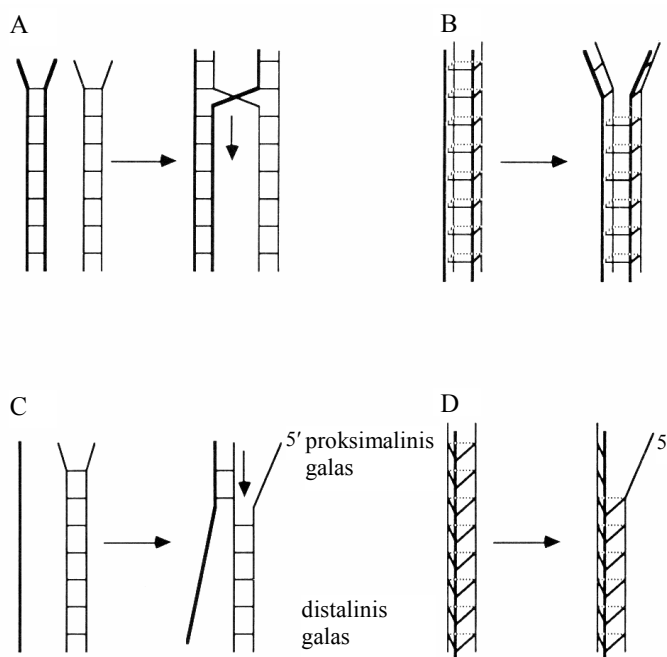
susidaro hibridinis DNR fragmentas, vadinamas heterodupleksu, kuris gali plėstis dėl Holidėjaus jungties migracijos.

Antrame etape atpažįstami netinkamai suporuoti nukleotidai bei pašalinimi susidarę plyšiai. Jeigu rekombinuojančios DNR molekulės neidentiškos, tai heteroduplekse esantys neteisingai suporuoti nukleotidai atpažįstami ir ištaisomi.

Paskutiniame etape grandinės gali būti atskiriamos labai įvairiai. Tai priklauso nuo susidariusių hibridinių molekulių tipo bei ląstelės fermentų. Reparacija nebūtinai turi vykti iki atskyrimo. Ji gali būti atliekama ir atsiskyrus chromosomoms.

2.1. Homologinės rekombinacijos modeliai

Atrodytų keista, kad praėjus daugiau kaip pusei amžiaus nuo to laiko (1953 m.), kai buvo iširta DNR sandara, iki šiol tiksliai nežinoma, kaip dvi sąveikaujančios molekulės atpažįsta, aptinka abipusę homologiją (Shibata ir kt., 2001; Sagi ir kt., 2006). Mokslinėje literatūroje yra du šio reiškinio aiškinimai. Pirmąjį dar 1964 m. pasiūlė Holidėjus (R.A.Holliday). Anot jo, baltymai, atpažįstantys homologiją, iš pradžių išvynioja nedideles sąveikaujančių DNR molekulių spiralių dalis, o po to padeda susidaryti Vatsono-Kriko (Watson-Crick) vandenilinėms jungtims tarp grandinių iš skirtingų DNR molekulių (8 A, C pav.). Toks aiškinimas vadinamas „grandinės atsiskyrimu prieš susijungimą“.



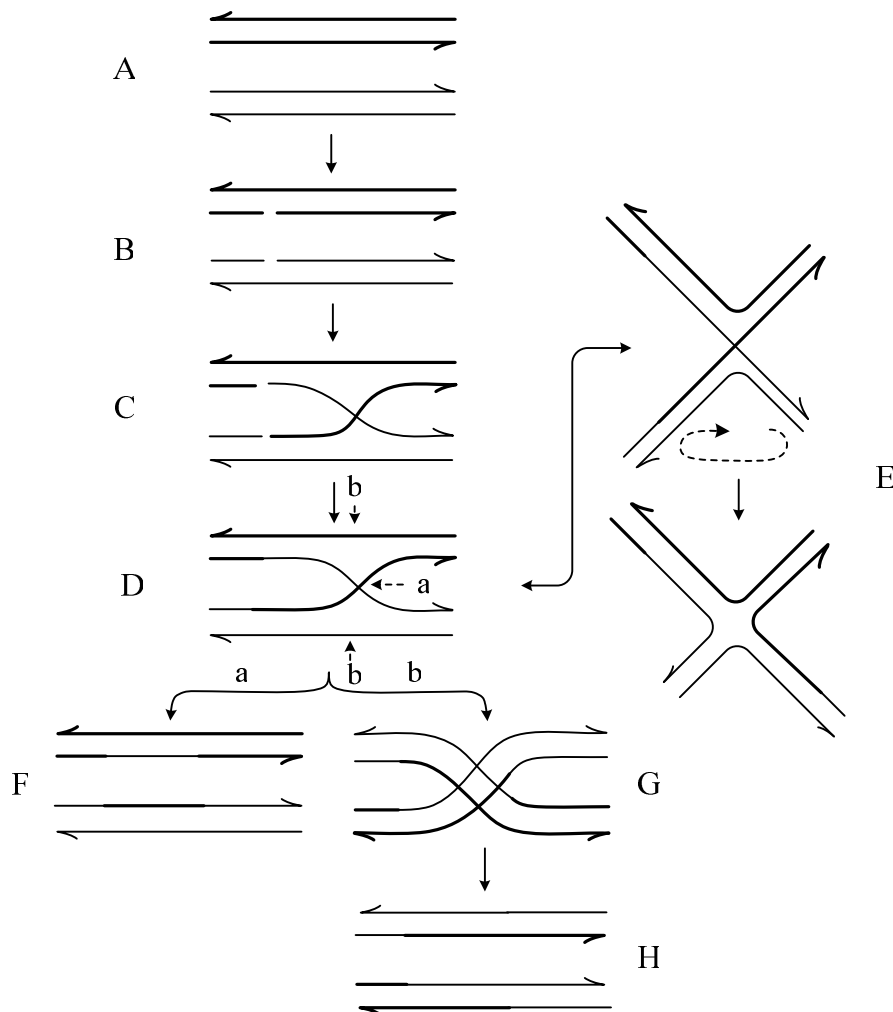
8 pav. Hipotetiniai alternatyvūs dviejų homologiškų dgDNR (A, B) bei vgDNR ir dgDNR (C, D) molekulių poravimosi ir apsikeitimo grandinėmis būdai (Stasiak, 1992)

Antrasis aiškinimas gali būti pavadintas „susijungimu prieš grandinių atsiskyrimą“, kuris teigia, kad tarp dviejų DNR dupleksų arba duplekso ir viengrandės DNR homologiškų sekų susidaro papildomos vandenilinės jungtys. Baltymai šiuo atveju turėtų padėti tokių keturgrandžių ar trigrandžių struktūrų susidarymui, o po to atskirti šias sekas (8 B, D pav.). Taip susidarytų DNR dupleksai,

apsikeitę segmentais. Šį modelį 1977 m. pasiūlė S. McGavin, remdamasis teorinėmis prielaidomis (McGavin 1977).

Homologijos atpažinimas iki šiol nepakankamai ištirtas, vis dėlto eksperimentiniai duomenys rodo aktyvų RecA/Rad51 šeimos baltymų vaidmenį šiame procese (Kurumizaka ir kt., 2000; Shibata ir kt., 2001). Nustatyta, kad RecA per 15 min. gali aptikti mainams tinkamą homologišką DNR esant 2×10^5 heterologinės DNR pertekliui (Bazemore ir kt., 1997).

Holidėjaus modelis. Šis, jau standartiniu tapęs modelis (9 pav.), buvo sukurtas 1964 m. Modelį sukūrė R.A. Holidėjus, aiškindamas, kaip vyksta homologinė rekombinacija *E. coli* ląstelėse.



9 pav. Holidėjaus homologinės rekombinacijos modelis (paaiškinimas tekste)

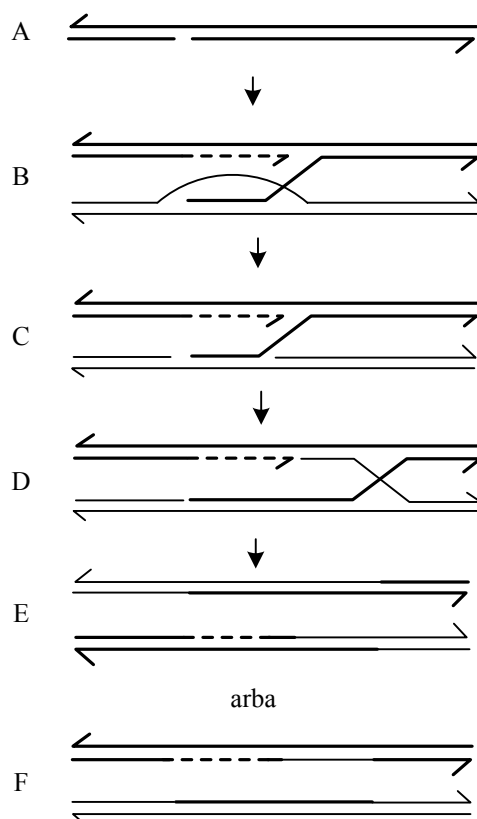
Remiantis šiuo modeliu, išskiriamos trys pagrindinės homologinės rekombinacijos ypatybės:

- mainus sukelia simetriški homologinių grandinių trūkiai (B);
- simetriški grandinių mainai nulemia heterodupleksų susidarymą (C);
- dėl mainų susidariusi X tipo Holidėjaus jungtis (C, D) yra sukarpoma dvejopai (D), todėl susidaro dviejų rūšių rekombinaciniai palikuonys. Vieni vadinami „sulopytais“ (F), kiti – „sujungtais“ (H). Pirmuoju atveju įvyksta apsikeitimas vidinėje dalyje esančiais fragmentais (geno konversija), antruoju – mainai flanginiais segmentais (krosingoveris). Kad grandinių mainai vyktų krosingoverio būdu, reikalingas DNR molekulių erdvinis persigrupavimas,

vadinamas izomerizacija (G, E). Šis modelis gali paaiškinti daug genetinės rekombinacijos reiškinių, tarp jų ir geno konversiją.

Vėliau buvo sukurta keletas kitų modelių, vienaip ar kitaip interpretuojančių eksperimentų rezultatus, nepaaiškinamus standartiniu modeliu.

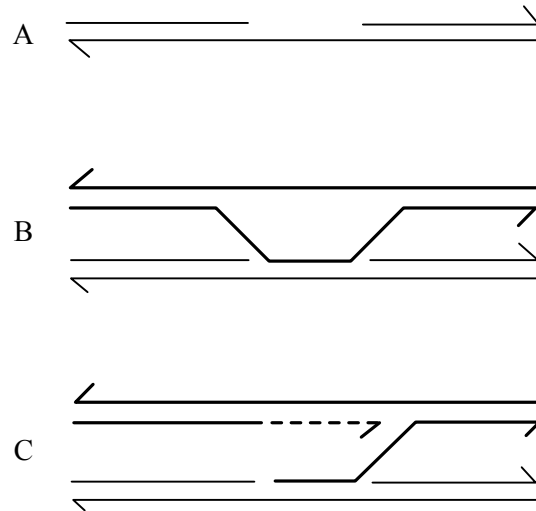
Mezelsono ir Radingo modelis. Holidėjaus modelio trūkumas buvo simetriškų trūkių susidarymas. Todėl 1975 m. Mezelsonas (M. Meselson) ir Radingas (C.M. Radding) sukūrė modelį, aiškinantį kaip grandinių mainai gali prasidėti dėl vieno viengrandžio trūkio DNR molekulėje (10 pav.). Pagal šį teigimą, prie atsiradusio trūkio (A) 3'galo gali prisitvirtinti DNR polimerazė ir pradėti DNR sintezę (B). Taip viengrandis DNR molekulės galas yra išstumiamas iš duplekso. Jis gali būti įterpiamas į homologišką intaktišką DNR ir sukelti D kilpos susidarymą. Ši kilpa gali būti endonukleazių įkerpama ir egzonukleazių suskaldoma. Susidaro asimetrinis heterodupleksas (C). Polimerazė gali būti prarasta ir vykti struktūros izomerizacija susidarant Holidėjaus jungčiai (D). Jungtis gali migruoti, jeigu yra homologija, po to gali būti endonukleazių suskaldyta. Priklausomai nuo kirpimo vietos, susidarys krossoveriniai ar nekrossoveriniai rekombinacijos produktai (E, F). Kaip ir Holidėjaus modelyje, šiuo atveju taip pat gali vykti netaisyklingai suporuotų nukleotidų korekcija heteroduplekse, sukelianti genų konversiją.



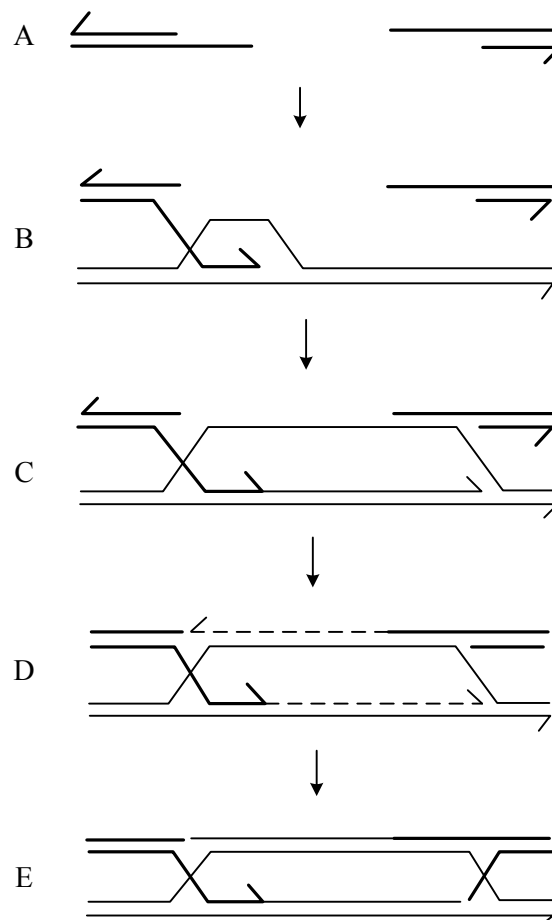
10 pav. Mezelsono ir Radingo (1975) homologinės rekombinacijos modelis

Trūkis gali atsirasti dėl nukleazių, topoizomerazių ar kitų baltymų poveikio, gali būti ir žalingų aplinkos veiksnių padarinys. Šiame modelyje pagrindinis prieštaravimas buvo tai, kad inicijuojanti molekulė tampa genetinės informacijos donoru. Tačiau eksperimentinių tyrimų rezultatai rodo, kad ji

turėtų būti recipientu. Šią problemą išsprendžia Radingo 1982 m. pasiūlytas modelis, kuris remiasi *E. coli* RecA baltymo katalizuojama reakcija *in vitro*. Dėl baltymo rekombinaciją pradėjusi molekulė veikia kaip recipientas (11 pav.). Tokia molekulė turi viengrandį tarpą (A), kuris, esant RecA, sąveikauja su homologine molekule ir susidaro D kilpa (B). Tokia kilpa sukarpoma ir susidaręs 3'galas tampa pradmeniu DNR sintezei (C). Toliau viskas vyksta kaip ir ankstesniame modelyje.



11 pav. Radingo pasiūlytas homologinės rekombinacijos modelio variantas (Radding, 1982)



12 pav. Dvigrandžių trūkių reparacijos modelis pagal Szostaką

Rekombinacijos, kurią sukelia dvigrandžiai trūkiai, modelis. 1976 m. jį sukūrė Resnikas (M.A. Resnick), o toliau tobulino Szostakas (J. Szostak) ir kt. (1983 m.). Panagrinėkime vieną šio

modelio versijų (12 pav.). Dėl dvigrandžio trūkio susidarę laisvi galai yra subrandinami egzozonukleazių, skaldančių vieną iš DNR duplekso grandinių (A). Susidaręs viengrandis galas įterpiamas į homologišką dgDNR ir susidaro D kilpa (B). Įterpimą gali atlikti RecA ir į juos panašūs baltymai. DNR sintezė nuo 3'galo išstums iš dgDNR vieną grandinę, su kuria gali sąveikauti (esant homologijai) viengrandis 3'galas iš kitos dvigrandžio trūkio pusės (C). Nuo šio galo taip pat gali prasidėti DNR sintezė. Vykstant šiai sintezei plyšys užpildomas informacija, esančia homologinėje grandinėje (D). Tuo metu susidaro dviguba Holidėjaus jungtis, kuri vėliau gali būti nukleazių suskaldoma (E).

2.2. Prokariotų homologinė rekombinacija

2.2.1. Rekombinacijos kelio sąvoka

Genetiniai tyrimai parodė, kad *E. coli* laukinio tipo kamieno rekombinacijai vykti reikalingi RecA, RecBCD, SSB, DNA polimerazė I, DNR girazė ir DNR ligazė. Tačiau mutantų ir supresorių analizė atskleidė dar visą grupę papildomų homologinės rekombinacijos sistemos baltymų. Be to, vieno ar kito baltymo poreikį nulėmė pats substratas, t. y. rekombinuojamosios DNR molekulės. Tiriant *E. coli* mutantus, kuriuose pažeistas rekombinacijos procesas, pavyko atrasti mutacijas, kurios atkurdavo HR dažnį beveik iki normalaus lygio. Remiantis tuo galima daryti išvadą, kad bakterijoje egzistuoja keletas rekombinacijos kelių. Rekombinacijos kelias – tai seka įvykių, kurių metu DNR molekulės sąveikauja tarpusavyje iki galutinių produktų (hibridinių DNR molekulių) susidarymo dalyvaujant HR sistemos baltymams. Šį vyksmą katalizuojančius baltymus koduoja ląstelės HR sistemos genai. Rekombinacijos kelio sąvoką 1973 m. pasiūlė Klarkas (A. Clark). *E. coli* yra žinomi trys rekombinacijos keliai: RecBCD, RecE ir RecF. Mutantų tyrimai parodė, kad kai kurie baltymai veikia daugiau nei viename kelyje. Pavyzdžiui, RecA baltymas reikalingas visais atvejais, išskyrus nuo RecE priklausomą plazmidžių rekombinaciją.

RecBCD kelias yra pagrindinis laukinio tipo ląstelėse. Jis įjungiamas, kai ląstelėje atsirada DNR, turinti dvigrandžius trūkius (DGT). DGT bakterijų ląstelėse gali susidaryti dėl mutagenų (pavyzdžiui, dėl jonizuojamosios spinduliuotės), dėl replikacijos proceso sutrikimų, o taip pat vykstant bakterijų lytiniam procesui (konjugacijai, transdukcijai). *E. coli* laukinio tipo ląstelėse RecBCD keliu vyksta 99 proc. visų rekombinacijos įvykių transdukcijos ir konjugacijos metu. Šio kelio svarbiausi komponentai yra RecA, RecBCD, SSB, RuvA, RuvB, RuvC ir (ar) RecG baltymai bei ypatinga DNR seka, vadinama χ (chi, angl. *crossover hotspot instigator*).

RecF rekombinacijos kelias buvo aptiktas mutantiniuose kamienuose, į kuriuos buvo įterptos supresorinės mutacijos *sbcB/CD*. Rekombinaciją šiuo keliu dažniausiai sukelia DNR molekulėse atsiradę viengrandžiai tarpai. Jie gali susidaryti dėl DNR replikacijos sutrikimų, kuriuos sukelia mutagenai. RecF kelias gali būti panaudotas ir DGT pašalinti. Jis priklauso nuo rekombinacijos genų *rec A, recF, recJ, recN, recO, recQ, recR, ruvABC* (arba *RecG*) ir *ssb*.

RecE kelias aptiktas mutantiniuose kamieniuose, turinčiuose *sbcA* mutaciją. Konjugacinei rekombinacijai vykti šiuo keliu reikalingi beveik visi baltymai, dalyvaujantys RecF kelyje, tačiau plazmidžių rekombinacijai pakanka RecE ir RecT baltymų. Manoma, kad šis rekombinacijos kelias atsirado iš kriptinio profago rekombinacijos sistemos.

2.2.2. Homologinės rekombinacijos baltymai *E. coli* ląstelėse

Geriausiai iširta HR sistema yra *E. coli* ląstelėse. 1965 m. Klarkas (J. Clark) ir Margulis (A. Margulies) pranešė gavę pirmuosius *E. coli* mutantus, kuriuose pažeista homologinė rekombinacija. *E. coli* F⁻ recipientinis kamienas buvo paveiktas cheminiu mutagenu. Kryžminant tokį mutantą su Hfr donoru, beveik nesusidarydavo rekombinantai. Ši mutacija buvo kartografiuota lokuse, pavadintame *recA*, atitinkančiame maždaug 58-ą genolapio minutę. Jo koduojamas baltymas pavadintas RecA. Nuo tada prasidėjo homologinę rekombinaciją valdančių genų tyrimai. 1979 m. *recA* genas buvo klonuotas. Mutagenezės būdu nustatyta ne mažiau 25 *E. coli* genų, kurių produktai veikia įvairiuose homologinės rekombinacijos etapuose (Kowalczykowski ir kt., 1994).

2.2.2.1. RecA baltymas

2.2.2.1.1. RecA baltymo biologinės funkcijos

1. **Rekombinacijoje ir reparacijoje.** Geno *recA* mutacijos yra pleotropinės: 5×10^4 kartų sumažėjęs rekombinacijos dažnis, padidėjęs mutantų jautrumas UV, X spinduliams bei cheminiams mutagenams, sulėtėjęs augimas, pastarąjį nulemia didelis negyvų ląstelių skaičius. Kartais jų kiekis laboratorinėse *recA* mutantų kultūrose siekia 50 proc. Be didelių konjugacijos sutrikimų, *recA* mutantuose stipriai pažeista bendroji ir specifinė transdukcija bei *redgam* genotipo fago λ gyvenimo ciklas. Genetiniai tyrimai parodė, kad spinduliuotės sukelti pažeidimai blokuoja DNR replikaciją. Šios pažaidos nemaža dalimi yra ištaisomos homologinės rekombinacijos būdu padedant RecA baltymui. Nustatyta, kad *recAuvrA* dvigubi mutantai jautresni UV nei pavienių genų mutantai. Tai atsitinka todėl, kad RecA tiesiogiai dalyvauja pašalinant UV indukuotus aduktus. Nustatyta, kad RecA taip pat tiesiogiai veikia DNR skersinių ryšių reparacijoje (Sladek ir kt., 1989).

2. **SOS indukcijoje.** Be tiesioginio dalyvavimo reparacijoje, RecA koordinuoja ląstelės atsaką į DNR pažaidas ir per SOS sistemą. Atsiradus DNR pažaidoms ląstelėje (pvz., po apšvitos UV), RecA aktyvuojamas. Manoma, kad RecA aktyvuoja kai kurios vgDNR formos, kurios susidaro ląstelėje dėl spinduliuotės poveikio. Prisijungęs prie vgDNR, RecA tampa aktyvus ir paveikia su juo sąveikaujantį LexA baltymą. Dėl sąveikos pakinta LexA erdvinė struktūra ir pasireiškia jo autoproteazinis aktyvumas. LexA suskyla į dvi dalis. Kadangi LexA yra represorius, tai jam suskilus, derepresuojama transkripcija kelių dešimčių genų, sudarančių SOS reguloną (Kuzminov, 1999). Į šį reguloną įeina svarbūs reparacijos ir rekombinacijos eigą kontroliuojantys genai: *recA*, *recN*, *recQ*, *ruvA*, *ruvB*, *lexA*, *uvrA*, *B*, *D*, *umuC*, *umuD*. SOS atsakas nėra desperatiškas bandymas išgyventi, kaip galėtų atrodyti iš

pavadinimo, o įprasta ir logiška ląstelės reakcija į DNR sintezės slopinimą. Priklausomai nuo raiškos pobūdžio ir įjungimo sąlygų, SOS regulono genų galima suskirstyti į tris grupes. Pirmai grupei priklauso genai *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* ir *polB*, kuris atsakingas už viengrandžių trūkių šalinimą arba tolerantiškumą pažaidoms. Taip pat indukuojama ir LexA represoriaus gamyba. Šių genų raiška padidėja apie 10 kartų, palyginti su normaliu lygiu. Jeigu jų raiška nepadeda atkurti normalų DNR sintezės lygį, įtraukiami antros grupės genai *recA* ir *recN*, kurie vykdo rekombinacinę reparaciją. Jų raiška, palyginti su norma, padidėja 20–50 kartų. Jeigu DNR pažaidos labai didelės ir negali būti pašalinamos rekombinacinės reparacijos būdu, tai DNR sintezei atkurti įtraukiama trečia genų grupė (*sfiA*, *umuDC*). Kadangi įprastomis sąlygomis šių genų raiška labai nedidelė, tai SOS atsako metu ji gali padidėti daugiau kaip 100 kartų. *UmuDC* operono veikla slopina rekombinacinę reparaciją ir daro įmanomą DNR sintezę per pažaidas. Sfi baltymas slopina ląstelės dalijimąsi tam tikrą laiką. Kai DNR sintezė atnaujinama, šios trys genų grupės išjungiamos, tikriausia, atvirkštine tvarka. Jeigu ląstelė negeba ištaisyti pažaidas, ji žūva.

3. SOS mutagenezėje. Nors replikacija per pažaidas didina išgyvenimo galimybę, tačiau dažnai ji yra mutacijų priežastis. Mutacijų atsiranda todėl, kad slopinamas DNR polimerazių darbo tikslumas. Šio tipo DNR replikacija vis dėlto padeda išgyventi, nes klaidų dažnis nesiekia 100 proc., be to, daugelis mutacijų iš esmės neutralios. Nors RecA vaidmuo dar nepakankami ištirtas, tačiau jis nekelia abejonių. Replikacijos per pažaidas metu susidaro baltymų kompleksas – mutasoma. DNR polimerazė III, susidūrusi su pažaida (pavyzdžiui, 5' TC 3' pirimidinų dimeru), atnaujiną replikaciją tik tam tikru atstumu (apie 1 kbp) žemiau jos. RecA baltymas aktyviai jungiasi prie tokio vgdNR tarpo, sudarydamas nukleoproteininį filamentą. Represorius LexA atpažįsta šį darinį, kaip aplinkos streso signalą, ir jungiasi prie jo. Tokia baltymų sąveika sukelia LexA autoproteolizę ir represoriaus funkcijos praradimą. Taip pat indukuojama UmuD baltymo sintezė. UmuD jungiasi su RecA filamentu bei panašiai kaip LexA vykdo autoproteolizę. Susidaro mutageniška aktyvūs UmuD₂ dariniai, kurie sąveikauja su UmuC, sudarydami UmuD₂C kompleksą. Jis jungiasi prie įvairių RecA nukleoproteininio filamento vietų. Šie UmuD₂C–RecA baltymai kartu su DNR polimeraze III sudaro mutasomą, kurioje slopinamas DNR polimerazės 3'→5' korekcinis aktyvumas (Lawrence ir Woodgate, 1999). Taigi RecA kartu su kitais baltymais sudaro sąlygas vyksti replikacijai per pažaidas.

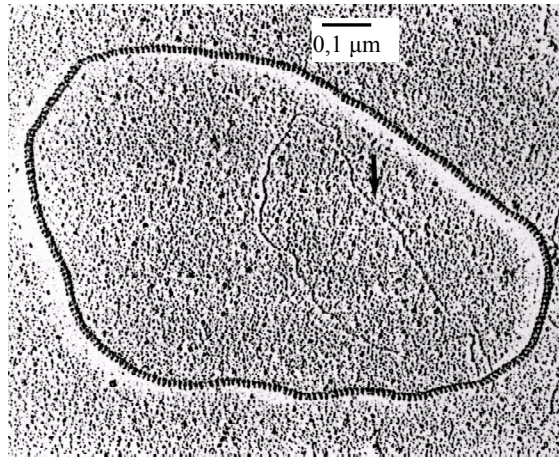
4. Nuo rekombinacijos priklausomoje replikacijoje. Ilgai vyravo nuomonė, kad nuo *oriC* prasiidėjusi *E. coli* chromosomos replikacija, kurią vykdo DNR polimerazės III, pasibaigia terminacijos taške (Kuzminov, 1999). Tačiau vėlesni tyrimai parodė, kad replikacijos šakutė gali užstrigti ir baltymai gali atsiskirti nuo DNR dar nepasibaigus replikacijai. Jeigu replikacijos nepavyktų atnaujinti, viena iš dukterinių ląstelių žūtų. Manoma, kad apie 15–20 proc. replikacinių šakutėlių susiduria su panašiais sunkumais. Be to, eksperimentais įrodyta, kad *E. coli* ląstelės, neturinčios *ori* funkcijos, beveik normaliai dauginasi. To priežastis – indukuota pastovi DNR replikacija (angl. *induced-stable DNA replication*). Jai vyksti reikalingi RecA, RecBCD, Pri baltymai bei chi sekos. Dėl RecA baltymo susidaro D

kilpos, o įterptos vgDNR 3' galas yra potencialus pradmuo DNR replikacijai. Panašią funkciją gali atlikti ir R-kilpos, kurios susidaro, kai į dgDNR įterpiamas RNR molekulės galas. Nuo jo prasidėjusi DNR sintezė vadinama konstitutyviaja DNR replikacija (angl. *constitutive-stable DNA replication*). R kilpai susidaryti reikalingi RecA ir Pri helikazė. Abu replikacijos procesai pavadinti bendru vardu – nuo rekombinacijos priklausoma replikacija. Kai kurie mokslininkai mano, kad būtent dėl šio proceso sutrikimo žūva didelis *recA*⁻ ar *recB*⁻*recC*⁻ mutantų ląstelių skaičius.

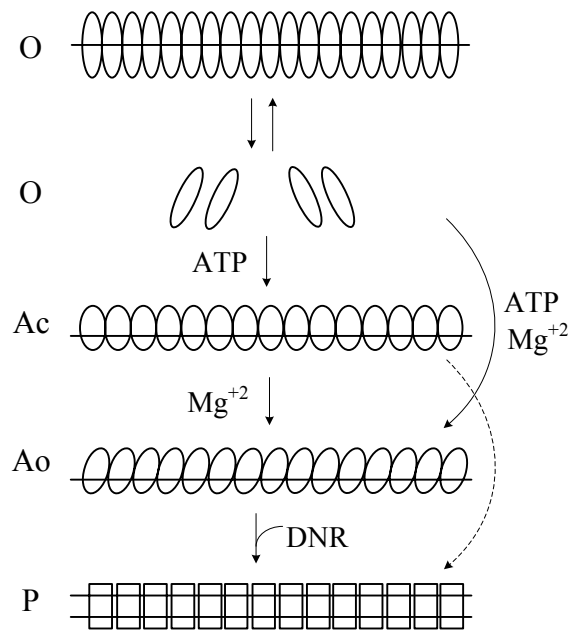
2.2.2.1.2. RecA biocheminės savybės

1981 m. keliose laboratorijose pradėtos tirti biocheminės RecA savybės. Nustatyta, kad RecA molekulinė masė yra 37842 Da. Jį sudaro 352 aminorūgštys. Normaliomis sąlygomis *E. coli* ląstelėse yra 8000 – 10000 šio baltymo molekulių. SOS atsako metu jų skaičius padidėja iki 70000 (Cox 2003). Jis aptinkamas beveik visose bakterijose išskyrus kai kurias endosimbiontines. Iki šiol sukurti mažiausiai keturi RecA kristalinės sandaros vaizdai. Du iš jų sukurti *E. coli* ir du *Mycobacterium tuberculosis* RecA baltymams. Šie vaizdai beveik vienodi. Baltyme išskiriami trys domenai. Didžiausias – centrinis šerdinis ir du mažesni – amino (N) ir karboksilinio (C) galų. Šerdiniame domene (34 – 269 aminorūgščių liekanos) RecA panašus į helikazes ir kai kuriuos kitus baltymus. Tai pati konservatyviausia baltymo dalis, kuri labai panaši visose bakterijose. Konservatyvumas išlieka ir eukariotų RecA homologueose. 47-74 aminorūgštys svarbios ATP prisijungimui ir hidrolizei. Šioje vietoje esanti GPESGKT seka atitinka Walker A sekos motyvą (G/A)XXXXGK(T/S), kuris būdingas daugeliui NTP prisijungiančių baltymų. RecA Lys72Arg mutantinis baltymas neturi ATPazės aktyvumo. C galo domenai (270–352 aminorūgštys) mažai konservatyvūs net bakterijų RecA baltymuose.

Baltymas geba polimerizuotis ant vgDNR ir dgDNR molekulių, sudarydamas spiralinius nukleoproteininis filamentus. Prie vgDNR jis jungiasi žymiai sparčiau. Šioje struktūroje ir vyksta DNR molekulių poravimasis bei grandinių mainai. Filamentai yra taisyklingos sandaros, RecA baltymo monomerai yra išsidėstę greta vienas kito. Elektroniniu mikroskopu nustatytas tikslesnis baltymo ir DNR sąveikos vaizdas (13 pav.). Egzistuoja bent dvi aktyvaus (su ATP susijungusio) presinapsinio RecA nukleoproteininio filamento ant vgDNR būsenos. Jas stipriai veikia Mg²⁺ jonai ir kai kurie kiti veiksniai, esantys reakcijos mišinyje. Kai Mg²⁺ trūksta, vgDNR ir RecA sąveika būna ribota (14 pav.). Ši RecA būseną vadinama Ac (nuo angl. *closed* – uždaras). Kai Mg²⁺ yra perteklius (6–8 mM), palyginti su ATP, RecA pereina į Ao būseną, kuri palanki mainams.



13 pav. Spiralinis RecA baltymo filamentas ant vgDNR *in vitro* (rodykle parodyta DNR molekulė be baltymo. Nuotrauka padaryta elektroniniu mikroskopu, pagal Stasiak ir DiCapua, 1982)



14 pav. Numanomos RecA funkcinės būsenos (pagal Cox 2003). Kai nėra ATP, baltymas neaktyvus ir yra O būsenoje. Į A būseną baltymas pereina, kai, esant ATP ar dATP, prisijungia prie vgDNR. Esant mažoms magnio koncentracijoms, RecA yra santykinai uždaras (Ac) pradėti poravimą ir grandinių mainus. Kai yra magnio perteklius, palyginti su reikalingu prisijungti ATP, tai RecA pereina į atvirą mainams būseną. P būseną atsiranda, kai baltymas sąveikauja su dgDNR

Toks perėjimas iš Ac į Ao būseną tiesiogiai susijęs su Mg^{2+} ir RecA baltymo C galo aminorūgščių sąveika. Jeigu nuo RecA C galo pašalinama 17 aminorūgščių, tai išnyksta Mg^{2+} pertekliaus poreikis DNR mainų reakcijai. RecA Δ C17 mutante vyksta intensyvūs mainai ir be Mg^{2+} pertekliaus. RecA poravimasis su dgDNR perjungia baltymą į P būseną, kurioje jis hidrolizuoja ATP apie 30 proc. mažiau nei susijungęs su vgDNR. Nukleoproteininiame filamente esanti vgDNR yra 1,5 karto ištempta, palyginti su normaliu B formos DNR molekulės ilgiu. Tokia ištempta jos būseną yra palanki homologijos paieškai ir grandinių apsikeitimui. Ją stabilizuoja sąveikos tarp deoksiribozių ir azotinių bazių. DgDNR po to patenka į nukleoproteininį filamentą ir susidaro trijų narių (vgDNR, dgDNR ir RecA) kompleksas. Šiame komplekse RecA ieško homologijos tarp vgDNR ir dgDNR (Kurumizaka ir kt., 2001). Šios sąveikos metu dgDNR dalinai išvyniojama nenutraukiant bazių porų. Tai, matyt, yra svarbu homologijos

paieškai. Manoma, kad ištesta vgDNR būsena leidžia bazėms sukintis horizontalioje plokštumoje. Todėl, aiškinant homologijos atpažinimą, siūlomas bazių porų kaitos modelis (angl. *base pairs switching model*). Pagal jį trijų narių komplekse tiek vgDNR, tiek dgDNR yra ištestos 1,5 karto. Šiuo atveju homologijos paieška čia vyksta sukantis bazėms. Taip gali susidaryti naujos Watson-Crick poros tarp vgDNR ir dgDNR. Šis modelis buvo eksperimentiškai tikrinamas panaudojant RecA mutantus, kuriuose pažeistas homologijos atpažinimas. Gauti mutantai RecAR243Q ir RecAK286N, kurie negalėjo vykdyti mainų tarp vgDNR ir dgDNR. Šiuose baltymuose įvykusios aminorūgščių pakaitos: Arg243→Gln ir Lys286→Asn. Nors jie sudarydavo normalius nukleoproteininius filamentus su vgDNR, tačiau, matyt, „neatpažino“ homologijos tarp vgDNR ir dgDNR. Lys-286 yra baltymo C gale, o Arg-243 netoli šio domeno. Ištyrus C domeno struktūrą tirpale, branduolių magnetiniu rezonanso tyrimu nustatyta, kad ši baltymo dalis prisijungusi prie dgDNR. K286N mutacija slopina baltymo gebėjimą išvynioti DNR. Tai rodo, kad homologijos atpažinimui tarp minėtų DNR molekulių reikalingas dalinis dgDNR išvyniojimas molekulių poravimosi metu.

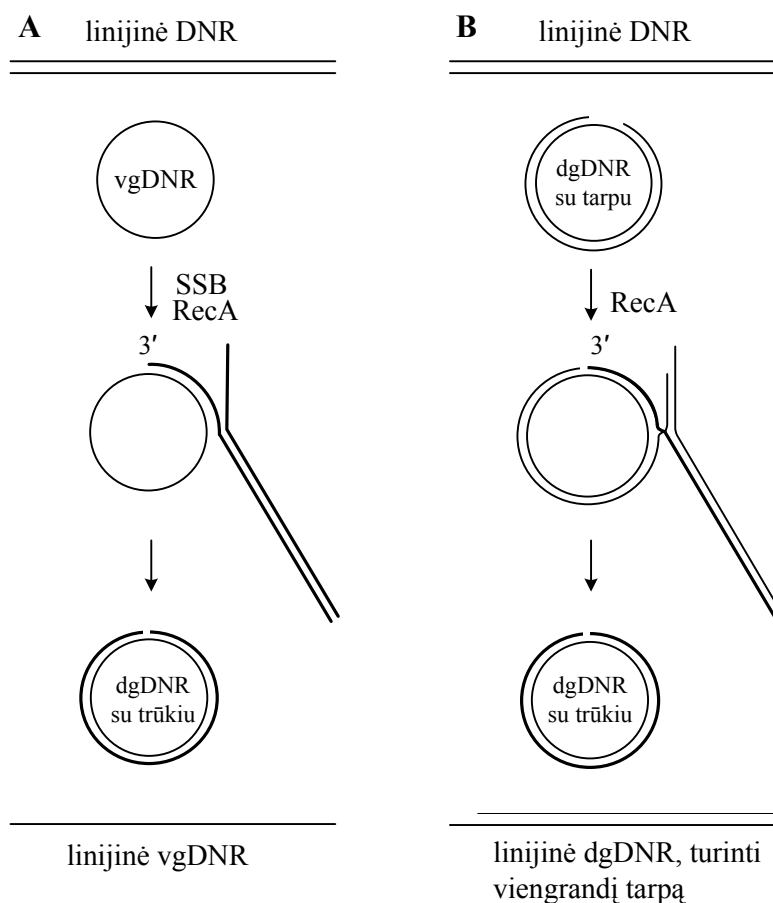
RecA baltymas yra nuo DNR priklausoma ATPazė, tačiau DNR molekulių poravimuisi ir genetiniams mainams nebūtina ATP hidrolizė. RecA katalizuojami mainai ir be ATP hidrolizės gali siekti tūkstančius bazių porų (Cox 2003). Tai jis gali atlikti dėl savo, kaip motorinio baltymo, savybių. RecA gali hidrolizuoti įvairius dNTP ir rNTP. Tačiau tik ATP ir dATP tarnauja kaip kofaktoriai mainų reakcijoje. ATP skaldymas leidžia baltymui vykdyti mainus tarp DNR molekulių, kurios turi didesnes heterologines sritis. dATP skatina kai kurias RecA katalizuojamas reakcijas, didina nukleoproteininio filamento stabilumą bei DNR mainų greitį (Menetski ir Kowalczykowski, 1989). Kadangi RecA baltymas vykdo grandinių mainus, o jų metu sunaudojamas ATP, tai iš pradžių padaryta išvada, kad ATP hidrolizės energija būtina mainams. Tačiau dabar aišku, kad abi reakcijos nėra tiesiogiai susijusios. Tai įrodyta panaudojant ir mutantinius RecA. Buvo gautas RecA baltymas – RecAK72R, kuris jungiasi su ATP, bet jo nehidrolizuoja. Toks pakitęs RecA taip pat gali vykdyti mainus.

Grandinių mainams, kuriuos vykdo RecA, tirti dažniausiai naudojama sistema, sudaryta iš žiedinės viengrandės ir linijinės dvigrandės DNR molekulių (15 A pav.).

RecA vykdomą grandinių mainų reakciją šioje sistemoje galima suskirstyti į keletą etapų:

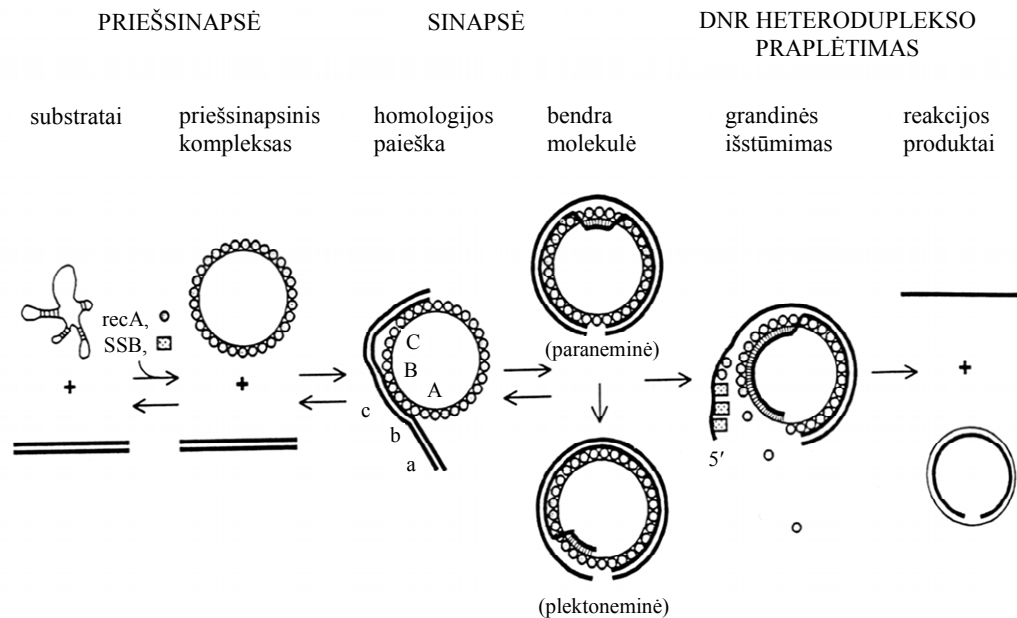
1. Stechiometrinis RecA baltymo jungimasis prie vgDNR. Susidaro nukleoproteininis kompleksas, kuriame vgDNR yra RecA filamento viduje. Prie vgDNR besijungiantis SSB baltymas palankiai veikia šią reakciją, nes pašalina antrines struktūras, kurios gali susidaryti šioje DNR (16 pav.). Filamente esanti vgDNR 50–60 proc. ilgesnė.
2. Nukleoproteininis filamentas sąveikauja su „nuoga“ dgDNR. Poravimasis pagal homologiją tikriausiai vyksta dėl daugkartinių atsitiktinių kontaktų. Manoma, kad šios sąveikaujančios DNR yra RecA susukamos tarpusavyje į trigrandę struktūrą. Toks grandinių poravimasis gali vykti didelėse srityse ir joms nereikia laisvų DNR molekulių galų (paraneminė jungtis). Jeigu tokie galai yra (plektoneminė jungtis) kaip nagrinėjamu atveju, reakcija pereina į kitą stadiją.

3. Vyksta grandinių mainai, susidaro heterodupleksas. Mainai vyksta gana lėtai (2-10 bp per sekundę) ir pasižymi poliškumu. Jis nustatomas vgDNR, ant kurios susidarė filamentas, atžvilgiu ir yra 5'→3' krypties. Mainai prasideda, kai dgDNR komplementarios grandinės 3'galas perkeliamas ant vgDNR (15 A pav.).



15 pav. DNR grandinių mainų reakcijos, vykdomos RecA, *in vitro*. Rekombinacijos reakcijos substratu dažniausiai yra bakteriofagų ϕ X174 ar M13 DNR molekulės (West,1992)

Reakcijai reikalingas ATP. Po mainų reakcijos susidaro dgDNR su trūkiu ir linijinė vgDNR molekulė. RecA pradeda ir baigia šią reakciją, būdamas ant vgDNR, o įvykus mainams, jis aptinkamas ant trūkį turinčios dgDNR. Kitas reakcijos produktas – linijinė vgDNR (išstumta iš DNR duplekso) jungiasi su RecA baltymu, esančiu tirpale. Tačiau grįžtamoji reakcija nevyksta, nes du nukleoproteininiai filamentai tarpusavyje nesąveikauja. Iki šiol neįrodyta, kad mainų reakcija vyksta tarp dviejų visiškai homologiškų DNR dupleksų. Tačiau RecA gali vykdyti mainus, jeigu viena iš dgDNR molekulių turi viengrandį tarpą (15 pav., B). Prie tokios dgDNR molekulės vietos RecA baltymas jungiasi labai efektyviai. Tarpo vietoje RecA, stochiometriškai prisijungęs prie viengrandės DNR duplekso srities, praplečia ją į dgDNR pusę.



16 pav. RecA atliekami DNR grandinių mainai. Pavaizduotas ant vgDNR susidaręs RecA filamentas bei jo sąveikos su linijine dgDNR būdai. SSB baltymas šioje reakcijoje reikalingas antrinėms DNR struktūroms ant vgDNR pašalinti (Kowalczykowski, 1991; Kowalczykowski ir Eggleston, 1994).

Mainai šioje sistemoje vyksta 3 bp/s greičiu 5'→3' kryptimi vgDNR, ant kurios susidarė filamentas, atžvilgiu. SSB baltymas antrinėms struktūroms pašalinti nebūtinai, jeigu tarpas neviršija 300 nukleotidų. Ši mainų reakcija nehomologinėms sritims yra jautresnė už anksčiau išnagrinėtą. Heterologinės kelių dešimčių bp ilgio sritys neturi didelės reikšmės mainams. Tačiau 120 bp tarpai ar delecijos labai slopina reakciją, galutinių jos produktų (dvigrandės žiedinės DNR su trūkiu bei linijinės dgDNR su viengrandžiu fragmentu) neaptinkama. O pirmoji reakcija vykdavo net tuomet, kai vgDNR esantis heterologinis tarpas būdavo 1000 nukleotidų ilgio.

2.2.2.1.3. Baltymai, giminiški RecA

Panašūs į RecA baltymai aptikti beveik visuose šiuo aspektu tirtuose prokariotuose (Cox 2003). Išimtį sudaro endosimbiozinių bakterijų gentis *Buchnera sp.* Šios bakterijos dėl savo gyvenimo būdo yra praradusios nemažą genomo dalį, kurioje yra *recA*, ir kai kurie kiti genomo stabilumą palaikantys genai. Visi iki šiol klonuoti eubakterijų *recA* genai gali komplementuoti $RecA^-$ fenotipą *E. coli* ląstelėse. Nustatyta ne mažiau kaip 60 RecA baltymų aminorūgščių sekų iš įvairių prokariotų. Krinta į akis didelis šių baltymų struktūrinis ir funkcinis konservatyvumas: 55–100 proc. juos sudarančių aminorūgščių yra vienodos. Ypač konservatyvi baltymo šerdinė sritis. Kai kurie RecA baltymai skiriasi savo karboksiliniu galu.

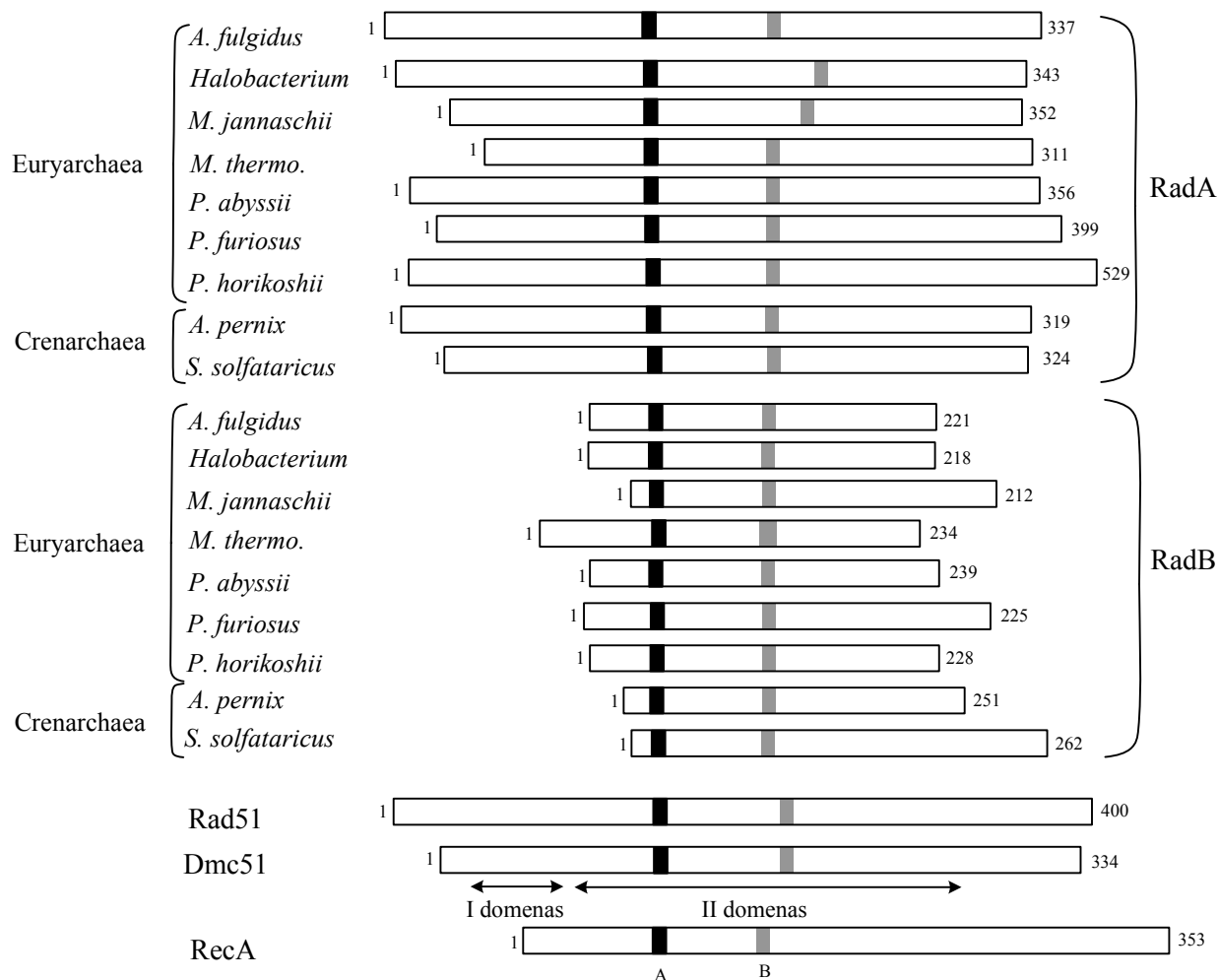
Trumpai galima paminėti keletą į RecA panašių ir grandinių mainus vykdančių prokariotų baltymų.

RecA iš *Proteus mirabilis*. Šio baltymo panašumas į *E. coli* RecA siekia 73 proc. Jis gali komplementuoti *recA* geno mutaciją ir turi visas *E. coli* baltymui būdingas savybes.

***Bacillus subtilis* RecA (RecE).** Koduojantis genas anksčiau vadintas *recE*. 60 proc. panašumas į *E. coli* RecA.

Bakteriofago T4 UvsX baltymas. Jį koduoja *UvsX* genas. Labai skiriasi nuo visų šio tipo prokariotų baltymų. Panašumas į RecA – tik 23 proc. Šis baltymas yra nuo vgDNR priklausoma NTP-tazė, vykdo DNR renatūraciją ir DNR grandinių mainus. ATP-tazinis aktyvumas specifinis, nes hidrolizės metu susidaro ADP ir AMP. Grandinių mainai, dalyvaujant UvsX, vyksta efektyviau, jeigu šiam baltymui padeda su vgDNR sąveikaujantis ir spiralę stabilizuojantis baltymas G32P. Jis savo savybėmis yra SSB analogas. Dar viena fago T4 homologinės rekombinacijos ypatybė yra ta, kad jai reikalingas dar vienas papildomas baltymas, vadinamas UvsY. Šis fago baltymas yra UvsX vykdomų mainų tarpininkas, nes padeda pastarajam prisijungti prie vgDNR, skatina nukleoproteininio filamento susidarymą. Funkcijos atžvilgiu UvsY yra RecO ir Rad52 homologas (Sugiyama ir kt., 1998).

RecA giminiški archebakterijų baltymai. Pirmąkart archebakterijų *recA* tipo genas buvo klonuotas iš *Sulfolobus solfataricus* (Seitz ir kt., 1998). Jo koduojams RadA baltymas yra nuo DNR priklausoma ATPazė, sudaro su DNR nukleoproteininį spiralės pavidalo filamentą, katalizuoja grandinių mainus. RadA filamentas yra dešiniakryptės spiralės pavidalo. Sekų palyginimas parodė, kad RadA iš archebakterijų labiau panašesnis į Rad51 ir Dmc1 nei į bakterijų RecA baltymą. RadA iš *S. solfataricus* jungiasi prie DNR kaip oktamerinis žiedas, jeigu nėra nukleotidinių kofaktorių. Jei yra ATP, tada RadA sudaro spiralės pavidalo nukleoproteininį filamentą ant vgDNR (Yang ir kt., 2001). Vykstant mainams *in vivo*, RadA, kaip RecA ir Rad51 baltymai, susiduria su įvairiais trukdžiais, kylančiais tiek iš kitų baltymų, tiek iš DNR. Pavyzdžiui, tam tikromis sąlygomis *E. coli* SSB baltymas gali konkuruoti su RecA. Panašiai atsitinka ir eukariotuose, todėl reikalingi baltymai-pagalbininkai. Eubakterijose šią misiją atlieka RecF, RecO ir RecR. Jie skatina RecA prisijungimą prie vgDNR fragmento, kurį užima SSB. Mielėse panašią funkciją atlieka Rad52 ir Rad55/Rad57. Jie padeda Rad51 nustumti RPA nuo vgDNR. Archebakterijose iki šiol nerasta RecF, RecO, RecR ir Rad52 homologų. Tačiau yra RadA paralogas – RadB (17 pav.), kurio funkcija dar neištirta. Manoma, kad jis gali veikti kaip DNR grandinių mainų tarpininkas (Komori ir kt., 2000).



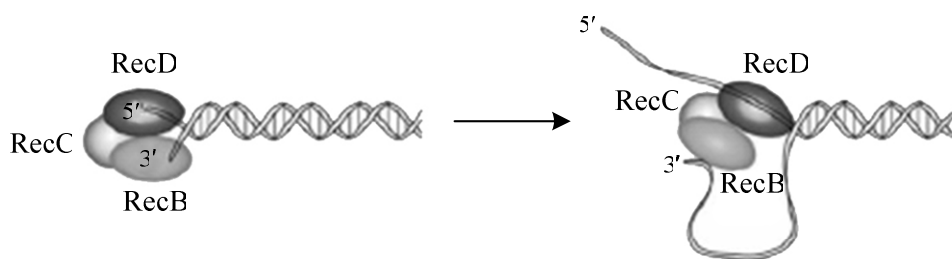
17 pav. Archebakterijų baltymų RadA ir RadB palyginimas su Rad51, Dmc1 ir RecA (Komori ir kt., 2000)

RecA baltymas iš chloroplastų. Šis baltymas (molekulinė masė – 39 kDa) imunologiškai artimas *E. coli* RecA, aptiktas žirnių (*Pisum sativum*) chloroplastuose. Vėliau panašus baltymas (40.5 kDa) aptiktas ir baltažiedžio vairo (*Arabidopsis thaliana*) chloroplastuose. 1993 m. buvo aptiktas pirmas RecA homologas eukariotuose – tai žirnių chloroplastų RecA baltymas, kuris panašus į *E. coli* RecA tuo, kad vykdo grandinių mainus esant ATP ir Mg^{2+} . Nors šis baltymas klonuotas iš eukariotinių organizmų ląstelių, tačiau savo sandara jis labai artimas prokariotų RecA rekombinazei. Eubakterijų ir chloroplastų RecA baltymų panašumas yra endosimbiotinės teorijos, teigiančios, kad chloroplastas kilo iš eubakterijų, dar vienas iš įrodymų. Žinoma nemažai prokariotų baltymų, kurie kaip ir RecA vykdo grandinių mainus, tačiau nehidrolizuoja ATP ir savo sandara nepanašūs į jį. Šio tipo baltymų pavyzdžiu prokariotuose gali būti *E. coli* RecT baltymas ir bakteriofago λ baltymas β .

2.2.2.2. RecBCD baltymas (egzonukleazė V)

Egzonukleazė V – tai didelis daugiafunkcinis baltymas, kurį sudaro RecB (134 kDa), RecC (129 kDa) ir RecD (67 kDa) subvienetai. Juos koduoja *recB*, *recC* ir *recD* genai. RecBCD yra DNR helikazė, nuo DNR priklausoma ATPazė, be to, turi nuo ATP priklausomą egzonukleazinį aktyvumą bei silpną ATP skatinamą viengrandės DNR endonukleazinį aktyvumą (Churchill ir kt., 1999). Šis

baltymas yra pagrindinis RecBCD rekombinacijos kelio komponentas, padedantis įsisavinti linijines DNR molekules, kurios susidaro dėl dvigrandžių trūkių. Tokios molekulės bakterijų ląstelėje atsiranda konjugacijos, transformacijos ir transdukcijos metu. RecBCD⁻ fenotipo mutantai buvo gauti *E. coli* F⁻ recipientą paveikus cheminiais mutagenais. Sukryžminus mutantinį F⁻ kamieną su Hfr donoru, transkonjugantų išėiga buvo sumažėjusi 10²–10³ karto. *E. coli* *recB* ir *recC* nuliniams mutantams būdingas panašus fenotipas: sumažėjusi konjugacinė, transdukcinė ir fagų rekombinacija, padidėjęs jautrumas DNR pažaidas sukeliantiems veiksniams (UV, X spinduliams, cheminiams mutagenams), sumažėjęs transformacijos efektyvumas bei ląstelių gyvybingumas. Genas *recD* buvo aptiktas tik nustačius, kad RecD polipeptidas yra sudedamoji egz nukleazės V dalis. RecD⁻ fenotipo mutantai pasižymi normalia konjugacija ir fagų rekombinacija. Kai kurie *recD* genotipo kamieniai yra hiperrekombinogeniški. Tokių kamienų gyvybingumas yra normalus, nepadidėjęs jautrumas UV ir X spinduliams. Esant mutacijai *recD* gene, baltymas prarasdavo nukleazės savybes, o helikazės aktyvumas išlikdavo, dėl to ilgai buvo manoma, kad būtent šis subvienetas turi nukleazės aktyvumą (Palas ir Kushner, 1990). Mutacijos *recB* ir *recC* genuose panaikindavo visus baltymo aktyvumus. Tačiau naujesni baltymo struktūros tyrimai parodė, kad vienintelis aktyvus nukleazės saitas yra RecB subvienete (Singleton ir kt., 2004). RecBCD baltymas – viena veikliausių ir greičiausių helikazių. Vieno prisijungimo metu gali išvynioti iki 30 000 bp ir tai atlieka 1000 bp/s greičiu (Roman ir kt., 1992). Žinoma, kad RecB subvienetas turi 3'→5' helikazinį aktyvumą. Tačiau dabar nustatyta, kad RecD taip pat turi helikazinį aktyvumą, tik jis veikia 5'→3' kryptimi. Mutacijų pagalba inaktyvavus bet kurią iš šių subvienetų, baltymas vis tiek išvynioja dgDNR. Tai rodo, kad RecBCD baltyme yra aktyvūs abu subvienetai. Todėl dabar siūlomas bipoliarinis RecBCD veikimo modelis (Dillingham ir kt., 2003). Pagal jį, dvi DNR helikazės papildo viena kitą. Jos juda priešingo poliariškumo principu, tačiau ta pačia kryptimi ant skirtingų dgDNR grandinėlių (18 pav.).



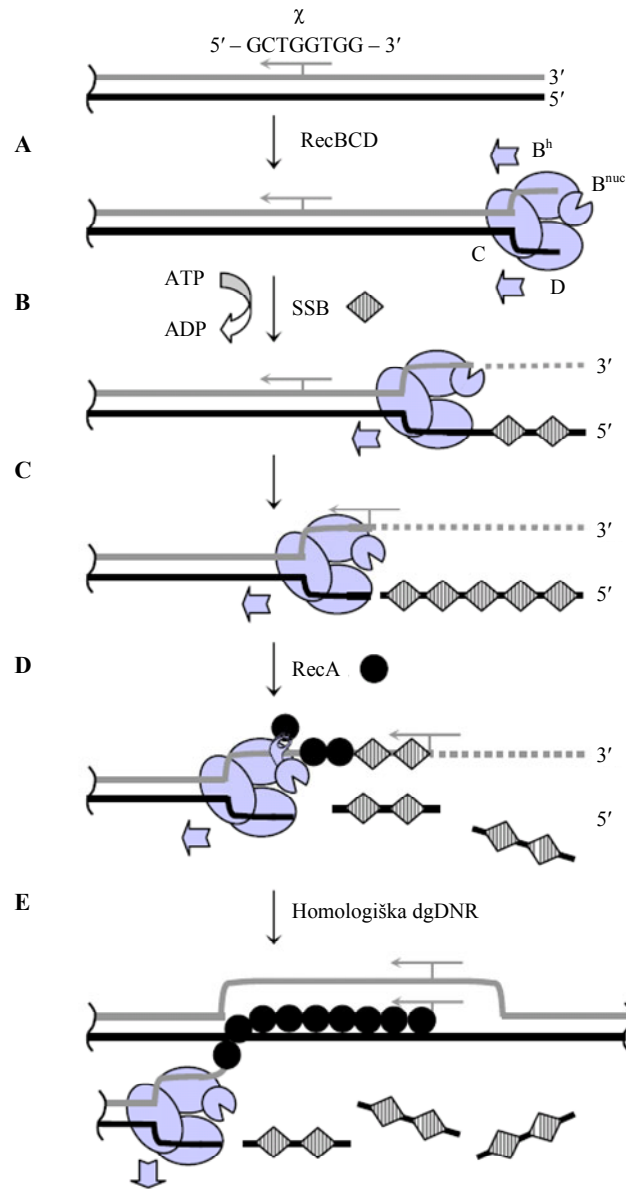
18 pav. RecBCD heterotrimeras panaudoja dvi aktyvias helikazes: RecB ir RecD. RecD juda viena DNR grandimi 5'→3' kryptimi, o RecB – kita grandimi 3'→5' kryptimi. RecD helikazė išvynioja DNR greičiau nei RecB, todėl susidaro kilpa (Matson, 2003)

RecC baltymas atpažįsta *chi* seką. Šio polipeptido sandaros tyrimai rodo, kad jis turėjo kilti iš helikazių, tik dabar neturi šio aktyvumo.

Genai *recB*, *recC*, *recD* buvo klonuoti chromosomos *thyA* – *argA* fragmento sudėtyje. Genai *recB* ir *recD* sudaro operoną, *recC* yra transkribuojamas nepriklausomai, nors ta pačia kryptimi. Egz nukleazės V kiekis ląstelėje nedidelis (apie 10 molekulių).

RecBCD baltymo biologinės funkcijos:

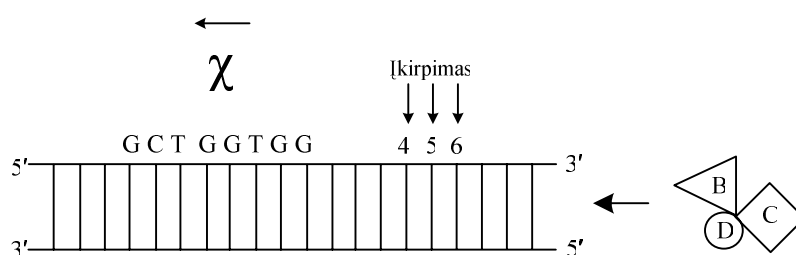
1. Egzonukleazė V svarbi keturių tipų rekombinacijai – konjugacijai, transdukcijai, transformacijai fragmentuota chromosomine DNR ir fago λ *redgam* rekombinacijai. Visiems šiems procesams bendra yra tai, kad viena reakcijoje dalyvaujančių DNR molekulių kurį laiką būna linijinės dvigrandės struktūros.
2. RecBCD kartu su RecA baltymu dalyvauja pažeistos DNR reparacijoje šalinant dvigrandžius trūkius.
3. Svetimai DNR patekus į ląstelę, egzozonukleazė V ją skaldo. Šiam tikslui tiesiogiai panaudojamas fermento nukleazinis aktyvumas, o netiesiogiai – helikazinis. Dėl pastarojo duplekso grandinėlių yra atskiriamos, o susidarę viengrandžiai galai gali būti suardomi ir kitų nukleazių. Todėl laukinio kamieno ląstelių transformacijos linijine dgDNR efektyvumas sudaro tik 4 proc. efektyvumo, gaunamo tą patį kamieną transformuojant žiedine DNR. Šį efektyvumą daugiau kaip 10 kartų padidina mutacija *recD* gene. Kadangi egzozonukleazė V atlieka apsauginę funkciją sergėdama bakterijos ląstelę nuo svetimos DNR, nenuostabu, kad daugelis bakteriofagų koduoja specifinius RecBCD fermento inhibitorius. Bakteriofago λ baltymas γ slopina RecBCD aktyvumus, tiesiogiai jungdamasis prie pastarojo. Tai yra būtina, norint apsaugoti λ DNR nuo degradacijos, kai vyksta fago replikacija besisukančio rato būdu. *Geno 2* produktas saugo fago T4 DNR nuo egzozonukleazės V. Šio geno koduojamas baltymas jungiasi prie linijinės būsenos fago genomo galų ir užkerta kelią RecBCD baltymui.
4. Kartu su RecA dalyvauja nuo rekombinacijos priklausomoje replikacijoje (žr. 2.2.2.1.1. skirsnį).



19 pav. Ankstyvieji RecBCD HR kelio etapai (pagal Spies ir Kowalczykowski, 2005). A – RecBCD prisijungia prie DNR ir išvynioja grandines dėl RecB ir RecD helikazinių aktyvumų. Judėdami DNR molekule šie subvientetai traukia DNR galus ir RecC pleištas skelia dgDNR molekulę į dvi grandines; B – 5' galas per RecD patenka į RecB nukleazės domeną. 3' galą turinti grandinė keliauja tiesiai į RecB nukleazės aktyvųjį centrą, kuriame intensyviai skaldoma. 5' uodega taip pat skaldoma, tačiau rečiau nei 3' galas, nes dėl savo padėties negali efektyviai konkuruoti su 3' už nukleazės aktyvųjį centrą; C – atpažinęs χ seką, RecC stipriai prisijungia toje vietoje prie 3' uodegos ir neleidžia jos toliau skaldyti; D – 5' galas dabar gali lengviau sąveikauti su nukleazės saitū ir dėl to gali būti dažniau skaldomas; E – pabaigoje RecBCD „užkrauna“ RecA baltymą ant DNR 3' uodegos. Mechanizmas neaiškus. Manoma, čia dalyvauja RecB nukleazės domenai prieš baltymo disociaciją nuo DNR. B^h ir B^{nuc} – RecB subvieneto helikazės ir nukleazės domenai

RecBCD baltymas geba atpažinti specifines DNR sekas, vadinamas χ (chi). Pirmiausia ši seka buvo atrasta fage λ dėl *cis* mutacijos, kuri sukėlė spartesnę fago augimą pasinaudojus šeimininko *E. coli* homologinės rekombinacijos sistema. Šiuo atveju rekombinacijos dažnis padidėjo 10 kartų ir pasireiškė tam tikru atstumu žemiau χ sekos, tai pagerindavo fago pakavimosi procesą (Lam ir kt., 1974). *E. coli* genome šios sekos aptinkamos 5 kbp atstumu viena nuo kitos, jas sudaro aštuoni

nukleotidai 5'-GCTGGTGG-3'. Jų aptinkama žymiai dažniau nei atsitiktinis aštuonių nukleotidų derinys. *E. coli* MG1655 4,6 Mbp dydžio genome yra 1001 tokia seka. Daugiau kaip 60 proc. χ sekų orientuotos replikacijos *ori* kryptimi. Ši orientacija turėtų skatinti RecBCD vykdomą DGT, susidarančių DNR replikacijos metu, reparaciją. Sekos atpažinimas efektyvus tik tada, kai baltymas prisijungia iš GG-3' pusės. Pavienės χ sekos atpažinimo tikimybė yra apie 30–40 proc. Dėl sąveikos su χ pakinta RecBCD baltymo savybės (19 pav.). Pirmiausia tai sukelia baltymo nukleazinio aktyvumo poliariškumo pokyčius: slopinamas DNR duplekso 3'galo skaldymas ir padidėja 5'galo skaldymas (Dixon ir Kowalczykowski, 1993), o neaktyvuotos būsenos egzokleazė V, judėdama dvigrande linijine DNR molekule, intensyviau skaldo 3'galą nei 5'galą (19 pav.). Todėl aktyvuotas RecBCD baltymas pagamina ilgą vgDNR fragmentą, kurio 3'gale yra χ seka. Grandinės nuo 3'galo skaldymo slopinimas jaučiamas apie 10 kbp atstumu žemyn nuo χ saito. Pakinta ir helikazinis baltymo aktyvumas. Sekos atpažinimas sukelia trumpalaikį (kelių sekundžių trukmės) judančio baltymo sustojimą. Sąveikaudamas su χ saitu, RecBCD paskutinį kartą įkerpa vieną iš DNR grandinių 4–6 nukleotidų atstumu iš GG-3' pusės (20 pav.) Po to jis vėl juda toliau, tačiau jau dukart lėčiau. Be to, RecBCD įgyja gebėjimą „užkrauti“ RecA baltymą ant naujai pagamintos vgDNR (Anderson ir kt., 1997). Taigi reaguodamas į χ sekos poveikį, RecBCD fermentas įvykdo du pagrindinius homologinės rekombinacijos iniciacijos uždavinius: 1) subrandina DGT, sukurdamas dgDNR viengrandės DNR fragmentą, užsibaigiantį χ seka; 2) katalizuoja nukleoproteininio RecA filamento susidarymą ant vgDNR. Įdomu tai, kad SOS indukcijos metu RecBCD baltymas tampa nuo χ nepriklausomas. Jis įgyja savybių, kurios pasireiškia paprastai tik po sąveikos su χ seka: slopina nukleazinį ir didina rekombinacinį aktyvumą.



20 pav. RecBCD baltymo ir χ sekos sąveika. Rodyklė virš χ rodo kryptį, kuria judėdamas RecBCD atpažįsta šią seka

Taip bakterija mobilizuoja savo rekombinacijos sistemą atsiradusioms pažeidimams pašalinti. Bent porą dešimtmečių vyravo nuomonė, kad RecBCD fermento ir χ sekos sąveika būdinga tik *E. coli* giminingoms bakterijoms. Vėliau šio požiūrio teko atsisakyti, nes panaši DNR ir baltymų sąveika HR metu nustatyta ir kitose bakterijose (Biswas ir kt., 1998; Chedin ir kt., 1998; Sourice ir kt., 1998). Trumpų (5–8 bp) sekų pakako apsaugoti linijinę DNR nuo RecBCD tipo baltymų poveikio. Tai rodo, kad šių rekombinacijos baltymų reguliacija galbūt neuniversali, tačiau yra plačiai paplitusi. Kai kurios

bakterijų rūšys turi baltymus, neabejotinai homologiškus RecBCD, kitos – tik funkcinius šio baltymo pakaitalus. *B. subtilis* AddAB helikazė/nukleazė sudaryta iš dviejų subvienetų, kuriuos koduoja *addA* ir *addB* genai. Vienintelis AddAB variklis – AddA baltymas, turi SF1 helikazės ir nukleazės domeną, kuris labai panašus į RecB baltymą. Kaip ir RecB, AddA yra 3'→5' helikazė, o jos 3'→5' nukleazės aktyvumą slopina sąveika su *B. subtilis* rekombinogeniška seka χ_{Bs} (5'-AGCGG-3'). Kitas subvienetas AddB neturi didesnio panašumo su RecC ar RecD subvienetais, o jame aptinkamas ATPazės motyvas ir antros nukleazės saitas panašus į AddA baltymo. AddB skaldo DNR spiralės grandį, turinčią 5' galą. Netgi nebūdamas savo sandara labai panašus į RecBCD, AddAB fermentas gali komplementuoti rekombinacijos ir reparacijos sutrikimus *recB⁻recC⁻* *E. coli* ląstelėse. AddAB, taip pat kaip ir RecBCD, jungiasi prie dgDNR, turinčios bukų galus, naudoja ATP hidrolizę savo judėjimui tokia molekule ir ją išvynioja. Tačiau skirtingai nei RecBCD, kuris linijinę dgDNR skaldo asimetriškai, AddAB hidrolizuoja abi duplekso grandis vienodai. AddAB homologai aptikti 12-oje gramteigiamų bakterijų rūšių (Spies ir Kowalczykowski, 2005).

χ sekos leidžia atpažinti savo arba tos pačios rūšies individų DNR. Svetima DNR, patekusi į bakterijos ląstelę, tokių sekų neturi arba jų aptinkama tik atsitiktinai. Taigi pernelyg retai. Tokią DNR suskaldys nukleazės.

2.2.2.3. RecE (egzonukleazė VIII) ir RecT

Šie baltymai yra svarbūs RecE rekombinacijos kelyje. Viena jo ypatybių yra ta, kad plazmidžių rekombinacija šiuo keliu gali vykti nepriklausomai nuo RecA baltymo. RecE rekombinacijos kelias pradeda veikti į *recB⁻* arba *recC⁻* genotipo kamieną įterpus *sbcA* (angl. *suppressor of recBC*) mutaciją (Barbour ir kt., 1970). Dėl šios mutacijos aktyvuojamas laukiniame kamiene neveikiantis *recE* genas, dėl to atsigauna minėto mutanto rekombinacinis aktyvumas bei slopinamas jautrumas mitomicinui. Geną *recE* gali aktyvuoti įvairios mutacijos. Kai kurios jų gali pašalinti dalį koduojamosios geno sekos ir dėl to likusi dalis gali susiliesti su aukščiau esančio geno DNR. Baltymas, kuris praranda nemažą molekulės dalį iš NH₂ galo, įgyja didesnę nukleazinę aktyvumą. RecE taip pat gerai toleruoja papildomas aminorūgštis, kurių gali atsirasti dėl mutacijų sukulto genų suliejimo. Dabar nustatyta, kad *recE* lokusas susideda iš dviejų atviro skaitymo rėmelių. Aukščiau esantis *recE* genas koduoja egzonukleazę VIII. Antrasis genas, pavadintas *recT*, koduoja 30 kDa baltymą (Hall ir kt., 1993). Šie genai yra kilę iš kriptinio rac profago, kuris aptinkamas daugelyje, tačiau ne visuose *E. coli* kamienų. Komplementacijos testai parodė, kad *recE* ir *recT* reikalingi konjugacijai *recB⁻recC⁻sbcB⁺* (*recA⁺*) kamiene (Clark ir kt., 1993). Delecinė analizė atskleidė, kad, pašalinus *recT* geną, šiame kamiene sumažėja konjugacijos dažnis ir padidėja jautrumas UV spinduliuotei bei mitomicinui C. Abiejų genų pašalinimas dar labiau padidina jautrumą UV ir mitomicinui C, tačiau konjugacijos dažnis išlieka toks pats kaip ir esant *recT* delecijai.

RecE turi specifinį dvigrandės DNR egzonukleazinį aktyvumą. Jis skaldo vieną DNR duplekso grandinę iš 5'galo. Dėl šios reakcijos susidaro mononukleotidai ir sveika viengrandė DNR. Taigi *E. coli recB⁻recC⁻* kamiene supresorinis *sbcA⁻* mutacijos poveikis pasireiškia tuo, kad aktyvuota egzonukleazė VIII pakeičia neveikiančią egzonukleazę V ir sukuria rekombinacijai reikalingus viengrandžius 3'galus. RecE aktyvumą slopina 5' viengrandžiai galai ilgesni nei 250 nukleotidų.

RecT baltymas vykdo DNR renatūraciją, po to – DNR grandinių mainus. RecT gali jungtis tik prie vgdNR ir suporuoti žiedinę vgdNR su linijine dgDNR (tai tradiciniai RecA vykdomos reakcijos substratai). Tačiau būtina, kad dgDNR būtų paveikta egzonukleazės ir turėtų atvirą viengrandį homologiškos sekos DNR fragmentą. Tos nukleazės funkciją ir atlieka RecE. Dėl šių savybių RecE ir RecT baltymai gali komplementuoti *recA* mutaciją, kai vyksta plazmidžių ir fagų rekombinacija. ATP RecT baltymui nereikalingas. Genai *recE* ir *recT* savo sandara bei funkcijomis panašūs į λ *red* sistemos α ir β genus. Vis dėlto jų koduojami baltymai skiriasi molekuline mase, antigeninėmis savybėmis ir neturi didesnės homologijos su fago λ baltymais.

2.2.2.4. RecF, RecO ir RecR baltymai

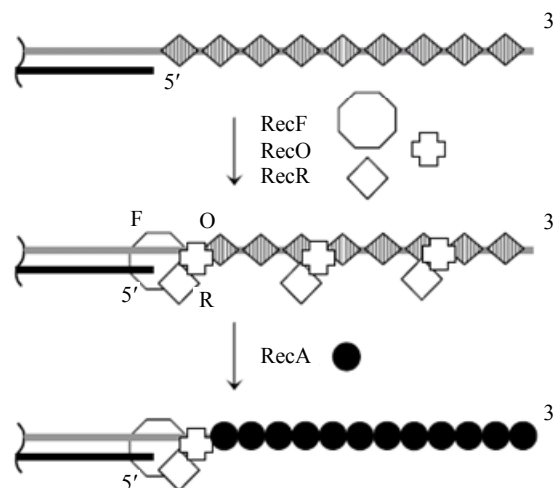
E. coli recB⁻ ar *recC⁻* mutantų konjugacijos sutrikimus galima pašalinti į šiuos kamienus įterpus dvi papildomas mutacijas – *sbcB* ir *sbcC* (arba *sbcD*). *sbcB* mutacija inaktyvuoja egzonukleazę I (Kushner ir kt., 1972), *sbcC* mutacija daro neveikliu vieną iš dviejų SbcCD nukleazės genų (Connelly ir kt., 1998). Pastaroji nukleazė *E. coli* laukinio tipo ląstelėse skaldo kryžiaus pavidalo struktūras ar segtukus, kurie susidaro palindrominėse sekose DNR replikacijos metu. Dėl šių dviejų mutacijų aktyvuojamas RecF HR kelias. Įdomu tai, kad konjugacijos ir transdukcijos, vykstančių šiuo keliu *recBC⁻sbcB⁻sbcC⁻* ląstelėse, dažnis yra beveik toks pat kaip ir laukinio tipo ląstelėse, kuriose šie procesai vyksta RecBCD keliu. Kai kuriose bakterijų rūšyse (pavyzdžiui, *Deinococcus radiodurans*) RecF kelias yra svarbiausias (Spies ir Kowalczykowski, 2005). HR *recBC⁻sbcB⁻sbcC⁻* genotipo ląstelėse priklauso nuo RecF, RecA, RecN, RecJ, RecO, RecQ, RecR ir SSB baltymų. Šiuo atveju subrandinti DGT padeda RecJ ir RecQ baltymai (žr. 2.2.2.6. ir 2.2.2.8. skirsnius). RecQ helikazė atsako maždaug už 75 proc. konjugacinės rekombinacijos įvykių *recBC⁻sbcB⁻sbcC⁻* genotipo kamiene. Likę 25 proc. tenka kitoms helikazėms: UvrD (helikazė II) ar HelD (helikazė IV) (Mendonca ir kt., 1995). Skirtingai nei RecBCD baltymas RecQ neskatina RecA nukleoproteininio filamentų susidarymo. Todėl vgdNR, susidariusi dėl RecQ poveikio ir susijungusi su SSB, turi būti apsaugota nuo nukleazių. Viena tokių nukleazių – egzonukleazė I ir yra inaktyvuojama supresorinės *sbcB* mutacijos. Tai ypač svarbu, nes šios nukleazės pagrindinis substratas yra vgdNR padengta SSB baltymo.

Genas *recF* buvo atrastas tiriant mutaciją, kuri nulemia jautrumą UV bei pažeidžia rekombinaciją *E. coli recBC⁻sbcB⁻* kamienuose. Jis koduoja 40 kDa baltymą. Laukinio tipo *E. coli* kamienuose *recF⁺* reikalingas vidumolekulinei ir tarpmolekulinei žiedinių plazmidžių rekombinacijai. Genas *recF* nebūtinai reikalingas plazmidžių rekombinacijai *recBC⁻sbcA⁻* genotipo kamienuose.

Mutacijų *recO* ir *recR* genuose fenotipas yra panašus į *recF* mutacijas. Šie genai koduoja RecO (26 kDa) ir RecR (22 kDa) baltymus.

Labai svarbus RecBCD kelio požymis – skatinti RecA prisijungimą prie vgDNR. Todėl nenuostabu, kad RecF kelyje taip pat yra baltymų, atliekančių šią funkciją. Genetiniai tyrimai rodo, kad RecA baltymo „užkrovimas“ ant SSB baltymu padengtos vgDNR susijęs su RecF, RecO ir RecR baltymų veikla. Gauti RecA mutantai (RecA803), kurie slopina *recF* mutacijos nulemtą jautrumą UV. Tokie mutantiniai RecA pašalina SSB nuo vgDNR daug greičiau nei laukinio tipo RecA. Geno *ssb* perraška duoda ląstelių fenotipą, panašų į *recF*⁻ mutanto. Tai rodo, kad RecF dalyvauja, kai RecA šalina SSB nuo vgDNR. Taip pat žinoma nemažai *recA* alelių, slopinančių *recF*, *recO* ir *recR* mutacijas. Tiek genetiniai, tiek biocheminiai tyrimai rodo, kad šie trys baltymai veikia kaip vienas kompleksas (Wang ir kt., 1993; Spies ir Kowalczykowski, 2005).

RecFOR baltymai sudaro įvairius kompleksus. RecO sąveikauja su RecR bei SSB ir skatina RecA nukleoproteininio komplekso susidarymą ant vgDNR padengtos SSB baltymo. RecO skatina viengrandžių DNR susijungimą. RecR sąveikauja su RecF ir jungiasi prie vietos, kur dgDNR pereina į vgDNR. Biocheminiai tyrimai rodo, kad RecF taip pat linkęs jungtis prie tokių saitų DNR molekulėje. Šiam procesui reikalinga ATP hidrolizė. RecF (ar RecFR) atpažįsta vg ir dgDNR fragmentą, nišoje turintį 5'galą (21 pav.). Tokios sandaros DNR molekulę gali pagaminti RecQ ir RecJ baltymai, veikdami kartu. RecOR (ar tik RecO) jungiasi prie DNR-RecF(R) ir modifikuoja SSB bei vgDNR kompleksą taip, kad RecA baltymas gali jungtis prie vgDNR (21 pav.).



21 pav. RecFOR baltymų funkcija susidarant RecA nukleoproteininiam filamentui (pagal Spies ir Kowalczykowski, 2005). Pilkais rombais pavaizduotas SSB baltymas

RecF kelio baltymai turi savo funkcinius homologus visuose organizmuose – nuo bakteriofago iki žmogaus (Beernink ir Morrical, 1999)

2.2.2.5. RecG baltymas

Geno *recG* mutantuose yra padidėjęs jautrumas UV ir sumažėjęs (3–5 kartus) rekombinacijos lygis (Lloyd & Buckman, 1991). Tiriant šio geno biologines funkcijas ląstelėje, *recG* mutacija buvo įterpta į kamienus jau turinčius pavienių *rec* genų mutacijas. Tiriant tokius dvigubus mutantus pagal mutantinio efekto sustiprėjimą (sumažėjusį rekombinacijos dažnį), galima nustatyti, su kurių genų funkcijomis persidengia *recG* veikla. Žymūs poveikiai gauti *recGrecB*, *recGrecJ* genotipo kamienuose. Jokio poveikio nepastebėta derinyje su *recD*, *recF*, *recN*, *recQ* mutacijomis. Reikšmingu sutrikimų nustatyta dvigubuose mutantuose su *ruv* (*ruvA*, *ruvB*, *ruvC*) genais. Šiuo atveju konjugacinės ir transdukcinės rekombinacijos dažnis bei atsparumas UV sumažėdavo iki kelių šimtų kartų (Lloyd, 1991). Tai rodo, kad *ruv* ir *recG* genai yra alternatyvių rekombinacijos kelių komponentai laukinio tipo ląstelėse.

RecG aminorūgščių seka panaši į DNR ir RNR helikazių. Savo savybėmis šis baltymas panašus į RuvAB kompleksą. Jis kaip ir RuvA specifiškai jungiasi prie Holidėjaus struktūrų. RecG kaip ir RuvB turi nuo DNR priklausomą ATP-azinį aktyvumą. RecG negali išvynioti paprastų helikazinių substratų. Jis, matyt, negeba karpyti Holidėjaus jungčių (Kowalczykowski ir kt., 1994).

2.2.2.6. RecJ baltymas

Genas *recJ* koduoja 63 kDa baltymą, kuris viengrandės DNR atžvilgiu turi 5'→3' egz nukleazinį nuo ATP nepriklausomą aktyvumą (Lovett ir Kolodner, 1989). RecJ reikalingas rekombinacijai RecF ir RecE keliais vykti. Nesant veiklaus RecBCD baltymo, mutacija *recJ* gene 1000 kartų sumažina konjugacinę rekombinaciją ir padidina ląstelės jautrumą UV. Laukinio tipo ląstelėse, kuriose pagrindinis kelias rekombinantams susidaryti yra RecBCD, mutacijos *recJ* gene turi nedidelę įtaką konjugacinei rekombinacijai. Nuo šio geno labai priklauso plazmidinė rekombinacija netgi laukinio tipo *recB⁺recC⁺* kamienuose. Todėl, pažeidus *recJ* geną, plazmidžių rekombinacija sumažėja 4000 kartų (Kolodner ir kt., 1985). Atrodo, kad genai *recJ*, *recD* ir *recN* funkciškai yra ekvivalentiški, nes atskira mutacija viename iš šių genų tik nežymiai pakeičia konjugacinės rekombinacijos dažnį. Silpnai išreikštas mutantinis fenotipas ir dvigubuose šių genų mutantuose. Tuo tarpu trigubame *recJrecDrecN* mutante rekombinantų išėiga sumažėja 50–100 kartų ir kamienai tampa jautresni UV (Lloyd ir Buckman, 1991).

2.2.2.7. RecN baltymas

Mutacija *recN* gene *recBC⁻sbcBC⁻* genotipo kamienuose 100 kartų sumažina konjugacinę ir transdukcinę rekombinaciją. O jos poveikis *recBC⁻sbcA⁻* kamieno ląstelėse yra nežymus. Šio geno svarbą RecF rekombinacijos kelyje rodo ir tai, kad *recBC⁻sbcBC⁻* kamiene jo raiška padidėja 20–30 kartų. Genas *recN* transkripcija pavaldi LexA baltymui, todėl genas aktyvuojamas SOS atsako metu. Šis genas yra klonuotas, bet biochemiškai jo produktas dar nėra gerai ištirtas. Manoma, kad RecN

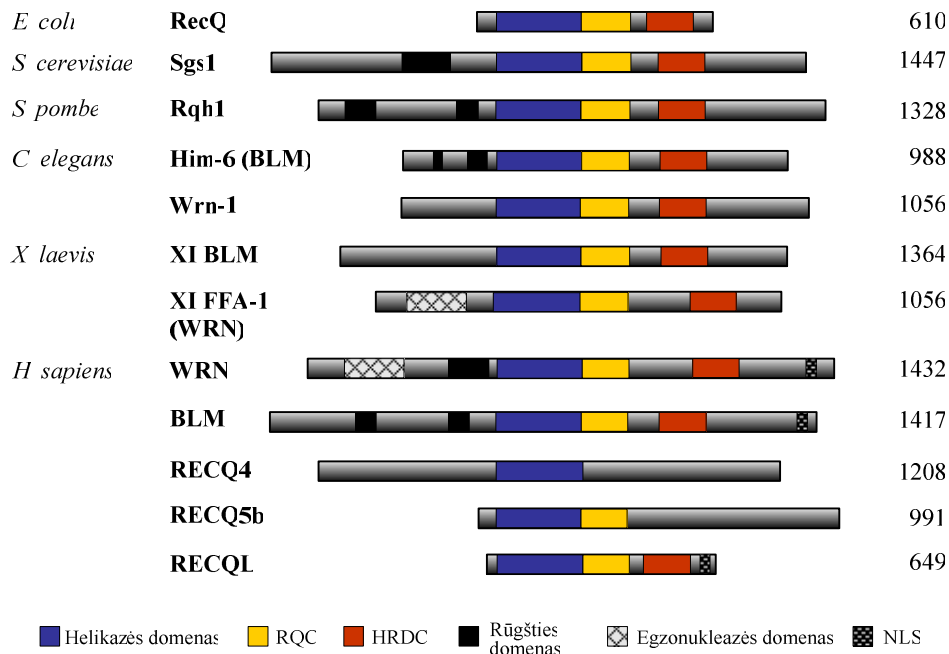
dalyvauja susidarant arba padaro prieinamesnius *vgDNR* 3'galus, kurie gali būti panaudoti grandinių mainams. Šis požiūris pagrįstas genetiniais tyrimais. Bakterijų *recBC⁻sbcA⁻* kamienuose, kuriuose dėl egzonukleazės VIII veiklos nuolat susidaro 3' viengrandžiai DNR galai, *recN* mutacija neturi labai išreikšto fenotipo. Tačiau *recBC⁻sbcBC⁻* genotipo ląstelėse, kuriose nėra nukleazės, galinčios pagaminti tokius viengrandžius galus, *recN* yra būtinas. Galbūt RecN dalyvauja tokių viengrandžių 3'galų stabilizacijoje (Kowalczykowski ir kt., 1994). Dėl kai kurių *recN⁻* mutacijų savitumų, palyginti su kitų RecF kelio genų mutacijomis, RecN dalyvauja ir RecBCD kelio įvykiuose (Skaar ir kt., 2002). Vis dėlto šio baltymo funkcija išlieka neaiški. Jis gali būti struktūrinis baltymas arba fermentas. N gale turi ATP/GTP surišimo domeną. Galbūt lemia teisingą erdvinį rekombinacijoje dalyvaujančių molekulių išsidėstymą.

2.2.2.8. RecQ ir jam giminiški baltymai

E. coli recQ genas nustatytas 1984 m. (Nakayama ir kt., 1984). *E. coli recBC⁻sbcB⁻* genotipo kamiene *recQ1* mutacija nulemia 20 kartų padidėjusį jautrumą UV ir 20–70 kartų sumažėjusį konjugacinės rekombinacijos efektyvumą. Tai rodo, kad *recQ* yra RecF kelio dalis. Kartu jis yra ir RecE kelio baltymas, nes dalyvauja plazmidžių rekombinacijoje *recBC⁻sbcA⁻* genotipo kamiene (Luisi-DeLuca ir kt., 1989). Geno *recQ* mutacija nekeičia ląstelės gyvybingumo, o padidėjęs jo produkto kiekis yra žalingas. Geno *recQ* promotorius turi LexA represoriaus prisijungimo vietą ir šio geno ekspresija paklūsta SOS reguliacijai. RecQ pasižymi nuo DNR priklausomu dATPazės bei DNR helikazės aktyvumais. ATP ar dATP hidrolizė reikalinga RecQ baltymui išvyniojant dgDNR. RecQ funkcijos panašios į RecBCD. Jis atskiria DNR duplekso grandines, išvynioja molekulę 3'→5' kryptimi DNR grandinės, prie kurios prisijungęs šis baltymas, atžvilgiu. RecA gali panaudoti atsiradusius 3'galus grandinių mainams. Manoma, kad 5' viengrandžius galus skaldo RecJ.

RecQ supresuoja nehomologinę rekombinaciją *E. coli* ląstelėse (Handa ir kt., 1997). *recQ* mutantuose padidėja nehomologinės rekombinacijos dažnis. RecQ baltymas sudarytas iš 610 aminorūgščių. Gautas jo katalizinio centro kristalinės struktūros vaizdas parodė, kad jame yra 4 subdomenai (Bernstein ir kt., 2003).

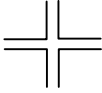



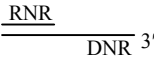

RecQ tipo baltymai sudaro atskirą helikazių grupę, kurios nariai pasižymi dideliu konservatyvumu tiek bakterijų, tiek žmogaus ląstelėse. Jiems visiems būdingas 400 aminorūgščių helikazės ir RQC bei HRDC domenai (Cobb ir Bjergbaek, 2006) (22 pav.).



22 pav. RecQ šeimos helikazių sandaros palyginimas (Cobb ir Bjergbaek, 2006)

S. cerevisiae panašią helikazę koduoja *SGS1* genas, kuris yra supresorius lėto augimo fenotipo *top3* mutantuose. Žmogaus genome yra net penki šio tipo helikazių genai (*WRN*, *BLM*, *RECQ4*, *RECQ5b* ir *RECQL*) (Cobb ir Bjergbaek, 2006). RecQ šeimos helikazės labai svarbios genomo stabilumui palaikyti. Mutacijos šiuose genuose padidina rekombinacijos dažnį. Pavyzdžiui, *Sgs1* mutantinės mielės, auginamos įprastomis sąlygomis, pasižymi ankstyvu senėjimu, padidėjusiu mitozinio krosingoverio dažniu, genomo nestabilumu, neproporcingais seserinių chromatidžių mainais, chromosomų aberacijomis, heterozigotiškumo praradimu (Onoda ir kt., 2001; Ajima ir kt., 2002), nehomologine rekombinacija (Yamagata ir kt., 1998). Mutacijos žmogaus helikazių genuose sukelia keletą ligų, paveldimų kaip autosominiai recesyviniai požymiai. Individai, turintys mutaciją *BLM* gene, suserga Bliumo (Bloom), *WRN* gene – Vernerio (Werner), *RECQ4* – Rotmundo-Tomsono (Rothmund-Thomson) sindromais. Šioms patologijoms būdingas genomo nestabilumo padidėjimas ir polinkis sirgti vėžiu. Bloom'o sindromu sergančių pacientų ląstelėse padidėja homologinių chromosomų telomerų susijungimo dažnis. Šiose ląstelėse sutrikęs telomerų „remonto“ procesas (Lillard-Wetherell ir kt., 2004). Žmogaus ląstelių kultūroje išjungus helikazės RecQL1 geno veikimą, padidėja seserinių chromatidžių mainų dažnis (LeRoy ir kt., 2005).

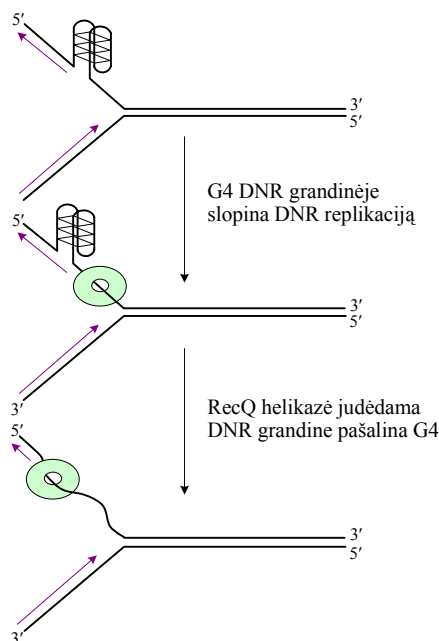
RecQ helikazių funkcinį konservatyvumą įrodo eksperimentai. Žmogaus *BLM* ir *WRN* genai supresuoja hiperrekombinacinį fenotipą, atsiradusį dėl mutacijų *SGS1* gene, kepimo mielių ląstelėse.

Holliday jungtis	
RecA sudaryta struktūra	
Išvyniotos DNR fragmentas	
D kilpa	
RNR/DNR hibridas	
G kvadrupleksas (G4)	

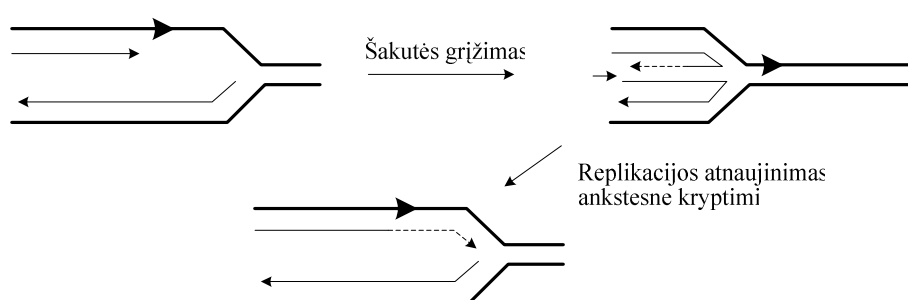
23 pav. RecQ helikazių substratai (Bennett ir Keck, 2004)

RecQ helikazės labai svarbios DNR replikacijai. Mutantuose aptinkama įvairių šio proceso sutrikimų. Šie baltymai dalyvauja replikacijos proceso kontrolėje bei užstrigusių replikacijos šakutėlių ištaisyme. Bakterijų *recQ* mutantuose pastebėtas išsiderinęs replikacijos šakutėlių, užstrigusių UV spindulių sukeltų DNR pažeidimų vietose, subbrandinimas. Tokiuose mutantuose padidėja nedėsningos rekombinacijos dažnis. Žmogaus ląstelėse, neturinčiose *BLM* ar *WRN* genų, kaupiasi nesubbrandinti replikacijos tarpiniai produktai (Lonn ir kt., 1990; Poot ir kt., 1992). Užstrigusių replikacijos šakutėlių vietose skatinama HR. Nors HR yra labai svarbi genomo stabilumui palaikyti, tačiau padidėjęs jos dažnis gali sukelti patologiją, destabilizuoti genomą. Taigi egzistuoja ryšys tarp RecQ helikazių ir replikacijos pažeidimų ištaisymo HR būdu. RecQ helikazės ypatingos tuo, kad gali atakuoti labai įvairias neįprastas DNR struktūras, susidarancias DNR replikacijos ir rekombinacijos metu. Čia galima paminėti dažnai susidarancias trišakės DNR struktūras, D kilpas, segtukus, G kvadrupleksus (G4 DNR) (23 pav.). G4 DNR nebūdinga B formos DNR molekulėms. Šios struktūros susidaro G turtingose genomo vietose dėl labai stabilų Hoogsteen'o vandenilinių jungčių tarp keturių guaninų. Toks RecQ helikazių lankstumas substrato atžvilgiu galėjo susidaryti evoliucijos metu kaip atsakas į DNR replikacijos sutrikimus, atsiradusius dėl įvairiausių priežasčių. Replikacijos šakutės pažeidimų reparacija intensyviai tiriama. Tačiau į labai daug klausimų neatsakyta. Žinoma daug DNR struktūrų ir pažeidimų, kurios gali blokuoti replikaciją. Pažeidimos pavojingumas priklauso nuo to, kurioje DNR molekulės grandinėje ji įvyko. Pažeidimos atsiliekančioje grandinėje neturėtų sukelti replikacinės šakutės sustojimo, o tik viengrandžių DNR fragmentų susidarymą. O pažeidimos pirmaujančioje grandinėje gali ne tik sustabdyti replikaciją, bet ir išardyti replikasomą. Antrinės struktūros, susidarancias DNR grandinėje, yra didelis kliuvinys šakutės judėjimui. Savita RecQ helikazių savybė – efektyviai šalinti G4 DNR darinius (24 pav.). Daug yra paaiškinimų, kaip HR gali atnaujinti DNR sintezę suirus replikacinei šakutei. Manoma, kad pažeidimos pirmaujančioje grandinėje gali sukelti šakutės grįžimą

(regresija) ir susidaro keturšakė struktūra, primenanti Holidėjaus jungtį (25 pav.). Tokios molekulės gali būti sukarpomos (kaip ir Holidėjaus jungtis) ir dėl to gali susidaryti DGT, kurie bus taisomi HR būdu, arba gali įvykti šakutės judėjimo krypties perjungimas ir replikacija atsinaujins, nes pažeista sritis bus replikuota pagal kitą, naujai susintetintą DNR. Nesant RecQ helikazių, keturšakės molekulės subrandinimas vyksta pirmuoju keliu, susidaro DGT, skatinama HR. Taip buvo nustatyta *E. coli*, kur užstrigusios replikacijos šakutės gelbėjamos panaudojant HR mechanizmą (Michel ir kt., 2001). Todėl replikacijos šakutės „sugražinimas“ galėtų užkirsti kelią pernelyg dažnai HR. RecQ helikazės gali sąveikauti su tokiais šakotomis molekulėmis ir jas subrandinti arba tam mobilizuoti kitus baltymus.



24 pav. RecQ helikazės gali pašalinti replikacijos metu susidarančias įvairaus sudėtingumo antrines struktūras (Bennett ir Keck, 2004)



25 pav. Replikacinės šakutės grįžimas, kurį gali katalizuoti RecQ helikazės

Yra duomenų, rodančių, kad eukariotų RecQ helikazės svarbios telomerų struktūrai palaikyti (Bennett ir Keck, 2004). Kadangi šiose chromosomos dalyse yra daug G, todėl jose turėtų susidaryti G4 dariniai, kuriuos pašalina RecQ baltymai. Be to, nustatyta, kad mielių Sgs1 baltymas dalyvauja nuo telomerazės nepriklausomame telomerinių sekų ilginiame. Šis vyksmas priklauso nuo HR ir reikalauja Sgs1 (Johnson ir kt., 2001).

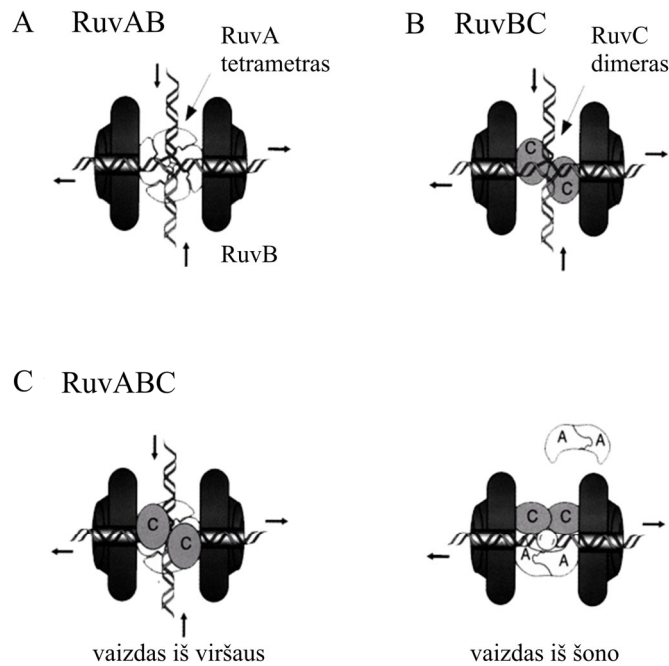
Apibendrinus galima pasakyti, kad RecQ šeimos helikazės yra labai svarbios koordinuojant DNR replikacijos, rekombinacijos ir reparacijos procesus bakterijose bei eukariotuose. Todėl mutacijos

genuose, koduojančiuose šiuos baltymus, sukelia genomo destabilizaciją ir su ja susijusius nepageidaujamus genetinės medžiagos persitvarkymus.

2.2.2.9. RuvAB baltymai

Rekombinacijos tarpiniai produktai dažniausiai sudaryti iš dviejų dgDNR molekulių, sujungtų Holidėjaus jungtimi (HJ). Kad rekombinacija būtų užbaigta, mainuose dalyvavusios molekulės turi būti atskirtos ir nuo jų pašalinti RecA baltymai. HJ gali migruoti susidarant DNR heterodupleksui. Teoriškai jos judėjimas yra izoenerginis, jis gali vykti spontaniškai. Kaip rodo tyrimai *in vitro* fiziologinėmis sąlygomis, savaiminis judėjimas yra neefektyvus. Jį galėtų vykdyti ir RecA, tačiau bakterijų ląstelėje tą žymiai efektyviau atlieka kiti baltymai (RuvAB kompleksas ir RecG baltymas). RuvA ir RecG specifiskai jungiasi su Holidėjaus jungtimi. RecG, pats būdamas ATPaze, gali katalizuoti grandinių migraciją, o RuvA tai vykdo tik kartu su RuvB, nes pastarasis pasižymi ATPaziniu aktyvumu. *In vitro* nustatyta, kad RuvA ir RuvB baltymai sąveikauja tiesiogiai. Esant RuvA, HJ migracijai vykdyti reikia 20–40 kartų mažesnės RuvB koncentracijos. RuvA svarbus nukreipiant RuvB į reikiamą taikinį (HJ). Tačiau RuvA vaidmuo tuo neapsiriboja. Jis svarbus ir HJ migracijos metu galbūt dėl to, kad palaiko ją tam tikroje erdvinėje būsenoje. Pagal vieną iš naujesnių modelių RuvA baltymas, sudarytas iš keturių subvienetų, jungiasi prie HJ ir pakeičia jos erdvinę struktūrą į išskleistą kvadratinę plokštuminę. DNR molekulių grandinės guli baltymo vagelėse ir nepersidengia. Du RuvB heksamerai jungiasi iš priešingų pusių prie HJ vietų, kur yra heterodupleksai. Tada prie tokio baltymų ir DNR komplekso jungiasi dar vienas RuvA baltymų ketvertas ir uždaro DNR į vadinamąją „vėžlio kiauto“ struktūrą. Jos egzistavimą patvirtina *Mycobacterium leprae* RuvA baltymų kristalinė būseną, primenanti vėžlio kiautą su keturiomis angomis DNR molekulėms (Roe ir kt., 1998). RuvB baltymai, prisijungę iš RuvA šonų, traukia per savo angas dgDNR ir taip priverčia HJ migruoti. Šis baltymų kompleksas vadinama RuvAB translokaze (Kuzminov, 1999). RuvAB gali vykdyti šią reakciją net esant nemažoms nehomologinėms sritims (~1 kbp). DNR spiralės judėjimo metu yra laikinai išvyniojamos (26 A pav.).

RuvAB kompleksas skiriasi nuo paprastų helikazių, nes jis naudoja ATP tik grandinių atskyrimo etape, t. y. ne stochiometriškai kaip kiti helikazinių aktyvumą turintys baltymai. Savo heksamerine žiedine struktūra RuvB panašus į SV40 viruso T antigeną, dalyvaujantį DNR replikacijoje.



26 pav. Holidėjaus jungties ir RuvA, RuvB bei RuvC baltymų sąveikos modelis. A – RuvAB komplekso migracija. RuvA atpažįsta Holidėjaus jungtį. RuvB vykdo Holidėjaus jungties migraciją. Rodyklėmis parodyta DNR judėjimo kryptis; B – RuvBC komplekso susidarymas; C – hipotetinio RuvABC komplekso vaizdas iš viršaus ir šono. RuvA ir RuvC prisijungę iš skirtingų Holidėjaus jungties pusių stabilizuoja RuvB prisijungimą. RuvAB vykdo grandinių migraciją, o RuvC „skaity” DNR pirminę seką tol, kol suranda tinkamą vietą grandinių skaldymui

RecG baltymas, vykdydamas HJ migraciją, hidrolizuoja žymius ATP kiekius, todėl jis labiau yra paprasta helikazė. RuvAB ir RecG funkcijos nėra visiškai ekvivalentiškos. RuvAB⁻ fenotipo mutantai, skirtingai nuo RecG⁻, yra jautresni UV spinduliuotei. RecG vykdoma grandinių migracija mažiau pakanti heterologiniams intarpams.

2.2.2.10. RuvC baltymas

Rekombinacijoje dalyvavusias molekules atskiria *ruvC* geno produktas. RuvC baltymas jungiasi prie Holidėjaus struktūros kaip dimeras. Manoma, kad tuo metu nuo RuvAB translokazės atšoka vienas RuvA subvienetų ketvertas. Kerpamos grandinė turi būti homologiškos. Kirpimo vietoje aptinkama seka: 5'-[A/T]TT↓[G/C]-3' (Shah ir kt., 1994, Shida ir kt., 1996). Po šio kirpimo DNR molekulės atsiskiria, kiekvieną jų trūkio vietą sujungia DNR ligazė. Dabar jau aišku, kad visi trys baltymai – RuvA, RuvB, RuvC – tam tikru momentu būna prisijungę prie HJ (26 C pav.). Kadangi *ruv* mutantų fenotipai rekombinacijos atžvilgiu yra vienodi, todėl manoma, kad jų koduojami baltymai veikia kartu (Mandal ir kt., 1993). Toks Ruv baltymų ir DNR darinys kartais vadinamas rezolvasoma (Sharples ir kt., 1999). Ruv⁻ mutantuose jautrumas UV yra padidėjęs, o rekombinacijos dažnis sumažėjęs. Genetinė analizė rodo, kad *E. coli*, be RuvC, turi ir kitą rezolvazę, nes *ruvC* mutacijos nežymiai pažeidžia rekombinacijos eigą laukiniame kamiene. Kiekvienu atveju šios mutacijos gali būti komplementuotos padidinus RusA (kriptinės *E. coli* rezolvazės) raišką. Tai rodo, kad visuose mutantuose yra pažeistas grandinių atskyrimas ir visi trys Ruv baltymai veikia šioje stadijoje.

In vitro nustatyta, kad RuvB sustiprina RuvC prisijungimą prie HJ ir skatina pastarojo endonukleazinį aktyvumą. RuvC taip pat skatina RuvB vykdomą HJ migraciją. Tačiau *in vitro* nenustatyta, kad RuvA ir RuvC baltymai tiesiogiai sąveikautų. HJ, būdama išskleistoje būsenoje, turi dvi puses, kurios skiriasi DNR grandinių orientacija HJ centro atžvilgiu. Vienoje pusėje DNR grandinių 5'→3' kryptis sutampa su laikrodžio rodyklės kryptimi, o žiūrint iš kitos pusės, yra priešinga laikrodžio rodyklės kryptimi. RuvA ir HJ kristalų tyrimai rodo, kad RuvA tetrameras jungiasi prie vienos pusės (5'→3' prieš laikrodžio rodyklę), o kitą pusę palieka RuvC dimerui.

Genetiniai *ruv* mutantų tyrimai rodo, kad Ruv baltymai vykdo RecA nukleoproteininių filamentų, susidariusių ant dgDNR, disociaciją (Adams ir kt., 1994). Jeigu *E. coli* kamiene yra padidėjusio aktyvumo RecA441 baltymas, tai tokių ląstelių *ruv* mutantai negyvybingi.

Genai, koduojantys RuvA ir RuvB homologus, plačiai paplitę bakterijose. Tačiau RuvC homologų pasitaiko rečiau. *ruvA* ir *ruvB* genai dažnai sudaro operoną, kartais jame yra ir *ruvC*. Tačiau kai kuriais atvejais (*Synechocystis*) šie genai išsklaidyti po genomą ir yra skirtinguose operonuose (Sharples ir kt., 1999). RuvC neaptikta *Mycoplasma genitalium*, *M. pneumoniae*, *B. subtilis*, *Borrelia burgdorferi* genomuose. Kai kurie iš šių organizmų turi RusA rezolvazę, tačiau minėtose mikoplazmų rūšyse nėra RuvC ir RusA baltymų genų.

2.2.2.11. SbcB baltymas (egzonukleazė I)

Genas *sbcB* dar vadinamas *xonA*. Geno alelis *sbcB* buvo atrastas kaip rekombinacijos ir reparacijos atžvilgiu defektyvaus fenotipo supresorius *recBC⁻* kamiene (Kushner ir kt., 1971). Ši *sbcB* mutacija atkuria konjugacinės rekombinacijos dažnį ir atsparumą UV bei mitomicinui beveik iki normalaus lygio, nes slopina SbcB baltymo destruktivųjį egzonukleazinį 3'→5' aktyvumą. Kai nėra šio aktyvumo, neskaldomi viengrandžiai 3' galai, kurie gali būti panaudoti RecF rekombinacijos kelyje.

Egzonukleazės I struktūriniame gene aptinkama dviejų rūšių mutacijų. Mutacijos, vadinamos *sbcB*, atkuria rekombinaciją ir atsparumą UV spinduliams *recBC⁻* ląstelėse. Kita mutacija, vadinama *xonA*, slopina tik jautrumą UV, bet nepašalina HR sutrikimų *recBC⁻* genotipo bakterijose (Kushner ir kt., 1972). Egzonukleazės I aktyvumas abiejų rūšių mutantuose yra stipriai sumažėjęs. Tačiau iki šiol neaišku, kas lemia šių dviejų alelių skirtumus (Spies ir Kowalczykowski, 2005). Kitas šių alelių skirtumas pasireiškia dėl nevienodo poveikio nedėsningai rekombinacijai. Mutacijos *xonA* saite padidina nedėsningos rekombinacijos dažnį. RecBC⁻ fenotipui slopinti dar reikia mutacijos *sbcC* gene. Egzonukleazė I yra 53 kDa baltymas, kuris turi 3'→5' egzonukleazinį aktyvumą, pasireiškiantį vgDNR atžvilgiu. Jeigu vgDNR 3'-galas yra fosforilintas, fermentas hidrolizės nevykdo.

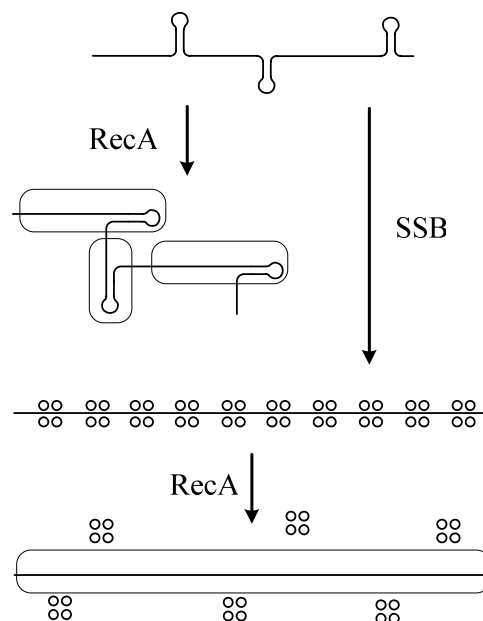
2.2.2.12. SbcC ir SbcD baltymai

Šiuos baltymus koduojantys genai buvo atrasti mutagenezės būdu. Mutacija bent viename iš jų buvo reikalinga tam, kad kartu su *sbcB⁻* galėtų slopinti *recBC⁻* kamienų mutantinį fenotipą. Genai

sbcC ir *sbcD* persidengia. Jie koduoja du SbcCD nukleazės subvienetus *E. coli* ląstelėse (Gibson ir kt., 1992; Spies ir Kowalczykowski, 2005). Neseniai nustatyta, kad SbcC ir SbcD gali pašalinti baltymus, kovalentiškai prisijungusius prie DNR molekulių galų (Connelly ir kt., 2003). Taip pat ši nukleazė pasižymi nuo ATP priklausomu dgDNR egzozonukleaziniu aktyvumu, gali skaldyti palindromų vietoje susidarančius segtukus ar kryžiaus pavidalo DNR molekulių darinius. Šie baltymai svarbūs ir tuo, kad yra eukariotų Rad50 ir Mre11 baltymų, dalyvaujančių įvairiuose eukariotų rekombinacijos procesuose, homologai. Jų homologai taip pat aptinkami bakteriofaguose ir archebakterijose. Kai kurių bakterijų rūšių (pavyzdžiui, *Neisseria gonorrhoeae*) genome šių genų nėra.

2.2.2.13. SSB baltymas

Mutacija *ssb* gene neigiamai veikia tuos biocheminius procesus, kurie susiję su laikinu vgDNR susidarymu: replikaciją, rekombinaciją, reparaciją, mutagenezę. Temperatūrai jautrios *ssb-1* mutacijos pagalba šis genas lokalizuotas *E. coli* genolapio 92 min (Glassberg ir kt., 1979). Be replikacijos sutrikimų, šiam mutantui būdingas ir bendras rekombinacijos dažnio sumažėjimas tam tikroje temperatūroje. Pavyzdžiui, fago P1 vykdomos transdukcijos dažnis *ssb-1* mutante sumažėjęs penkis kartus. Šio geno produktas yra spiralę destabilizuojantis baltymas, žinomas SSB (angl. *single strand binding*) pavadinimu. Vienintelis iki šiol nustatytas šio baltymo aktyvumas – gebėjimas jungtis prie vgDNR. Homologinės rekombinacijos metu SSB skatina grandinių mainus, nes apsaugo susidarančią vgDNR nuo kai kurių nukleazių. Sprendžiant pagal klonuoto *ssb* geno nukleotidų seką, jo produktas turėtų būti sudarytas iš 177 aminorūgščių liekanų. Fiziologinėmis sąlygomis SSB yra tetrameras. Kiekvienas subvienetas turi jungimosi prie DNR saitą (27 pav.). Tokio saito dydis, priklausomai nuo sąlygų (ypač nuo druskų koncentracijos), gali būti nuo 35 iki 65 nukleotidų.



27 pav. SSB ir taisyklingo RecA nukleoproteininio filamento susidarymas (Kuzminov, 1999). Vientisa linija pavaizduota vgDNR; SSB baltymas – karoliukų ketvertais; RecA filamentas – stačiakampiu apvaliais kampais

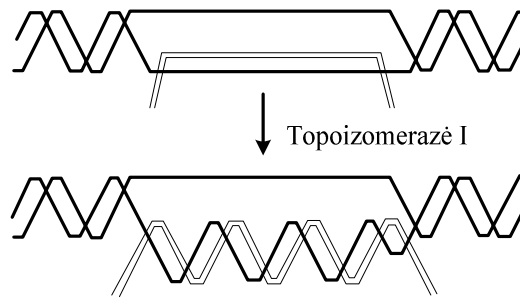
Dėl *vgDNR* SSB konkuruoja su *RecA*, tačiau prisijungęs *ATP*, *RecA* įgyja gebėjimą pakeisti SSB ant *vgDNR* molekulės. *E. coli* ląstelėse šią *RecA* savybę aktyvuoja *RecBCD* ar *RecFOR* baltymai (žr. 2.2.2.2. ir 2.2.2.4. skirsnius). SSB baltymas geba prisijungti ir prie *vgDNR* sričių, sudarančių antrines struktūras ir sunkinančių *RecA-ATP* sąveiką su *DNR*. Po to *RecA-ATP* pašalina SSB nuo tokios grandinės, todėl gali susidaryti vientisas nukleoproteininis *RecA-DNR* filamentas. SSB svarbus ne tik presinapsinėje, bet ir postsinapsinėje *DNR* mainų fazėje. Šiuo atveju jis užkerta kelią susidaryti tinklinėms struktūroms tarp *DNR* molekulių, nes po mainų atsiradę išstumtos *vgDNR* galai kuri laiką nedalyvauja rekombinacijoje dėl SSB veikimo.

2.2.2.14. *DNR* topoizomerazės

E. coli chromosoma yra neigiamai superspiralizuota. Ląstelės baltymai prisitaikė sąveikauti su tokia *DNR*. Superspiralizacijos sumažėjimas slopina homologinę rekombinaciją. Superspiralizuotos *DNR* fragmento pakeitimas svetima *DNR* turėtų sumažinti supervijų skaičių. Jis energetiškai būtų naudingas tuo, kad tokioje molekulėje sumažėtų įtempimas. Visi superspiralizacijos pokyčiai ląstelėje yra susiję su baltymų, vadinamų topoizomerazėmis, veikla. Šie fermentai katalizuoja viengrandžių ir dvigrandžių *DNR* trūkių susidarymą ir pašalinimą, o kartu ir *DNR* superspiralizaciją, ir atpalaidavimą. Jos yra dviejų tipų: I tipo topoizomerazės relaksuoja superspiralizuotą *DNR*, kirpdamos vieną *DNR* duplekso grandinę; II tipo topoizomerazės katalizuoja superspiralizaciją, sukeldamos ir pašalindamos dvigrandžius trūkius *DNR* molekulėje.

I tipo *DNR* topoizomerazės skirstomos į dvi negiminiškas grupes A ir B. A grupei priskiriami fermentai, kurie sudaro laikiną kovalentinę jungtį su įkirptos grandinės 5' galu. Jie paprastai sąveikauja tik su neigiamai superspiralizuota *DNR*. Šiai grupei priklauso *E. coli* topoizomerazė I (ω baltymas), topoizomerazė III iš termofilinių prokariotų, mielių topoizomerazė 3. B grupės topoizomerazės sudaro kovalentinę jungtį su įkirptos *DNR* 3'-galu. Jos gali atpalaiduoti tiek teigiamai, tiek neigiamai superspiralizuotą *DNR*. Iki 1994 m. šios grupės fermentai buvo aptinkami tik eukariotuose ir kai kuriuose virusuose. 1994 m. iš hipertermofilinės metanbakterės *Methanopyrus kandleri* išskirta *DNR* topoizomerazė V, kuri priklauso šiai grupei.

Topoizomerazė I (ω -baltymas). Mutacijos *topA* gene mažina *E. coli* augimo greitį, didina jautrumą UV ir MMS, lėtina transpoziciją. *TopA⁻* fenotipo mutantams būdinga sumažėjusi (1000 kartų) vidumolekulinė plazmidinė rekombinacija bei redukuota *recA* geno raiška. *TopA⁻* mutantinį fenotipą slopina mutacijos genuose, koduojančiuose *DNR* girazę bei topoizomerazę IV. *E. coli* topoizomerazė I gali komplementuoti kepimo mielių ląstelių, turinčių *top3* mutaciją, sulėtėjusio augimo fenotipą. Galbūt topoizomerazės I vaidmuo genetinėje rekombinacijoje yra stabilizuoti *DNR* molekulių poravimąsi vidiniuose homologijos saituose (28 pav.).



28 pav. Topoizomerazė I mažina neigiamos DNR superspiralizacijos laipsnį ir dėl to skatina DNR molekulių poravimąsi RecA katalizuojamoje mainų reakcijoje (Kuzminov, 1999)

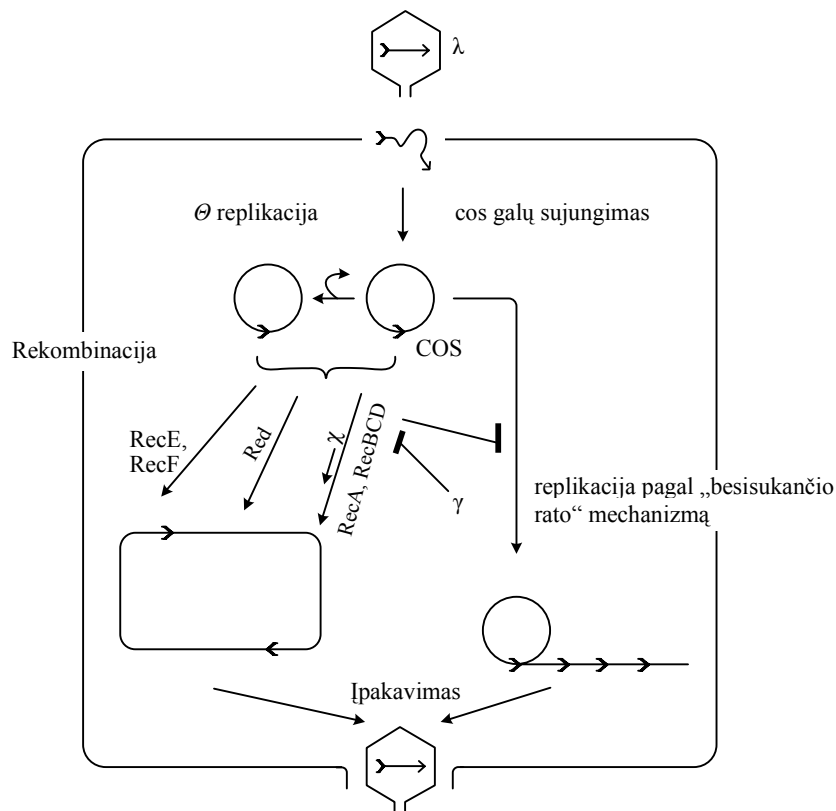
Topoizomerazė II (DNR girazė). Du jos subvienetus koduoja *gyrA* ir *gyrB* genai. 1976 m. M. Gelertas (M. Gellert) atrado šį baltymą kaip aktyvumą skatinantį fago λ integracinę rekombinaciją *in vitro*. DNR girazė palaiko *E. coli* ląstelės chromosomos neigiamos superspiralizacijos būseną. Biologiškai aktyvus baltymas yra A_2B_2 būsenoje. Neigiama DNR duplekso superspiralizacija palankiai veikia RecA katalizuojamą vgDNR įterpimą į dgDNR *in vitro*. Įterpimo vietoje sumažėja neigiamos superspiralizacijos laipsnis dgDNR molekulėje. Vėliau, veikiant topoizomerazei, jis vėl gražinamas į buvusį lygį. DNR girazės mutantuose arba ląstelėse, paveiktose šio fermento inhibitoriais, yra stipriai pažeista UV sukeltų pažeidimų DNR molekulėje rekombinacinė reparacija (Hays ir Boehmer, 1978). Girazės inhibitoriai sumažina nuo *recA*⁺ priklausomą reparaciją ir rekombinaciją tarp tandeminių pasikartojančių sekų UV apšvitintame fage λ . Ląstelių ekstraktuose DNR girazės inhibitoriai iš dalies (50–80 proc.) slopina tetramerinių plazmidžių vortimą mažesnėmis. DNR girazė ypač svarbi bakterijų nedėsningai rekombinacijai (žr. 6.1. skirsnį).

2.2.3. Red rekombinacijos kelias

Netrukus po to, kai *E. coli* buvo atrastas *recA* genas (Clark ir Margulies, 1965), nustatyta, kad *recA*⁻ mutacijos neturi įtakos homologinei rekombinacijai tarp fago λ DNR. Nustatyta, kad fago λ genai *reda* ir *red β* yra reikalingi šiai nuo RecA nepriklausomai rekombinacijai (Franklin, 1967). Gauti *red*⁻ (angl. *recombination defective*) mutantai, kurių HR *E. coli* laukinio tipo kamienuose buvo daugiau ar mažiau pažeista ir visiškai nevyko *recA*⁻ kamiene. *reda* genas koduoja egzonukleazę. Genas *red β* koduoja baltymą, kuris vykdo vgDNR molekulių suporavimą homologijos vietose. Bakteriofago λ homologinės rekombinacijos sistema kartais vadinama Red keliu. Trečiasis genas – *red γ* būtinas *E. coli* RecBCD fermentui slopinti. Gam (γ) baltymas jungiasi prie RecBCD ir slopina jo aktyvumą (Karu ir kt., 1975). Gam analogus turi daugelis *E. coli* bakteriofagų, kurie sintetina linijinius savo genomus. Gaminantis šiam baltymui, *E. coli* kamienas darosi panašus į RecBC⁻ fenotipo mutantą. Siekiant standartizuoti λ genetinę nomenklatūrą pasiūlyta minėtus fago baltymus vadinti Exo, Bet, Gam. Nepaisant šių pastangų, mokslinėje literatūroje vartojami ir kiti anksčiau minėti baltymų pavadinimai.

Gautas egzonukleazės α baltymo kristalas ir nustatyta, kad tirpale jį sudaro trys žiedo subvienetai. Baltymas sąveikauja su linijine dgDNR. Judėdama dgDNR molekule, egzonukleazė skaldo vieną jos grandinę iš 5'galo. Taigi susidaro viengrandžiai 3'galai, kurie dalyvauja homologinėje

rekombinacijoje. *Red* produktas savo savybėmis panašus į RecE baltymą. Pats Red rekombinacijos kelias primena RecE kelią, kuris, manoma, taip pat yra faginės kilmės. Bet baltymas (β) jungiasi prie vgDNR, skatina grandinių susijungimą homologijos vietose ir katalizuoja jų mainus, kurių metu DNR duplekso grandinė pakeičiama jai homologiška vgDNR. Mainų reakcijai vykti reikalingas homologiškos sekos vgDNR tarpas dgDNR molekulėje. Mainai vyksta 5'→3' kryptimi vgDNR, prie kurios prisijungęs Bet baltymas. Kita galima šio baltymo funkcija – apsaugoti vgDNR galus, susidarantį veikiant Exo, nuo šeimininko nukleazų poveikio. Taigi fago λ rekombinacija gali vykti keturiais keliais: 1) Red, 2) RecBCD, 3) RecE, 4) RecF. Homologinė rekombinacija tarp fago λ molekulių yra svarbi fago genomo įpakavimui į kapsidę (29 pav.).



29 pav. Lizinis fago λ ciklas ir jo ryšys su rekombinacija. Monomeriniai fago genomo žiedai netinkami įpakavimui. Tinkama įpakavimui į galvutę fago DNR gali susidaryti rekombinacijos būdu (Red, RecBCD, RecE, RecF)

Prokariotų homologinės rekombinacijos tyrimai svarbūs tiek teoriškai, tiek praktiškai. Dabar aišku, kad evoliucijos eigoje šis procesas išliko ganėtinai konservatyvus. Todėl prokariotų baltymai bei jų veikla yra paradigma, su kuria gali būti lyginami eukariotų rekombinacijos komponentai. Ši informacija taip pat labai svarbi genetinėje inžinerijoje.

2.3. Eukariotų homologinė rekombinacija

Eukariotuose homologinė rekombinacija vyksta mejozės ir mitozės metu. Mejozinis krosingoveris – tai genetiškai determinuotas reiškinys, būtinas taisyklingam chromosomų pasiskirstymui į gametas. Jo metu susidarantys DGT yra genetiškai determinuoti. Mitozinis krosingoveris reikalingas dvi-

grandžių trūkių, atsiradusių somatinių ląstelių genetinėje medžiagoje, ištaisymui. Taigi abiem vyksmams reikalingas DGT susidarymas. Mielių ląstelėse mejozinio krosingoverio dažnis daugiau kaip tūkstantį kartų yra didesnis nei mitozinio. Tačiau mejozinė rekombinacija nėra paprastas procesas, vykstančių ląstelėse mitozės metu, pagreitinimas. Tarp šių dviejų reiškinių yra keletas svarbių skirtumų:

- mejozinė rekombinacija, kaip taisyklė, vyksta tarp homologinių chromosomų, o mitozinė – dažniau tarp seserinių chromatidžių;
- mejozinis krosingoveris yra griežtai reguliuojamas ir susijęs su interferencijos reiškiniu. Mejozinio krosingoverio metu susidaro sudėtinga nukleoproteininė struktūra, vadinama sineptoneminiu kompleksu.

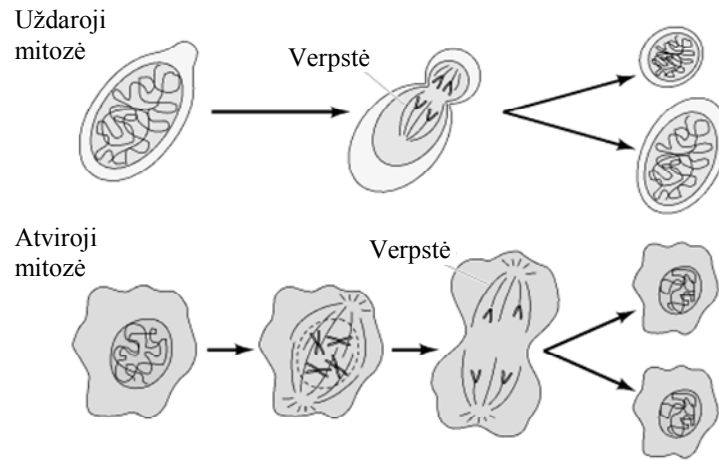
Homologinė rekombinacija vyksta mejozės profazėje. Ji prasideda leptotenoje ir pasibaigia diplo-tenoje.

2.3.1. Mejozės evoliucija

Šiuolaikiniame eukariotiniame organizme mejozę valdo šimtai genų. Nemaža jų dalis svarbi ir mitozei, tačiau kai kurie genai būdingi tik mejozei. Sunku įsivaizduoti mejozės atsiradimą be mitozės. Pastarosios aparatas taip pat reikalingas genomams mejozės metu atskirti. Darant prielaidą, kad mejozė kilo iš mitozės, bandoma išsiaiškinti, kurie mitozės mechanizmai galėjo būti svarbūs mejozės atsiradimui, o kurie ne. Šiuo požiūriu, verta tyrinėti įvairias mitozės formas. Žinomos dvi mitozės formos:

- uždaroji mitozė, aptinkama daugelyje vienaląsčių (pirmuonių, grybų, dumblių);
- atviroji mitozė, būdinga daugumai daugialąsčių organizmų.

Primityvi (uždaroji) mitozės forma ypatinga tuo, kad jos metu branduolio apvalkalas išlieka viso proceso metu ir genomų atskyrimas baigiasi branduolio persmauga (30 pav.). Dar vienas šios mitozės požymis – mažas chromatino kompaktizacijos laipsnis. Tokia mitozė, pavyzdžiui, vyksta tripanosomo- se ir kai kuriose mielėse. Manoma, kad tokių organizmų mejozė taip pat turėtų pasižymėti tam tikrais senoviniais požymiais. Be to, primityvios mejozės atvejų ieškoma organizmuose, kuriuose lytinis dauginimasis yra retas reiškinys. Kai kurios mieliagybių rūšys (pavyzdžiui, *S. cerevisiae*) turi normalią mejozę, panašią į aukštesnių eukariotų. Tačiau kai kuriose kitose, mejozės procesas labai primityvus. Toks jis yra *Schizosaccharomyces pombe*, todėl gali būti nagrinėjamas mus dominančiu klausimu. Šiame organizme mejozės metu nesusidaro sineptoneminis kompleksas, nėra krosingoverio interferencijos, vietoje centrosomos – jos primityvesnis variantas, vadinamas verpstės poliniu kūnu (angl. *spindle pole body*). Profazės metu ląstelės branduolys keletą kartų juda iš vieno ląstelės galo į kitą. Šiuos judėjimus valdo verpstės polinis kūnas, prisitvirtinęs prie vieno iš ląstelės polių. Tokie judesiai reikalingi krosingoveriui vykti. Čia krosingoverių dažnis mažesnis nei kepimo mielėse.



30 pav. Uždaroji ir atviroji mitozė (Cooper, 2000)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=mitosis,closed&rid=cooper.figgrp.1376>

Be to, galima daryti prielaidą, kad mejozės atsiradimas buvo neįmanomas be linijinių chromosomų, turinčių telomerus, susiformavimo. Kadangi neabejojama, kad organizmų formos, kuriose kilo šis reiškinys, seniai išnykusios ir visi samprotavimai šiuo klausimu yra hipotetiniai, vis dėlto galima manyti, kad pirmykštė mejozė buvo panaši į šiuo metu egzistuojančią *S. pombe*.

2.3.2. Su rekombinacija susiję reiškiniai, vykstantys mejozės metu

Rekombinacija mejozės metu pirmiausia susijusi su įvairiais chromosomų morfologijos bei elgsenos pokyčiais, naujų subląstelinių struktūrų susidarymu ir išnykimu bei pokyčiais DNR molekulėse. Susisteminta šių įvykių dinamika chronologine tvarka pateikiama 1 lentelėje.

1 lentelė. Įvykiai mejozės profazėje, susiję su homologine rekombinacija (pagal Roeder, 1997)

Mejozės profazės stadija	Chromosomų morfologija ir SK* morfogeneze	„Puokštės“ raida	Dvigrandžių trūkių (DGT) reparacija	Citologiniai rekombinacijos požymiai
Leptotena	Formuojasi ašiniai elementai	Telomeros pradeda suartėti	Atsiranda DGT	Ankstyvieji mazgeliai
Zigotena	Prasideda chromosomų sinapsė	Telomeros sudaro telkinius	Išnyksta DGT	Ankstyvieji mazgeliai
Pachitena	SK susidarymas	Telomeros atsiskyrusios	Dvigubos HJ	Vėlyvieji mazgeliai
Diplotena	SK iširimasis; chromosomų kondensacija		Rekombinacijos produktai	Chiazmai
Diakinezė	Tolesnė chromosomų kondensacija			Chiazmai

*SK – sineptoneminis kompleksas.

1 lentelėje pateikiama įvykių seka šiek tiek skiriasi įvairiose rūšyse. Pavyzdžiui, DGT dinamika atspindi jų raidą *S. cerevisiae*, o rekombinacinių mazgelių ir sineptoneminio komplekso formavimosi eiga tirta kituose organizmuose (kiekvieną iš lentelėje pateiktų reiškinių toliau aptarsime atskirai).

2.3.2.1. Chromosomų poravimasis ir sinapsė

Chromosomų paskirstymas į dukterines ląsteles mitozės metu yra daug paprastesnis nei mejozėje. Po replikacijos mitozėje kohezinai laiko seserines chromatides sukibusias. Jos išsidėsto ląstelės viduryje, po to pasiskirsto į dukterines ląsteles. Mejozės metu vyksta viena DNR replikacija ir du branduolio pasidalijimai. Prieš pirmąjį dalijimąsi homologinės chromosomos privalo susirasti viena kitą, susiporuoti, ir redukcinio dalijimosi metu tiksliai pasiskirstyti į dukterines ląsteles. Apie 30 proc. persileidimų yra sutrikusio chromosomų paskirstymo padarinys (Hassold ir Hunt, 2001). Tik nedaugelis žmogaus aneuploidijų leidžia embrionui išgyventi. Tas pats pasakytina ir apie kitų organizmų chromosomų pasiskirstymo sutrikimus. Nors nemaža dalis mechanizmų ir baltymų, dalyvaujančių šiame procese, evoliuciškai konservatyvūs, vis dėlto egzistuoja ir gana ryškūs tarprūšiniai skirtumai. Iki šiol neaišku, kaip mejozės profazėje homologinės chromosomos (homologai) suranda ir atpažįsta viena kitą. Įvairių rūšių organizmų homologinės chromosomos gali atpažinti viena kitą dėl skirtingų mechanizmų: DNR molekulių tarpusavio sąveikos, DNR ir baltymų sąveikos vadinamuosiuose poravimosi centruose, sąveikos tarp centromerų heterochromatino, telomerų tarpusavio ryšio ir chromosomų teritorijų susidarymo (Gerton ir Hawley, 2005). Šio klausimo sprendimą sunkina ir tai, kad daugelio organizmų homologinių chromosomų poravimasis skiriasi nuo jų sinapsės. Poravimasis – tai chromosomų išsidėstymas greta tam tikru atstumu. Sinapsė – artimas kontaktas tarp chromosomų susidarant sineptoneminiam kompleksui. Vienuose organizmuose homologai išsidėsto lygiagrečiai per visą savo ilgį, o daugelyje kitų – suartėja tik tam tikrais segmentais. Mutantų tyrimai rodo, kad poravimasis skiriasi nuo sinapsės. Gauti mutantai, kurių chromosomos poruojasi, tačiau sinapsė nevyksta, triploiduose visos trys chromosomos poravimosi metu išsidėsto greta, o sinapsėje konkrečiame taške dalyvauja tik dvi. Sineptoneminis kompleksas gali susidaryti ir tarp nehomologinių chromosomų, tačiau poruojasi tik homologinės chromosomos.

Visi lytiškai besidauginantys organizmai mejozės metu turi pirma suporuoti, sukabinti, po to pasiskirstyti chromosomas į dukterines ląsteles, tačiau tą atlieka pasitelkdami šiek tiek skirtingus mechanizmus. Vienas didžiausių skirtumų yra tai, kad kai kuriuose organizmuose (pavyzdžiui, mielėse, žinduoliuose) sinapsei vykti reikia rekombinacijos, o kiti (pavyzdžiui, musės, kirmėlės) naudoja mechanizmus, leidžiančius sinapsei vykti be rekombinacijos. Be to, yra organizmų (pavyzdžiui, *S. pombe*), kuriuose mejozės metu iš viso nesusidaro sineptoneminis kompleksas. Kodėl atsirado tokių skirtumų, neaišku. Homologų poravimasis daugelyje rūšių priklauso nuo mejozei specifinių DGT susidarymo. Pastaruosius, kaip matysime vėliau, sukelia baltymai, homologiški *S. cerevisiae* baltymui Spo11 – jie ir pradeda rekombinaciją. Kitose rūšyse homologų poravimuisi nereikia DGT. Be to, yra rūšių, kurių

homologinių chromosomų jungimasis į poras įvyksta anksčiau nei atsiranda DNR trūkių. Molekulinė chromosomų poravimosi, kuris nepriklauso nuo DGT, prigimtis neaiški. Galbūt jį šiuo atveju lemia dviejų DNR dupleksų homologiškų sekų fizinės sąveikos, tačiau įvairovė neapsiriboja aprašytais atvejais. Nors daugelio organizmų (pavyzdžiui, kukurūzų, pelės, žmogaus) chromosomos poruojasi tik generatyvinėse ląstelėse, bet pasitaiko ir išimčių. Kai kurių organizmų, pavyzdžiui, dvisparnių būrio atstovų, homologinių chromosomų poravimasis vyksta ir somatinėse ląstelėse. Dar prieš prasidedant mejozei *Drosophila melanogaster* chromosomos jau būna išsidėsčiusios poromis. Toks chromosomų poravimasis somatinėse ir generatyvinėse *D. melanogaster* ląstelėse žinomas jau beveik 100 metų. Vaisinė muselė nėra unikali šiuo požiūriu rūšis. Heksaploidinių kviečių somatinėse ląstelėse taip pat vyksta homologinių chromosomų poravimasis. Vaisinės muselės patinėliuose mejozinis homologų poravimasis yra paprasčiausia somatinio poravimosi tąsa. Manoma, kad jį nulemia heterochromatino sričių tarpusavio sąveikos. Yra daug duomenų, patvirtinančių, kad egzistuoja specifinės cis-padėtyje veikiančios sekos, kurios dalyvauja musių ir kirmėlių homologinių chromosomų atpažinime. Nematodo *Caenorhabditis elegans* tokios sekos buvo atrastos kiekvienos iš šešių chromosomų galuose ir pavadintos HRR (angl. *homologue recognition regions*). Kiek kitokio pobūdžio sekos dalyvauja X ir Y chromosomų poravimesi. *D. melanogaster* patinėliuose šios chromosomos poruojasi dėl sąveikos tarp rRNR genų. Panašią funkciją atlieka žmogaus X ir Y chromosomose esantis pseudoautosominis rajonas, PAR1 – vienintelė didesnės homologijos tarp šių chromosomų vieta. Paukščių Z ir W chromosomos taip pat nehomologiškos. Jų poravimasis ir genetiniai mainai taip pat priklauso nuo pseudoautosominio rajono sekų. Ančiasnapis turi net 10 lytinių chromosomų. Todėl penkios heterosomų poros privalo turėti unikalius pseudoautosominius rajonus ar poravimosi ir rekombinacijos centrus, kad susidarytų normalios XXXXX gametos patelėse ir YYYYY – patinėliuose.

Atlikti įvairių organizmų citogenetiniai tyrimai rodo, kad skirtingos chromosomos užima tam tikrus branduolio domenų arba teritorijas. Tai turėtų skatinti chromosomų poravimąsi, nes tokiu būdu efektyviai sumažinamas branduolio tūris.

Telomerų susitelkimas į „puokštės“ pavidalo struktūrą mejozės metu, manoma, taip pat padeda homologų poravimuisi ir rekombinacijai. *S. pombe* mutantai, kurių sutrikęs telomerų suartėjimas ir „puokštės“ susidarymas pasižymi sumažėjusiu rekombinacijos dažniu.

2.3.2.1.1. DGT reikšmė homologinių chromosomų poravimesi

Manoma, kad daugelyje rūšių mejozei specifiskų DGT sukelta DNR molekulių sąveika su gimiškomis sekomis homologinėje chromosomoje padeda homologams išsidėstyti greta vienas kito ankstyvos-vidurinės leptotenos stadijoje. Tokių nuo DGT priklausomų homologų sąveikų vietos matomos kaip 400 nm tiltai tarp chromosomų ašių. DGT susidarymas, taigi ir poravimasis, priklauso ir nuo chromatino struktūros. DGT linę susidaryti atviruose chromatino rajonuose arba jautriose nukleazėms chromatino vietose. Histonų H2B ubikvitilimas būtinas mobilizuojant ir (arba) stabilizuojant DGT

susidarymo mechanizmą. Nors yra nustatytas ryšys tarp chromatino struktūros, homologų poravimosi ir rekombinacijos, šių įvykių tarpusavio priklausomumas dar tik pradedamas tirti.

Nustatyta, kad mielėse chromosomų poravimasis susijęs su homologijos paieška visame genome. Jeigu kokio nors mielių geno kopija įterpiama į naują vietą genome, mejozės metu vyksta jos sąveika su įprastoje chromosomos vietoje esančia to geno kopija. Homologijos paiešką tarp chromosomų tikriausiai vykdo *E. coli* rekombinacijos baltymo RecA homologai Rad51 ir Dmc1. Pavyzdžiui, mielėse *S. cerevisiae* ektočinės rekombinacijos dažnis tarp vienodų sekų, esančių homologinėse chromosomose, nedaug skiriasi nuo ektočinės rekombinacijos tarp sekų, esančių heterologinėse chromosomose. Ektočinė rekombinacija gali sukelti genomo nestabilumą. Mielėse šios rekombinacijos dažnis gana didelis. O kitame eukariote, vaisinėje muselėje, jis daug mažesnis. Greita ir nuo DGT nepriklausoma sinapsė ir sineptoneminio komplekso susidarymas muselėse, kirmelėse ir kai kuriuose kituose organizmuose galbūt yra būdas užkirsti kelią ektochinei rekombinacijai. Kaip rodo mutantų tyrimai, nehomologinių chromosomų sinapsę gali slopinti Mnd1-Hop2 baltymų kompleksas. Neseniai nustatyta, kad dvigubuose *mnd1rad51* ir *hop2rad51* mielių mutantuose ektočinės rekombinacijos dažnis tarp nehomologinių chromosomų yra daug didesnis nei pavieniauose šių genų mutantuose.

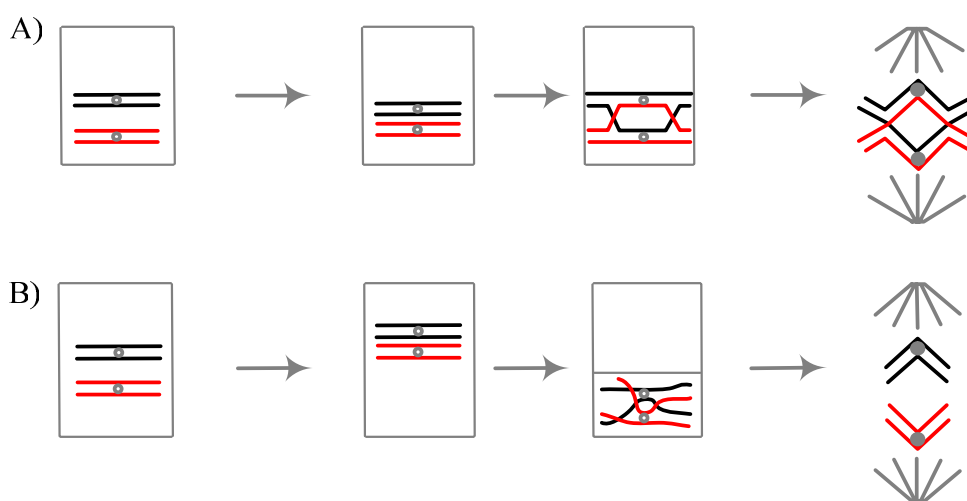
Sinapsės susidarymas daugelyje organizmų taip pat priklauso nuo DGT. Mielėse, vairyneje, pelėje, turinčiuose mutaciją *SPO11* geno homologuose, sinapsė labai redukuota arba iš viso neaptinkama. Manoma, kad gali būti du nuo rekombinacijos priklausomo homologinių chromosomų poravimosi būdai: vienas iš jų priklauso nuo Rad51 gebėjimo aptikti homologiškas sekas, o kitas siejamas su Dmc1 ir Mnd1-Hop2 baltymų veikimu. Tyrimai rodo, kad Mnd1-Hop2 heterodimeras daugiau kaip tris kartus skatina Dmc1 vykdomą grandinės įterpimą. Ne visi organizmai turi *DMC1*, *HOP2* ir *MND1* ortologus. Juos turi žinduoliai, augalai, pirmuonys ir mielės, bet neturi musės, kirmelės bei kai kurie grybai (pavyzdžiui, *Neurospora crassa*). Galbūt tai nulemia, kad pirmosios grupės organizmuose sinapsei ir sineptoneminiam kompleksui susidaryti reikalingi DGT, o antrosios ne (2 lentelė).

2 lentelė. Homologinių chromosomų poravimosi ir sinapsės įvairiuose organizmuose savybių palyginimas (Gerton ir Hawley, 2005)

Pirmas būdas (pavyzdžiui, musės, kirmelės)	Antras būdas (pavyzdžiui, mielės, pelė, žmogus)
1. Nuo DGT nepriklausomas homologinių chromosomų poravimasis	1. Nuo DGT priklausomas homologų poravimasis
2. Mažas ektočinės rekombinacijos dažnis	2. Didelis ektočinės rekombinacijos dažnis (mielėse)
3. Nėra Mnd1-Hop2	3. Mnd1-Hop2 homologai aptinkami
4. Rekombinacija priklauso nuo Rad51	4. Rekombinacija priklauso nuo Dmc1

N. Kleckner nuomone, ankstyvas homologų poravimasis mejozėje gali būti susijęs su netvirtų paraneminių jungčių tarp DNR dupleksų susidarymu (Kleckner, 1996). Eksperimentiškai nustatyta, kad bakterijų RecA baltymas homologijos vietose tarp DNR molekulių gali sudaryti tokias paranemines jungtis. Aptariamam klausimui įdomūs chromosomų poravimosi tyrimai organizmuose, kuriuose nevyksta mejozinė rekombinacija, arba kurių nerekombinuoja tik tam tikros chromosomos. Pavyzdžiui, mejo-

zinis krosingoveris nevyksta *Drosophila* patinėliuose ir *Bombyx mori* patelėse, o taip pat vaisinės muselės (*D. melanogaster*) patelių ketvirtojoje homologinių chromosomų poroje. Nors *Drosophila* patinėliuose nevyksta mejozinė rekombinacija, nesusidaro SK, tačiau chromosomos poruojasi (31 pav.). Poravimosi metu susidaro bivalentai, kurie išsidėsto tam tikrose profazinio branduolio vietose. Toks chromosomų uždarymas į savotiškas „kišenes“, dar vadinamas chromosomų teritorijomis, matyt, yra pakankamas „surakinti“ homologus tarpusavyje bent jau centromeros rajonais ir užtikrinti taisyklingą chromosomų paskirstymą. Tradicinės mejozės metu šią funkciją atlieka chiazmai, o *B. mori* ląstelėse – sineptoneminis kompleksas, kuris šio organizmo ląstelėse egzistuoja labai ilgai, net iki anafazės I (Hawley, 2002). Vaisinės muselės X ir Y chromosomų tyrimai rodo, kad šios chromosomos poruojasi tik vienoje vietoje, konkrečiai *bobbed* lokuse, kuriame sutelkti 18S-28S rRNR genai. O poravimasis tarp didžiųjų chromosomų (2 ir 3) muselės patinėliuose prasideda daugelyje euchromatino vietų. Tačiau toliau šis procesas vyksta dalyvaujant heterochromatino sritims ir tarp jų susidarantioms sąsajoms. Nei lytinių chromosomų, nei autosomų poravimosi atveju genetiniai mainai patinėliuose nevyksta.

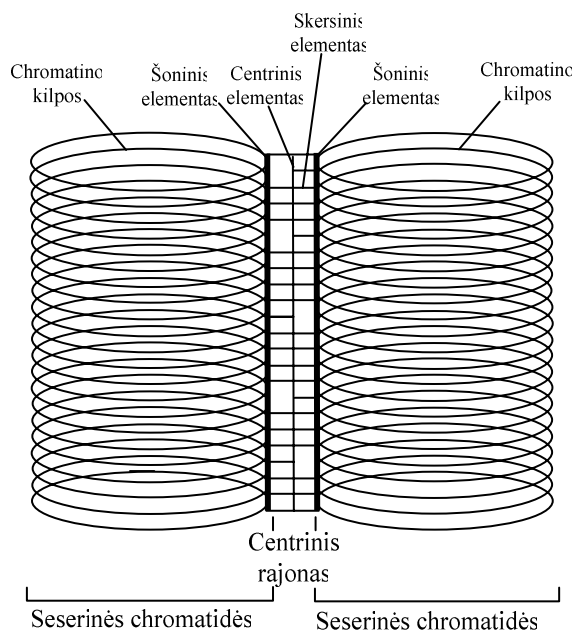


31 pav. Mejozė *Drosophila* patinėliuose (pagal Hawley, 2002). Tradicinė mejozė (A), kurios metu susidaro chiazmai ir netradicinė mejozė vaisinės muselės patinėliuose (B), kurios metu chiazmai nesusidaro (paveiksle parodyta tik vienos homologinių chromosomų poros teritorija)

2.3.2.2. Sineptoneminis kompleksas

1956 m. pirmą kartą aprašė M. J. Moses ir D.W. Fawcett (Zickler ir Kleckner, 1999). Sineptoneminis kompleksas – tai mejozei būdinga subląstelinė struktūra. SK susidaro tarp homologinių chromosomų mejozės profazėje (1 lentelė). Leptotenoje pradeda formuotis ašiniai elementai – tai baltymų struktūros, kurias sudaro dvi vienos chromosomos chromatidės. Zigotenoje homologinių chromosomų ašiniai elementai suartėja visu ilgiu ir susijungia baltymais, sudarydami SK centrinį rajoną (32 pav.). Subrendusiame SK ašiniai elementai vadinami šoniniais ir yra vienas nuo kito vienodu maždaug 100 nm atstumu. Kiekvienas SK yra apsuptas chromatino kilpų, kurios prisitvirtinusios prie šoninių elementų. Labai nedaug DNR yra centriniam rajone. Tarp šoninių elementų centriniam rajone susidaro

centrinis ir skersiniai elementai. Vieni skersiniai elementai kerta visą centrinį rajoną, o kiti siekia tik centrinį elementą.

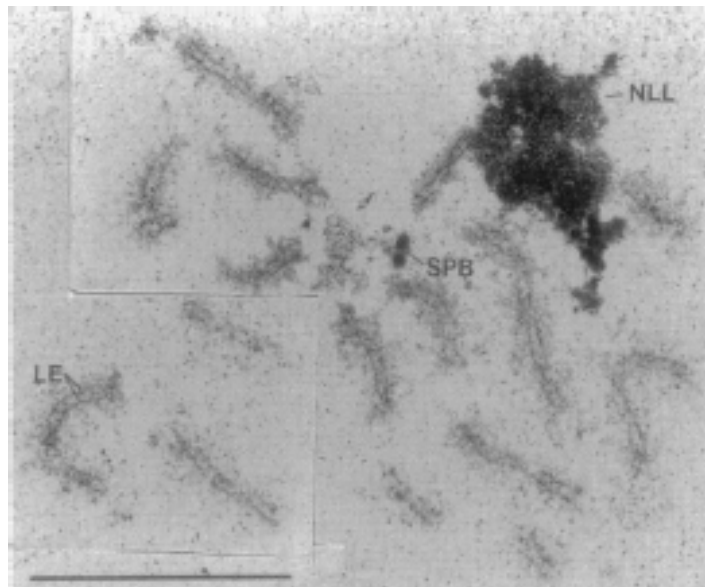


32 pav. Sineptoneminio komplekso diagrama (pagal Roeder, 1997)

Į SK įeinančių chromosomų DNR yra chromatino kilpų pavidalo. Kiekviena kilpa savo pagrindu prisitvirtinusi prie šoninio elemento. Šių kilpų dydis įvairiose rūšyse nevienodas. Todėl labai skiriasi ir DNR kiekis, tenkantis SK ilgio vienetui. Pavyzdžiui, 1 μm SK ilgio tenka 1200 kbp žmogaus, 500 kbp mielių DNR. Manoma, kad kilpų ilgis gali priklausyti nuo DNR sekų, kuriomis jos sąveikauja su šoniniu elementu, bei chromosomos struktūros. Pavyzdžiui, kilpų dydis 2–3 kartus mažesnis telomeriniuose galuose. Taip pat svarbus ir ląstelių tipas, nes kai dirbtinė chromosoma, susidedanti daugiausia iš žmogaus DNR, dauginama mielėse, žmogaus DNR kilpos pasidaro mielių DNR kilpų dydžio. SK diagrama sukurta remiantis stebėjimais elektroniniu mikroskopu. Mikroskopu SK rasta įvairių organizmų mejozinėse ląstelėse (33, 34 pav.).



33 pav. Keturi SK drugio *Hyalophora columbia* branduolyje. Matomi šoniniai elementai ir chromatino kilpos (preparatas nudažyta sidabro nitratu); vaizdas gautas elektroniniu mikroskopu (Roeder, 1997)



34 pav. *Saccharomyces cerevisiae* branduolys pachitenos stadijoje. Nuotraukoje matomos 16 chromosomų, kurių kiekvienoje yra du šoniniai elementai (LE), susiformavęs SK centrinis elementas ir chromatino kilpos. Taip pat matomas branduolėlis (NLL) ir verpstės poliniai kūnai (SPB). Juostelė = 3µm (Kleckner, 1996)

SK susidarymas tarp homologinių chromosomų prasideda keliose vietose dalyvaujant vadinamajam sinapsės iniciacijos kompleksui, į kurį įeina bent du baltymai (Zip2, Zip3) (Chua ir Roeder, 1998). Šis kompleksas skatina Zip1 baltymo, kuris aptinkamas SK centriniam rajonui, polimerizaciją. Zip1 suartina homologines chromosomas per visą jų ilgį. Tyrimai, atlikti naudojant antikūnus, parodė, kad sinapsės iniciacijos kompleksas gana tolygiai išsidėstęs išilgai homologinių chromosomų.

Į SK sudėtį įeina ir daugiau baltymų: Red1, Hop1, Mek1, SYCP1, SYCP2, SYCP3 ir kt. (Page ir Hawley, 2004). Red1 būtinas ašiniams elementams susidaryti. Hop1 - taip pat ašinių elementų baltymas, bet jo lokalizacija priklauso nuo Red1. Mek1 – mejozei specifinė serino/treonino kinazė, dalyvaujanti SK susidaryme ir fosforilinti Red1. Fosforilintas Red1 sudaro heterooligomerą Red1-Hop1, kuris būtinas SK susidarymui. SYCP2 ir SYCP3 yra šoninių/ašinių elementų baltymai. *Sycp1* mutantiškos pelės susidaro normalūs ašiniai elementai, homologai išsidėsto greta, tačiau sinapsė nevyksta (de Vries ir kt., 2005). Tai rodo, kad SYCP1 yra skersinių elementų baltymas. *Sycp3* mutantinių pelių spermatocituose nesusidaro ašiniai elementai. Spermatocituose nevyksta ir SYCP2 lokalizacija ašiniuose elementuose. *Sycp2* mutantiškos pelės pasižymi lytiniu dimorfizmu sutrikimų atžvilgiu: patinai – sterilūs (sutrikusi mejozė lytinėse ląstelėse), patelės – pusiau fertiles (stipriai sumažėjęs vados dydis). *Scyp2* mutantuose sinapsė nevyksta.

Nepaisant to, kad SK susidarymas jau seniai tiriamas ir žinomi pagrindiniai jo etapai, į pagrindinį klausimą, kas nulemia SK lokalizacijos vietą, lieka neatsakyta. Daugelyje organizmų mejozinė rekombinacija prasideda anksčiau nei susidaro SK ir yra reikalinga pastarojo susidarymui (Henderson ir Keney, 2005). Dvigrandžiai trūkia, sukeliantys mejozinę rekombinaciją, atsiranda ankstyvoje profazėje (1 lentelė) prieš SK susiformavimą. Tai būdinga daugeliui organizmų: mielėms ir kitiems grybams, augalams, žinduoliams. Šių organizmų mutantuose, kuriuose sutrikęs DGT susidarymas, arba kuriuose

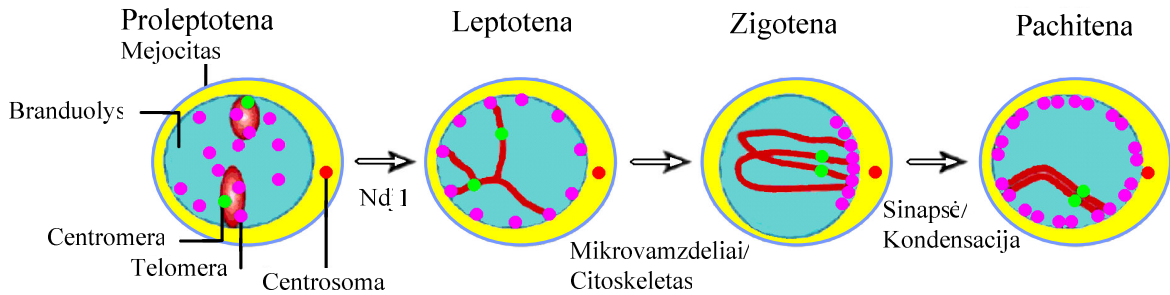
netinkamai subrandinami rekombinacijos tarpiniai produktai, SK formavimasis vyksta daug rečiau ir nenormaliai. Nustatyta, kad kai kuriais atvejais SK susidarymą galima sukelti tokius mutantus paveikus DNR pažaidas sukeliančiomis medžiagomis. Tačiau SK ir rekombinacijos priklausomumas nėra universalus. Pavyzdžiui, *D. melanogaster* ir *C. elegans* mutantai, net ir negalėdami vykdyti mejozinę rekombinaciją, sudaro normalius SK. Be to, net ir rūšyse, kuriose normali SK raida priklauso nuo rekombinacijos, SK defektai, esant rekombinogenezės sutrikimams, įvairuoja. Pavyzdžiui, kepimo mielių mutantuose su pažeistu rekombinacijos mechanizmu SK susidaro atsitiktinai ir ne iki galo: tik kai kurios chromosomos patiria visišką sinapsę. Taigi minėti stebėjimai rodo, kad mejozinė rekombinacija skatina SK susidarymą ir kad jo priklausomumas nuo rekombinacijos kai kuriose rūšyse labiau išreikštas. Vienu iš būdų, patvirtinančių toki priklausomumą, galėtų būti tai, kad SK raida prasideda rekombinacijos vietose. Taip *Sardaria macrospora* SK susidarymo pradžios taškai erdviškai sutampa su krosingoverio vietomis. Be to mutantuose, kuriuose mažesnis krosingoverio dažnis, susidaro mažiau SK. Šiuolaikiniai molekulinės genetikos metodai taip pat dažnai patvirtina teiginį, kad sinapsė prasideda mejozinės rekombinacijos vietose. Kepimo mielėse kai kurie SK baltymai (Zip3, Zip2, Zip1 ir Msh4) įeina į sinapsės pradžios komplekso sudėtį. Bent vienas iš šių baltymų (Zip3) gali patekti į mejozines chromosomas dėl sąveikos su rekombinacijos baltymais (Agarwal ir Roeder, 2000).

Yra duomenų, kad centromeros taip pat gali būti svarbios SK susidarymui, tačiau nuomonės šiuo klausimu labai prieštaringos. Vieni mokslininkai mano, kad centromera gali būti ta vieta, kurioje prasideda SK formavimasis, kiti atvirkščiai – teigia, kad ši chromosomos struktūra yra kliūtis SK polimerizacijai.

SK susidarymas svarbus mejozės požymis, tačiau tiksli jo reikšmė nenustatyta. SK gali būti reikalingas tam tikriems homologinės rekombinacijos etapams, pavyzdžiui, rekombinuojančių struktūrų stabilizacijai. Jis, matyt, svarbus krosingoverio interferencijoje. Organizmuose (*S. pombe*, *A. nidulans*), kurių mejozėje nesusidaro SK, nėra krosingoverio interferencijos. *S. cerevisiae zip1* mutantuose, kuriuose pažeista SK raida, taip pat nėra interferencijos (tačiau krosingoveris vyksta). Jeigu pažeidimų yra tam tikrose pelės ir kukurūzo SK vietose, krosingoverio interferencija tokiuose mutantuose taip pat sumažėja arba tampa neigiama.

2.3.2.3. Chromosomų „puokštė“

Profazėje chromosomų telomeros sudaro struktūrą, vadinamąją „puokštę“ (angl. *bouquet*). Šis darinys dažniausiai išryškėja perėjime iš leptotenos į zigotena (35 pav.).



35 pav. „Puokštės“ susidarymo ir išsisklaidymo modelis. Proleptotena: telomeros (rausvi taškai) po DNR replikacijos juda link branduolio apvaskalėlio vidinės pusės ir matomos branduolio periferinėje dalyje. Leptotena: chromosomų telomeros atsitiktinai prisitvirtinusios prie vidinės branduolio apvaskalėlio pusės. Zigotena: perėjimo iš leptotenos į zigotena stadijoje telomeros sudaro sankaupą – „puokštę“. Chromosomų galai išsidėstę greta ir dėl to gali vykti jų sąveika. Perėjimas iš zigotenos į pachitena susijęs su intensyvia sinapsės raida ir chromosomų kondensacija. Tai išsklaido telomeras. Pachitena: homologai susiporavę, SK susidaro per visą homologinių chromosomų ilgį. Skirtingų susiporavusių chromosomų telomeros išsisklaidę po visą branduolio apvaskalėlio vidinį paviršių (pagal Scherthan, 2001)

Jis randamas grybų, augalų ir gyvūnų ląstelėse (Golubovskaya ir kt., 2002). Evoliucinis „puokštės“ konservatyvumas ir tai, kad jos susidarymas sutampa su homologų poravimosi pradžia, leidžia manyti, kad ji svarbi homologijos paieškai (Bass ir kt., 2000). „Puokštės“ susidarymas vyksta dviem etapais: 1) telomeros prisitvirtina prie vidinio branduolio apvaskalėlio paviršiaus; 2) jos susivienija į glaudų telkinį. Iki šiol žinoma labai nedaug genų, kurie valdo „puokštės“ susidarymą. Geriausiai ištirti *taz1*, *lot2-s17/rap1* (*S. pombe*) ir *ndj1/tam1* (*S. cerevisiae*) genai. Augaluose taip pat atrasta keletas „puokštės“ raidą veikiančių genų: *syl* (ruguose), *pam1* (kukurūzuose). Visuose mutantuose ne tik sutrikęs „puokštės“ susidarymas, bet randama ir homologinių chromosomų sinapsės defektų. Tačiau daugelio mutantų su homologinių chromosomų sinapsės defektais ląstelėse „puokštė“ susidaro normaliai. Manoma, kad homologų sinapsė vyksta vėliau nei „puokštės“ susidarymas. Kukurūzų *pam1* mutante sutrikęs arba visiškai nevyksta telomerų suartėjimas. Be to, kaip įprasta tokiems mutantams, jame sutrikusi ir homologinių chromosomų sinapsė: ji arba nepilna, arba vyksta tarp nehomologinių chromosomų.

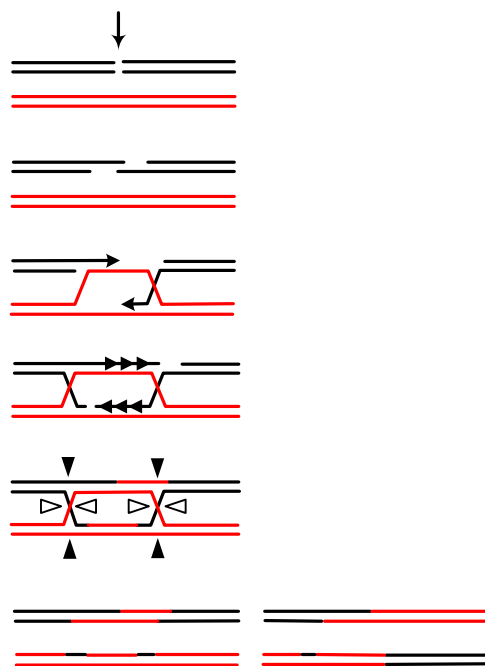
Nors tikslus „puokštės“ vaidmuo neaiškus, bet tikriausiai ji reikalinga homologinių chromosomų sąveikai bei homologijos paieškai labiau nutolusiuose chromosomų rajonuose.

2.3.2.4. Dvigrandžių trūkių susidarymas ir reparacija

DGT susidarymas – pagrindinis akstinas organizmų ląstelėse vykti mejoziniam ir mitoziniam krosingoveriui. Šių trūkių atsiradimas mejozinėse, o kai kuriais atvejais ir mitozinėse ląstelėse yra genetiškai užprogramuotas. Kad DGT gali būti genetiškai determinuoti, parodė poravimosi tipo perjungimo tyrimai *S. cerevisiae* ląstelėse. Šiuo atveju trūkius sukelia sait-specifinė nukleazė HO. Tiek DGT susidarymas, tiek vėlesni rekombinacijos įvykiai pirmiausia pradėti tirti kepimo mielėse *S. cerevisiae*. Dirbant su šia rūšimi, gauti ir pirmieji eukariotų mutantai, kuriuose sutrikę rekombinacijos procesai. Atliekant genetinę mielių mutantų, kuriuose sumažėjęs HR dažnis, sutrikęs sporuliacijos procesas bei

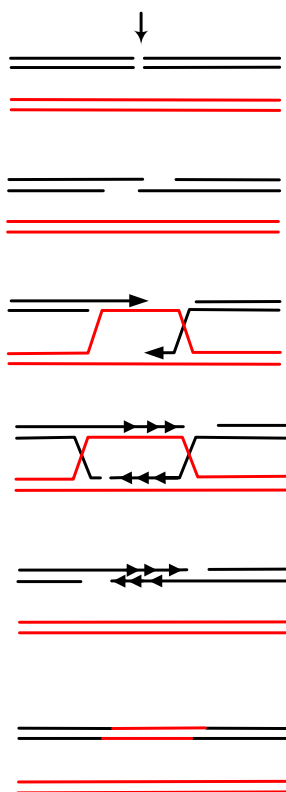
sumažėjęs sporų gyvybingumas, analizę, nustatyta daugiau kaip 30 genų, dalyvaujančių rekombinacijoje (Krogh ir Symington, 2004). Todėl, analizuojant eukariotų rekombinaciją, didelis dėmesys bus skiriamas būtent šiems organizmams.

DGT sukeltos homologinės rekombinacijos modeliams atsirasti pradžia davė mielių transformacijos eksperimentai (Orr-Weaver ir kt., 1981). Jie atskleidė keletą svarbių DGT reparacijos požymių. Pirmiausia, nustatyta, kad plazmidė, turinti DGT rajoną, homologiškame tam tikrai chromosomos DNR seka, gali būti reparuota ir dėl krosingoverio įterpta į chromosomą. Antra, plazmidė, turinti tarpą homologijos rajone, gali būti „užlopyta“, užpildant jį informacija, esančia sveikoje, homologišką seką turinčioje DNR molekulėje. Trečia, kai į mielių ląstelę transformacijos būdu įvedama suskaldyta plazmidė turėjo veikiančią replikacijos pradžios seką, 50 proc. reparacijos įvykių buvo susiję su krosingoveriu (plazmidė įsiterpdavo į homologišką vietą chromosomoje) ir 50 proc. atvejų susidarydavo autonomiškai besireplikuojanti plazmidė. Analizuodami šiuos rezultatus, Szostak ir kolegos (1983) pasiūlė DGT ištaisymo modelį, kuris buvo pritaikytas ir mejozės metu susidarantių DGT reparacijai aiškinti. Pradinė modelio versija šiek tiek skyrėsi nuo dabartinės (36 pav.), kuri teigia, kad DNR trūkio vietoje skaidoma 5'→3' kryptimi. Šiuolaikinis modelis pagrįstas keliuose laboratorijose gautais rezultatais (Paques ir Harber, 1999). Nustatyta, kad susidarantys 3' vgdNR galai dažnai būna ilgesni nei 1 kbp. Tokių DNR galų įterpimas į homologišką nepažeistą DNR molekulę bei nuo jų vykstanti DNR sintezė nulemia dvigubų HJ susidarymą. Atsitiktinis tokių HJ suskaldymas duoda krosoverinius ir nekrosoverinius rekombinacijos produktus. Dvigubų HJ egzistavimas buvo įrodytas panaudojus dvikryptę (2D) elektroforezę.



36 pav. DGT reparacijos modelis pagal Szostak ir kt. (1983). Po DGT susidarymo DNR grandinės skaidomos 5'→3' kryptimi, susidaro viengrandžiai 3'galai, kurie yra labai rekombinogeniški ir įterpiami į homologišką DNR dupleksą. Nuo tokių įterptų DNR galų gali prasidėti DNR sintezė (rodyklėmis pavaizduotos galimos HJ suskaldymo vietos)

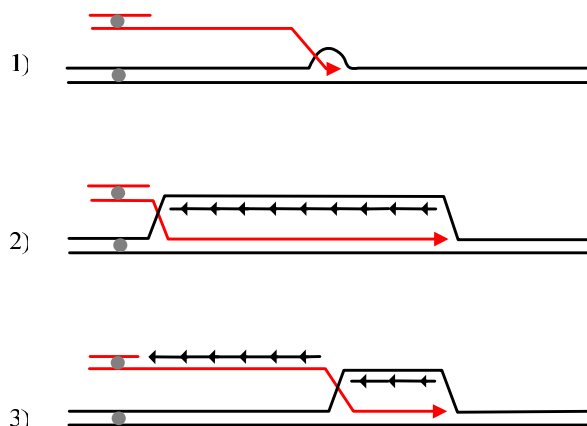
Toli gražu ne visus rekombinacijos įvairiuose organizmuose atvejus (pavyzdžiui, nevienodą geno konversijos ir krosingoverio dažnį) buvo galima paaiškinti naudojant Szostak ir kt. modelį, todėl buvo sukurta dar keletas naujų (Paques ir Harber, 1999). Viena tokia modelių grupė buvo pavadinta nuo sintezės priklausomo DNR grandinių susijungimo vardu (angl. *synthesis-dependend strand annealing*, *SDSA*). Šios rūšies modeliai sukurti siekiant paaiškinti kai kuriuos mielių, žinduolių, *E.coli*, *Ustilago*, *Drosophila* tyrimo rezultatus. Pagrindinė modelių savybė yra ta, kad naujai susintetintos DNR grandinės atsiskiria nuo matricos ir sąveikauja tarpusavyje. Tai sudaro sąlygas trūkį turėjusios molekulės naujai susintetintiems fragmentams susijungti vienam su kitu (37 pav.). Toks įterptų DNR galų atskyrimas nuo matricos gali vykti veikiant topoizomerazėms ar helikazėms. Remiantis šiuo modeliu galima paaiškinti krossoverų trūkumą tarp palikuonių.



37 pav. Paprasčiausias SDSA modelis. Abu DGT vietoje susidarę DNR 3'galai dalyvauja naujos DNR sintezėje

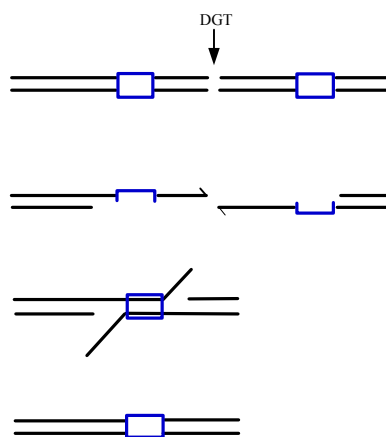
Įprasta manyti, kad geno konversija vyksta nedidelėse DNR atkarpose. Tačiau kai kurių eksperimentų duomenys, visiškai prieštarauja šiai nuomonei (Paques ir Harber, 1999). Pavyzdžiui, buvo nustatyta, kad geno konversija kepinio mielių VII chromosomoje gali vykti nuo TRP5 iki ADE5 lokuso. Mielių genomo sekoskaitos duomenimis, šie du lokusai nutolę per 400 kbp. Panašių rezultatų buvo gauta ir daugiau. Jie neatitiko Szostak ir kt. modelio. Malkova ir kt., tirdami HO sukeltą geno konversiją MATa/MAT α diploiduose, nustatė, kad geno konversijos apimtis gali skirtis priklausomai nuo mielių kamieno genotipo (Malkova ir kt., 1996). Laukiniame kamiene reparacija vyko geno konversijos būdu, tačiau trumpose DNR atkarpose. rad52 diploiduose chromosoma, turinti trūkį, beveik visada buvo prarandama. Tačiau rad51 diploiduose reparacijos efektyvumas siekė 45 proc. lygio, nustatyto laukiniame

kamiene. Tačiau šiuo atveju DGT reparacija vyko ne pagal įprastą schemą ir buvo didelės apimties. Toks nuo RAD52 priklausantis ir nuo RAD51 nepriklausomas reparacijos reiškinys buvo pavadintas trūkio sukelta replikacija (angl. *break-induced replikation, BIR*) (38 pav.).



38 pav. Trys modeliai, aiškinantys trūkio sukeltą replikaciją (BIR). Pirmame modelyje teigiama, kad trūkusios chromosomos 3' galas įterpiamas į sveiką DNR grandinę ir pradeda DNR sintezę joje susidarant D kilpai. Antrame modelyje (priimtinausiam) pavaizduota, kad 3' galo įterpimas sukelia ne tik pirmaujančios, bet ir vėluojančios grandinės DNR replikaciją. Rezolvazė suskaldo Holidėjaus tipo jungtis. Trečiame modelyje pavaizduota pusiau konservatyvi (D-kilpoje) ir konservatyvi DNR replikacija, kurias sukelia trūkis vienoje iš chromosomų.

Manoma, kad trūkio sukelta replikacija turėtų būti labai svarbi chromosomų galų reparacijoje. Patselkus anksčiau aptartus modelius, bandoma aiškinti pavienių chromosomų telomerų galų palaikymą mielių ląstelėse, neturinčiose telomerazės. Pats procesas priklauso nuo *RAD52* ir kai kurių kitų genų.



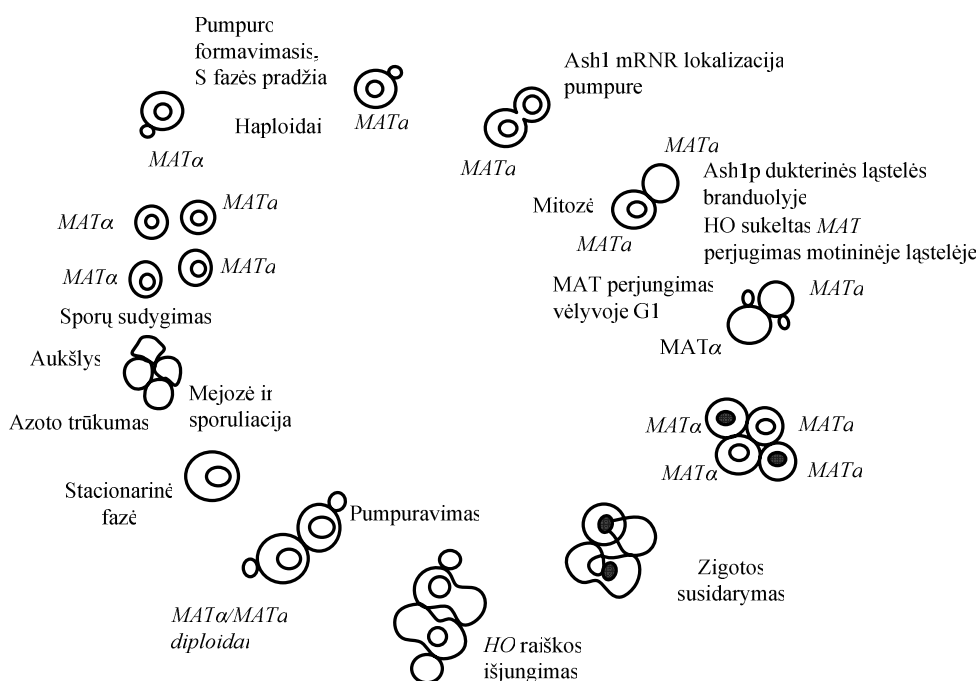
39 pav. Viengrandžių DNR galų susijungimo (SSA) modelis. Šis rekombinacijos mechanizmas naudojamas tada, kai DGT įvyksta tarp vienakrypčių pasikartojančių sekų (mėlyni stačiakampiai). DNR grandinių iš abiejų trūkio pusių subrandinimas nulemia viengrandžių DNR galų, turinčių komplementarias sritis, susidarymą ir jų susijungimą. Nekomplementarius vgdNR galus pašalina nukleazės

Jeigu DGT iš abiejų pusių supa homologiškos sekos, tai toks chromosomos trūkis gali būti efektyviai pašalintas susijungus viengrandžiams chromosomų galams (angl. *single strand anealing, SSA*). Tačiau šiuo atveju prarandama viena iš homologiškų sekų (39 pav.).

Mielėse šio homologinės rekombinacijos mechanizmo efektyvumas siekia beveik 100 proc., jeigu trūkį supančios homologiškos sekos yra ne trumpesnės nei 400 bp. Reparacija vyksta efektyviai net

tuomet, kai tarp homologiškų sekų atstumas siekia 15 kbp. Mažėjant homologiškų sekų ilgiui, rekombinacijos efektyvumas mažėja. Pavyzdžiui, jeigu tokių atkarpų ilgis yra 60 bp, tai rekombinacijos efektyvumas – tik 5 proc.

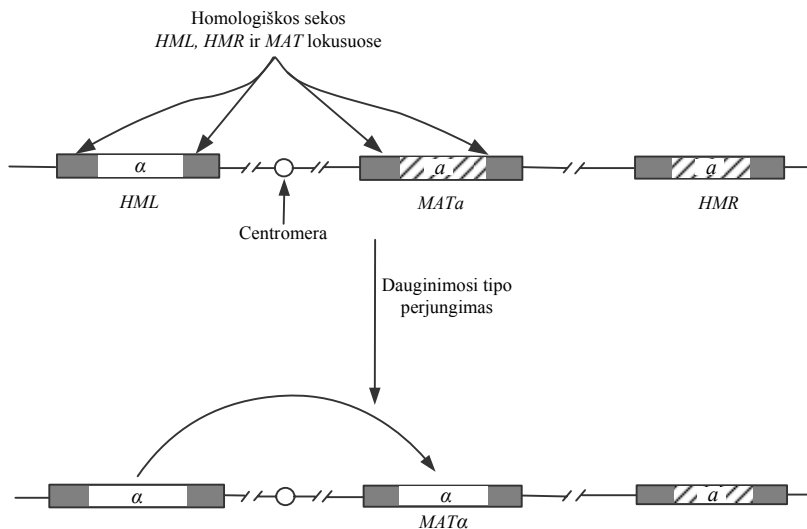
Daug naudingos informacijos apie mejozinio krosingoverio mechanizmus taip pat davė „karštųjų“ rekombinacijos taškų tyrimai. Ištyrus paaiškėjo, kad tokiose rekombinogeniškosiose genomo vietose taip pat susidaro DGT, o juos patyrusios DNR molekulės turi 3' viengrandžius galus. Tokie galai susidaro ir veikiant *S. cerevisiae* HO endonukleazei *MAT* lokuse. Rekombinacija šiame mielių lokuse svarbi dauginimuisi. Du skirtingi *MAT* lokuso aleliai *a* ir α nulemia mielių dauginimosi tipą. Konkrečiu momentu reiškiasi tik vienas iš šių alelių. Naujo alelio raiška *MAT* lokuse vadinama dauginimosi tipo perjungimu. Sudygusios iš sporos mielių ląstelės yra haploidinės (40 pav.). Dygstant sporai, iš vadinamosios motininės ląstelės susidaro dukterinė. Dauginimosi tipą gali perjungti tam tikru momentu tik motininė ląstelė. Ši galimybė priklauso nuo asimetriško *ASH1* geno mRNR paskirstymo į dukterines ląsteles mitozės metu. Dėl aktyvios pernašos, kurioje dalyvauja motoriniai baltymai, *ASH1* mRNR pernešama į dukterinę ląstelę, kur ir vyksta jos transliacija. Susintetintas Ash1 baltymas slopina *HO* geno, koduojančio to paties pavadinimo nukleazę, raišką dukterinėse ląstelėse. Motininėse ląstelėse jis neslopinamas ir veikia labai trumpą laiką perėjimo iš ląstelės ciklo stadijos G1 į S stadiją metu. Todėl motininės ląstelės gali perjungti savo dauginimosi tipą.



40 pav. *Saccharomyces* homotalinis gyvenimo ciklas (pagal Haber, 1998)

Skirtingų dauginimosi tipų ląstelės poruojasi tarpusavyje ir susidaro *MAT α /MAT a* diploidinė ląstelė, kuri nepalankiomis sąlygomis gali pradėti mejozę ir gali susidaryti haploidinės sporos. *MAT* lokusas kaip ir jam giminingi *HML* ir *HMR* lokusai, yra trečiojoje *S. cerevisiae* chromosomoje. Skirtingai nuo *MAT* *HML* ir *HMR* lokusuose esanti genetinė informacija nepasireiškia todėl, kad jie yra heterochromatino būsenoje (Haber, 1998). *MAT α* ir *MAT a* aleliai gali pasireikšti tik būdami *MAT* lokuse (41

pav.). Jie skiriasi maždaug 700 bp. Perjungimas nuo vieno alelio į kitą vyksta rekombinacijos būdu. HO nukleazė MAT lokuse sukelia dvigrandį trūkį, kurio ištaisymas vyksta geno konversijos būdu, panaudojant informaciją, esančią „tylinčiuose“ *HML* ar *HMR* lokusuose.



41 pav. Dauginimosi tipo lokusas trečioje chromosomoje. Be veikiančio *MAT* lokuso, yra du neveiklūs lokusai *HMR* ir *HML*. Kai HO endonukleazė sukelia DGT, dauginimosi tipas gali būti perjungtas ištaisant trūkį geno konversijos būdu. Šiuo atveju panaudojama genetinė informacija, esanti „tylinčiuose“ *HMR* ir *HML* lokusuose

Šiuose lokusuose esančią unikalią informaciją apie a arba α dauginimosi tipą, supa identišką seką, kurios svarbios geno konversijai vykti. *MAT* lokuse trūkių ištaisymą galima dažniausiai paaiškinti pasinaudojant Szostak ir kt. pasiūlytu DGT reparacijos modeliu (Szostak ir kt., 1983).

HR yra pagrindinis DGT šalinimo būdas *S. cerevisiae* ląstelėse. Nehomologinių DNR galų sujungimo (NHEJ) vaidmuo šiame organizme nėra toks svarbus kaip aukštesniuose eukariotuose. Pažeidus kurį nors NHEJ geną, mielių ląstelėse nepastebėta nei DGT reparacijos sutrikimų, nei padidėjusio jautrumo JS ar MMS. Tuo tarpu HR sutrikimai sukelia ryškius pokyčius fenotipe. Mutagenėzė ir mutantų genetiniai tyrimai davė daugiausia informacijos apie HR mielėse. Gauti mielių mutantai, kuriuose HR procesas pažeistas įvairiose stadijose. Dalis tarpinių HR produktų buvo ištirti biochemiškai. Šiuo metu žinoma daugiau kaip 10 genų, dėl kurių mutacijų chromosomose nesudaro DGT. Norint išaiškinti, koks genas (-i) atsakingas už genetiškai nulemtą DGT susidarymą, buvo tiriami mutantai, kuriuose blokuotas DNR galų atsiradusių dėl DGT, subrandinimas. Šiuose mutantuose buvo ieškoma kovalentiškai prisijungusių baltymų molekulių DGT vietoje prie DNR 5' galo. Tokių išskirtų DNR – baltymas kompleksų analizė parodė, kad prie DNR 5' galo kovalentiškai prisitvirtinęs Spo11 baltymas. Mutacija *SPO11* gene buvo aptikta dar anksčiau ir blokavo mejozinės rekombinacijos pradžią. Mejozės metu Spo11 katalizuoja DGT susidarymą 150 – 200 mielių genomo vietų. Tai mejozei specifiškas baltymas savo seka panašus į mažąjį IIB topoizomerazės iš *Sulfolobus shibatae* subvienetą. Šio tipo topoizomerazės sudaro kovalentinę 5' fosfotirozilinę jungtį su DNR ir dėl to sukelia laikinus DGT DNR molekulėje. Kai įvyksta substrato topoizomerizacija, jungtį ir trūkį pašalina pats baltymas.

Spo11, atrodo, katalizuoja tik pirmąjį iš dviejų topoizomerazinės reakcijos etapų ir keliuose mutantuose (*rad50S*, *sae2Δ*, *mre11-S*, *mre11-58*) aptinkamas trūkio vietoje kovalentiškai prisijungęs prie 5' galų Tyr-135 šio baltymo aktyvaus centro tirozinas. Mutacijos šioje vietoje slopina Spo11 gebėjimą katalizuoti DGT susidarymą. Manoma, kad laukinio tipo ląstelėje Spo11 nuo DNR 5' galų pašalina baltymų Mre11-Rad50-Xrs2 (MRX) kompleksas ir Sae2. Likę laisvi 5' galai yra skaldomi. Spo11 skaldo DNR neatsitiktinai, tačiau sait-specifiškumu nepasižymi. DGT vietos dažniausiai sutampa su chromatino sritimis, kurios jautrios DNazei I. Paprastai – tai genų nekoduojamosios 5' sritys.

Dar devyni genai: *MEI4*, *MER2/REC107*, *REC102*, *REC103/SKI8*, *REC104*, *REC114*, *MRE11*, *RAD50* ir *XRS2*, taip pat du mejozei būdingi RNR splaisingo veiksniai – Mer1 ir Mre2 reikalingi DGT susidarymui mejozės metu (Keeney, 2001). *MRE11*, *RAD50* ir *XRS2* yra *RAD50* epistazinės grupės nariai taip pat reikalingi šalinant JS sukeltus DGT mitozinėse *S. cerevisiae* ląstelėse.

Daugelio genų, reikalingų DGT susidarymui (išskyrus koduojančius MRX komplekso baltymus), vaidmuo nepakankamai ištirtas.

2.3.2.4.1. DGT subbrandinimas

Dėl Spo11 baltymo veikimo DGT vietoje susidarę dvigrandžiai DNR galai turi būti tinkamai subrandinti, kad prasidėjusio rekombinacijos proceso metu trūks būtų efektyviai pašalinami. Šiame etape svarbiausią vaidmenį, matyt, atlieka Mre11 komplekso baltymai. Mre11 kompleksas nepaprastai svarbus atsako į DGT atsiradimą komponentas, nes dalyvauja beveik visuose DNR galų metabolizmo procesuose: DGT aptikime, subbrandinime, homologinėje rekombinacijoje ir mejozėje, telomerų priežiūroje ir kt. (Assenmacher ir Hopfner, 2004). Tokią funkcijų gausybę galima paaiškinti tuo, kad šis baltymų kompleksas turi net keletą fermentinių ir nefermentinių aktyvumų (3 lentelė).

3 lentelė. Mre11 komplekso aktyvumas

Aktyvumas	Pastabos
DNR subbrandinimas	
3'→5' egz nukleazė	Aktyvumas priklauso nuo ATP
5'→3' egz nukleazė	Būdinga tik bakteriofago T4 46/47 genų koduojamiems baltymams
vgDNR endonukleazė	Aktyvumas nepriklauso nuo ATP
„Segtuko atidarymas“	Aktyvumas priklauso nuo ATP
Baltymo, prisijungusio prie DNR molekulės galo, atskyrimas	<i>Escherichia coli</i> SbcCD, aktyvumas priklauso nuo ATP
DNR išvyniojimas	Aktyvumas priklauso nuo ATP
DNR galų ir seserinių chromatidžių sujungimas	Manoma, kad susijęs su ATP hidrolize
Koaktyvatoriaus savybės	
DNR ligazė IV	
ATM (angl. <i>ataxia telangiectasia mutated</i>) baltymas	
WRN (angl. <i>Werner syndrome helicase</i>)	

Mielų *mre11*, *rad50*, *xrs2* mutantai yra panašios išvaizdos. Jiems būdingas pakitęs rekombinacijos dažnis, jautrumas DGT sukeliantiems veiksniams, mejozės sutrikimai ir sulėtėjęs vegetatyvinių ląs-

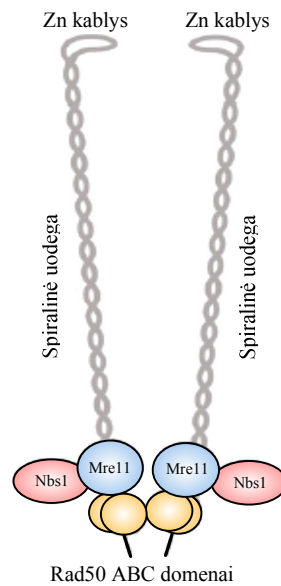
telių augimas. Genetiniais metodais nustatyta, kad Mre11 kompleksas yra būtinas genomo stabilumui. Šių mutantų ląstelės sensta, trumpėja jų telomeros, padaugėja chromosomų aberacijų, sumažėja NGS dažnis ir kt. Nustatyta, kad mielėse Mre11 sąveikauja su Rad50 ir Xrs2 baltymais, sudarydami stabilų kompleksą Mre11-Rad50-Xrs2 (dar vadinamąjį MRX). Kai nėra Mre11, Rad50 ir Xrs2 tarpusavyje nesąveikauja. Panašus baltymų kompleksas Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) aptiktas ir stuburinių gyvūnų ląstelėse. Skirtingai nei kepmo mielėse mutacijos *MRE11*, *RAD50* ir *NBS1* genuose sukelia didelius sutrikimus, pavyzdžiui, polinkį sirgti vėžiu ir kitomis ligomis. Mutacijos žmogaus *NBS1* ir *RAD50* genuose lemia vadinamąjį Nijmegen sindromą (angl. *Nijmegen breakage syndrome - NBS*) ir ligą primenančią ataksiją telengiaktaziją (angl. *ataxia telangiectasia-like disorder, ATLD*). Pacientams pasireiškia sulėtėjęs augimas, odos pažeidimai, imuniteto sutrikimai, polinkis sirgti vėžiu. NBS ir ATLD sindromai primena AT ir ląstelių lygmenyje: padidėja šių ląstelių jautrumas jonizuojamajai spinduliutei, sutrinka DGT reparacija. Mre *-/-* genotipo graužikų ir viščiuko ląstelių linijos negyvybingos. Pelės, kurių pavieniai *RAD50* ir *NBS1* genai išjungti, žūva embrioniniu laikotarpiu. Tiesa, kai kurie pelių embrionai gali išgyventi, jeigu juose pažaidos yra antrajame ar trečiajame *NBS1* geno egzonuose.

Mre11 ir Rad50 baltymai organizmų evoliucijos metu išliko konservatyvūs. Veikdami kartu, jie sudaro 3'→5' egzonukleazę, kurios aktyvumą skatina ATP, ir kuri gali sąveikauti su įvairios struktūros DNR galais bei „segtukais“. Mre11 ir Rad50 ortologų aptinka ne tik eukariotuose, bet ir visose karalystėse, įskaitant bakteriofagus (gp 47 – gp 46 T4), eubakterijas (SbcC – SbcD *E. coli*) ir archebakterijas (Rad50 – Mre11). HsRad50/ScRad50 aminorūgščių panašumas – 51 proc., o HsMre11/ScMre11 – net 61 proc. Dėl didelio evoliucinio Mre11/Rad50 komplekso konservatyvumo galima manyti, kad šis pirminis DGT aptikimo/reparacijos veiksnys galėjo evoliucionuoti kartu su rekombinacijos procesais. Trečiasis Mre11 komplekso subvienetas – NBS1 (arba jo funkcinis homologas kepmo mielėse – Xrs2) mažiau konservatyvus ir aptinkamas net ne visuose eukariotuose (D'Amours ir Jackson, 2002). Pavyzdžiui, augaluose (*A. thaliana*) aptikti *RAD50* ir *MRE11* genų homologai, tačiau nerasta *XRS2/NBS1* homologų. Savo struktūra Nbs1 ir Xrs2 baltymai, matyt, nėra homologiški. *A. thaliana rad50* mutanto ląstelės yra gyvybingos, jose padidėjęs rekombinacijos dažnis, jautrios MMS. Toks augalas yra sterilus.

Gyvų organizmų evoliucijos metu Nbs1/Xrs2 baltymai prie Mre11/Rad50 komplekso prisijungę galbūt tada, kai eukariotuose susiformavo ląstelės ciklo kontrolės mechanizmai ir šis kompleksas tapo svarbus genomo vientisumui palaikyti. Nustatyta, kad Mre11 kompleksas sąveikauja su daugeliu kitų baltymų, svarbių reparacijos ir ląstelės ciklo valdymui.

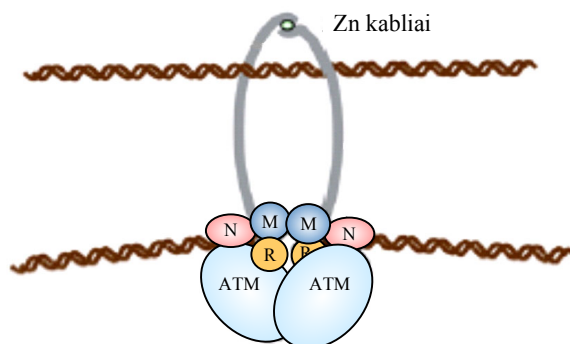
Pati DGT prigimtis ir ypatybės leidžia suprasti, kad šių trūkių šalinimas reikalauja tam tikrų tiek struktūrinių, tiek fermentinių savybių. Kad būtų galima sugauti ir suartinti nutrūkusius DNR molekulės galus, būtini tam tikrą sandarą turintys baltymai. Fermentinis aktyvumas būtinas tuos galus paruošiant sujungimui. Mre11 kompleksas turi visas tam reikalingas savybes. Mre11/Rad50 darinio tyrimai elektroninės mikroskopijos metodais atskleidė labai savitą struktūrą, leidžiančią nesunkiai įsivaizduoti

šių baltymų struktūrinį vaidmenį suartinant laisvus dgDNR galus. Mre11 kompleksas yra bipoliarinės sandaros, susideda iš rutulio pavidalo „galvos“ ir dviejų ilgų „uodegų“ (42 pav.)



42 pav. Mre11₂/Rad50₂/Nbs1₂ baltymų komplekso struktūros modelis. Mre11 jungiasi prie Rad50 spiralinių „uodegų“ netoli Rad50 ABC domenu. Rad50 spiralinės „uodegos“ kyšo iš ABC domenu. „Uodegos“ viršuje turi cinko kablius, kuriais Mre11 kompleksas dalyvauja molekulių sąveikoje (Assenmacher ir Hopfner, 2004)

Mre11 komplekso „galva“, kurią sudaro sudaro Rad50 ABC ATPazės domenai ir Mre11 dimeras, turi nukleazės aktyvumą. Nors tiesiogiai neįrodyta, tačiau mutagenezės rezultatai rodo, kad Nbs1/Xrs2 jungiasi prie Mre11₂:Rad50₂, sudarydamas kompleksą (Lee ir kt., 2003). Išskirtiniausia Mre11 komplekso savybė – antiparalelinės 60 nm ilgio spiralės pavidalo „uodegos“, kyšančios iš Rad50 ABC ATPazės domenu. „Uodegų“ viršuje yra kablio pavidalo struktūros, kurios, dalyvaujant cinko atomui, gali sudaryti tiltelius: kablys/Zn/kablys (43 pav).



43 pav. Mre11 komplekso sąveikos su DNR ir ATM baltymu modelis. Teoriškai vienas Mre11₂/Rad50₂/Nbs1₂ baltymų kompleksas gali suartinti dvi seserines chromatides. Kita galima alternatyva: vienas Mre11 kompleksas jungiasi prie vieno DNR molekulės galo ir šiuo atveju skirtingų DNR galų susijungimas vyksta dėl tarpmolekulinės sąveikos, kurioje dalyvauja kablio pavidalo struktūros (Assenmacher ir Hopfner, 2004)

Pagrįstas eksperimentų duomenimis vienas iš Mre11 komplekso veiklos modelių teigia, kad sąveikoje dalyvauja du Mre11₂/Rad50₂ kompleksai. Kiekvienas iš jų turi po „galvą“, kurios iš pradžių jungiasi prie skirtingų DNR galų ar seserinių chromatidžių, po to cinko kabliai sukabina jas tarpusavyje. Iš visų Mre11 komplekso baltymų Nbs1/Xrs2 funkcijos ir struktūra mažiausiai ištirtos. Nbs1 fosforilinamas, kai DNR molekulėje atsiranda DGT. Jo fosforilinimą, matyt, atlieka ATM kinazė. Nbs1 baltymas MRN komplekse tikriausiai atlieka reguliacinę funkciją, kuri susijusi su komplekso lokalizacija branduolyje, signalo perdavimu ir katalizine aktyvacija. Šis baltymas taip pat reguliuoja nuo ATP priklausomą DNR išvyniojimą bei egzonukleazinį komplekso aktyvumą ir yra svarbus subbrandinant „seg-tuko“ pavidalo struktūras (Lee ir kt., 2003). Taip pat nustatyta, kad mielių Xrs2 jungiasi prie antrinių DNR struktūrų bei padeda Mre11/Rad50 surasti DGT. Taigi minėti baltymai galbūt atsakingi už Mre11 komplekso gebėjimą aptikti DNR pažaidas. Be to, Nbs1/Xrs2 veikia Mre11 komplekso sąveiką su kitais baltymais DGT vietoje.

Neseniai nustatyta, kad Mre11 komplekso homologai SbcC ir SbcD, aptinkami *E. coli*, gali pašalinti prie DNR molekulių galų kovalentiškai prisijungusius baltymus (Connelly ir kt., 2003). Remiantis tokiu giminiškų baltymų aktyvumu, galima manyti, kad ir Mre11 kompleksas geba pašalinti kovalentiškai prisijungusį Spo11 baltymą nuo DNR molekulių galų. Tokiam DNR galų subbrandinimui reikalingas ATP ir Mre11 komplekso endonukleazinis aktyvumas. Prisijungęs Spo11 pašalinamas kartu su nedideliu DNR fragmentu, susidaro „švarūs“ 3'-OH galai, tinkami mainų reakcijai. Rad50 vykdomos ATP hidrolizės reikšmė nėra visiškai aiški. Manoma, kad ATP hidrolizė reikalinga DNR prisijungimui prie Mre11 komplekso. Be DNR galų atpažinimo, ATP sukelti Rad50 ABC domeno struktūriniai pokyčiai gali skatinti DNR grandinių atsiskyrimą, kartu palengvindami Mre11 vykdomą DNR galų brandinimą.

2.3.2.4.2. Grandinės įterpimas ir DGT ištaisymas

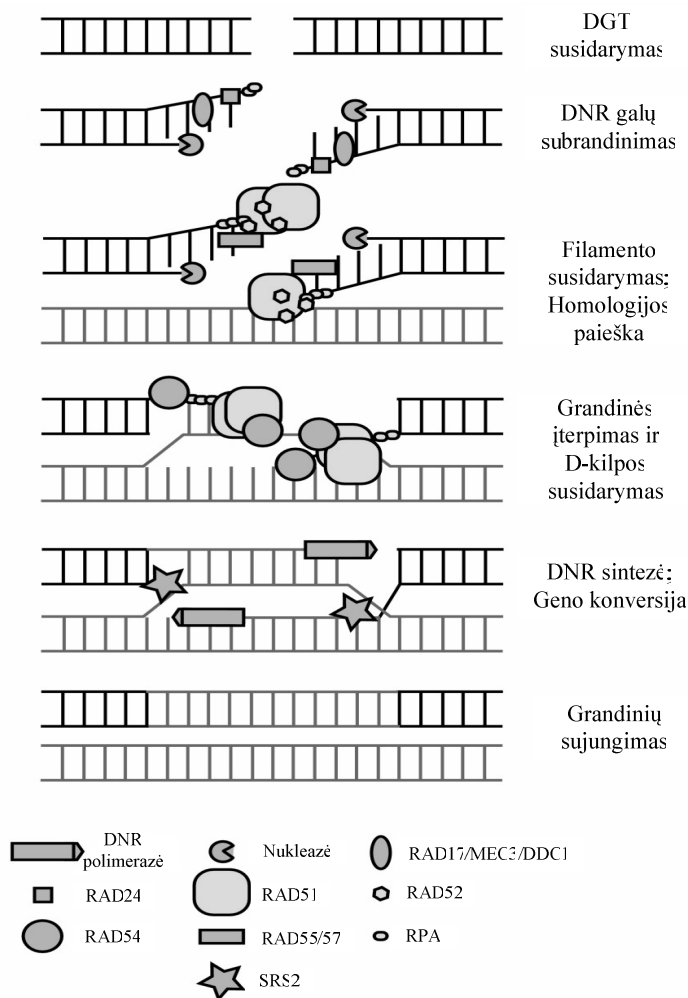
Kepimo mielėse genai, dalyvaujantys HR, priklauso RAD52 epistazinei grupei. Į ją įeina: RAD50, RAD51, RAD52, RAD54, RAD55, RAD57, RAD59, RDH54/TID1, MRE11 ir XRS2. Laštelės, kuriose pažeisti šie genai, yra jautrios JS, bet ne UV. Jų DNR kaupiasi DGT, yra sutrikusi mitozinė ir (ar) mejozinė rekombinacija. Pagal fenotipą šių genų mutantus dar galima suskirstyti į mažesnes grupes. Rad51, rad54, rad55 ir rad57 pavieniai mutantai yra vienodo fenotipo, todėl jie jungiami į RAD51 šeimą. Šios šeimos nariai reikalingi ne visuose HR įvykiuose. Be to, jų jautrumas JS ne taip išreikštas kaip rad52 mutanto. Rad50, mre11 ir xrs2 mutantai fenotipiškai taip pat vienodi, todėl jie sudaro kitą grupę. Dėl funkcinio savitumo homologinėje rekombinacijoje RAD59 ir RDH54/TID1 galima priskirti dar vienai atskirai grupei. Kaip rodo mutantų tyrimai, RAD52 reikalingas beveik visiems HR keliams kepimo mielėse. Šiuo požiūriu jis unikalus. Pavienio Rad52 mutanto jautrumas JS toks pats kaip ir dvigubo Rad52 ir bet kurio kito minėto geno mutanto. Literatūros duomenimis, kepimo mielėse re-

kombinacija gali vykti bent dviem keliais – Rad51 ir RAD52 keliu, kuris jau nepriklauso nuo *RAD51* geno (Symington, 2002).

Anksčiau išvardytus mielių HR genus arba jų homologus turi ir žinduoliai, tačiau žinduolių ląstelės HR dalyvauja daugiau genų. Pavyzdžiui, vietoje dviejų *ScRAD51* paralogų – *RAD55* ir *RAD57* žinduolių ląstelėse veikia bent penki *RAD51* tipo genai: *XRCC2*, *XRCC3*, ***RAD51B*** (*RAD51L1*; *hREC2*; *R51H2*) ***RAD51C*** (*RAD51L2*) ir ***RAD51D*** (*RAD51L3*).

Daugelį metų HR aukštesniuosiuose eukariotuose laikyta nelabai svarbia šalinant DGT. Manoma, kad DGT reparaciją atlieka išimtinai NGS baltymai. Tačiau ši nuomonė buvo klaidinga, tai įrodė eksperimentai, kurių metu buvo išjungti HR genai viščiuko B limfocitų ląstelių linijoje DT40. Be to, gautos pelių ir pelių embrioninių kamieninių ląstelių linijos, kuriose HR genai neveiklūs. Tokie organizmai ar ląstelių kultūros dažniausiai žūdavo, arba jų gyvybingumas buvo labai sumažėjęs.

S. cerevisiae ląstelėse grandinės įterpimo į nepažeistą DNR duplexą stadijoje veikia keletas genų (44 pav.). Kai kurie iš jų (*ScRAD51*, *ScRAD55*, *ScRAD57*, *ScDMC1*) yra homologiški *E. coli recA*. Mutacijos šiuose genuose sutrikdo DGT ištaisymą. ScRad51 baltymas katalizuoja *in vitro* viengrandžių DNR galų įterpimą į vientisą dgDNR molekulę. Su vgDNR jis sudaro nukleoproteininį kompleksą, panašų į RecA-DNR filamentą. ScRad51 vykdomiems grandinių mainams reikia mielių baltymo savo savybėmis panašaus į *E. coli* SSB. Tokią funkciją atlieka heterotrimerinis RPA baltymas (angl. *replication protein A*). Šis baltymas apsaugo viengrandžius DNR galus nuo nukleazių, neleidžia tokioje molekulėje susidaryti antrinėms struktūroms (pavyzdžiui, „segtukams“) ir galbūt koordinuoja baltymų, sąveikaujančių su viengrandžiais DNR galais, veikimo eiliškumą (Kowalczykowski, 2000). RPA sudarytas iš trijų subvienetų: RPA70, RPA32 ir RPA14. Toks stabilus kompleksas jungiasi prie vgDNR 5'→3' kryptimi. RPA baltymas sąveikauja su daugeliu baltymų (*RAD51*, *RAD52*, Werner'io ir Bloom'o sindromų helikazėmis, *BRCA2*, *MRX* kompleksu ir kt.) (Fanning ir kt., 2006). Jo pašalinimui nuo vgDNR ir ScRad51 filamentų susidarymui reikalingi *Rad52*, *Rad55* ir *Rad57*. Kadangi, įterpiant grandinę, susidaro baltymų kompleksas, tai tokia struktūra vadinama rekombinosoma, kurią sudaro Rpa, *Rad51*, *Rad52*, *Rad55*, *Rad57*.



44 pav. Homologinės rekombinacijos somatinėse ląstelėse eiga (Gill ir Fast, 2007). Dvigrandžius DNR galus, susidariusius dėl DGT, subrandina dar iki galo neišaiškintos nukleazės (apie galimą MRE11 baltymų kompleksą vaidmenį šiame procese rašyta 2.3.2.4.1. skirsnyje). Susidariusius viengrandžius galus padengia RPA baltymas. Po to susidaro Rad51 filamentas ir RPA pašalinamas nuo DNR. Rad52p ir Rad55p/Rad57p skatina filamento susidarymą. Rad54p taip pat dalyvauja šiame etape. Tuo pat metu vyksta homologijos paieška visame genome. Kai surandamos homologiškos sekos, galų subrandinimas baigiasi. Šiuo metu ant donorinės vgdNR randami Rad51p, Rad52p ir Rad54p. Toliau seka grandinės įterpimas ir Rad51p nukleoproteininio filamentų iširimasis. Pastarąjį skatina helikazė Srs2p. Šiame etape gali vykti tam tikras DNR skaldymas nuo 3'-OH galo. Toliau seka DNR sintezė ant donoro DNR ir atkuriamas dgDNR būsenas. Vyksta neteisingai suporuotų nukleotidų reparacija. Sudaromos kovalentinės jungtys DNR molekulėje. Šiame etape taip pat reikalingi Rad55p ir Rad57p. Mielėse visas procesas nuo DGT susidarymo trunka apie 1 val.

2.3.2.4.3. Holidėjaus jungčių migracija ir skaldymas. Netaisyklingai suporuotų nukleotidų reparacija heteroduplekse

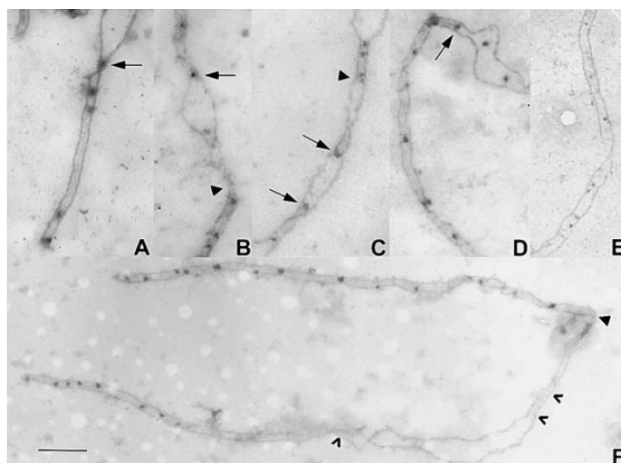
Rekombinacijos metu susidaranti hibridinė DNR molekulė su dviem Holidėjaus jungtimis iš tikrųjų egzistuoja ir buvo aptikta atlikus 2-D elektroforezę. HJ migraciją mielėse, manoma, vykdo ScRad54, Sgs1 baltymai. Kad būtų baigta DGT reparacija, HJ turi būti suskaldytos. Kadangi bakterijoje tai atlieka specialūs baltymai (RuvABC, RecG), tai panašių buvo ieškoma ir eukariotuose. Susidomėta Rad51 paralogais XRCC3 ir Rad51C, kurie, atrodo, turi rezolvazės aktyvumą. Pavyzdžiui, *Rad51C*^{-/-} ląstelės neturi šio aktyvumo (Liu ir kt., 2004). Taip pat manoma, kad, subrandinant HJ, gali

dalyvauti ir RecQ šeimos helikazės bei topoizomerazės. Be to, vieno ar kito baltymo, pasižyminčio rezolvazės aktyvumu, dalyvavimas priklauso nuo situacijos (Wyman ir Kanaar, 2006). Netaisyklingai suporuotus nukleotidus, esančius heteroduplekse, mielių ląstelėse ištaiso *E. coli* MutS ir MutL homologai. Eukariotuose aptikta ne mažiau septynių MutS homologų (MSH1-MSH7) (Kang ir kt., 2005). MSH2/MSH6 (MutS α) ir MSH2/MSH3 (MutS β) heterodimerai, judėdami DNR, atpažįsta netaisyklingai suporuotus nukleotidus ir jungiasi prie jų. MSH4-MSH5 atpažįsta HJ ir jungiasi prie jų mejozės metu. Šių baltymų vaidmuo nėra iki galo iširtas, tačiau manoma, kad jų heterodimeras gali dalyvauti DGT reparacijos tarpinių produktų stabilizacijoje (Snowden ir kt., 2004). MutL homologų daug rasta kepimo mielių ir žmogaus ląstelėse. Kepimo mielėse – tai baltymai: Mlh1, Pms1, Mlh2, Mlh3, žmogaus ląstelėse: Mlh1, Pms1, Pms2, kurie veikia taip pat kaip heterodimerai MutL α (MLH1/PMS2) ir MutL β (MLH1/PMS1).

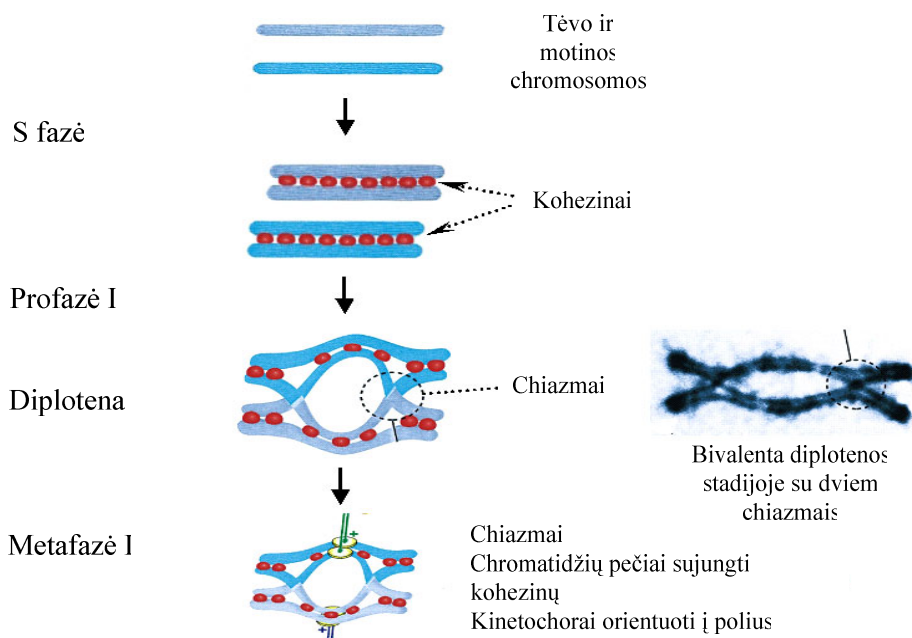
2.3.2.5. Rekombinaciniai mazgeliai

Rekombinacijos metu veikiantys baltymai dažniausiai sudaro didesnius ar mažesnius kompleksus. Vienas iš sudėtingiausių šio tipo darinių yra rekombinaciniai mazgeliai. Tai mažos, tamsių taškelių pavidalo struktūros, matomos elektroniniu mikroskopu ant chromosomų mejozės metu (45 pav.). Jų aptikta beveik visuose tirtuose organizmuose (Zickler ir Kleckner, 1999). Mazgeliai yra dviejų tipų. Pirmojo tipo mazgeliai labai įvairaus dydžio (30–200 nm skersmens). Jie matomi ant ašinių elementų dar prieš sinapsę bei ant naujai susidariusių SK zigotenos ir ankstyvos pachitenos stadijose. Mazgelių skaičius priklauso nuo SK segmento ilgio. Antrojo tipo mazgeliai vienodesni (100 nm). Aptinkami ant SK vidurinės pachitenos stadijoje. Pirmojo tipo mazgeliai vadinami mejoziniais, zigotenos arba ankstyvaisiais. Antrojo tipo – rekombinaciniais arba vėlyvaisiais. Tiek vieni, tiek kiti mazgeliai yra fermentiniu aktyvumu pasižyminčių baltymų kompleksai. Manoma, kad ankstyvieji mazgeliai svarbūs homologijos paieškai, chromosomų poravimuisi. Šie įvykiai vyksta prieš sinapsę. Antrojo tipo mazgeliai svarbūs reciprokinei rekombinacijai. Tiriant rekombinacinių mazgelių sandarą imunocitocheminiais metodais, paaiškėjo, kad į jų sudėtį įeina rekombinacijos procese dalyvaujantys baltymai: Rad51, Dmc1, RPA, Blm, Mlh1, Atm (angl. *Ataxia Telangiectasia Mutated*) ir Atr (angl. *ATM and RAD3 related*). Ankstyvųjų mazgelių skaičius vėlyvoje zigotenoje 4–10 kartų viršija vėlyvųjų mazgelių skaičių pachitenos gale. Juose aptinkami Rad51-Dmc1 baltymų kompleksai (Moens ir kt., 2007), susiję su besiformuojančių chromosomų šerdine dalimi. Kiekvieną šių baltymų telkinį supa γ H2AX histoną turintis modifikuotas chromosomos domenai. Pelės ląstelių branduolyje būna 250–300 ankstyvųjų mazgelių, tačiau jų skaičius mažėja chromosomoms kompaktizuojantis. Eksperimentais nustatyta, kad dalis ankstyvųjų mazgelių virsta vėlyvaisiais, tačiau tuo metu juos sudarančių baltymų sudėtis kinta. Į juos įsijungia RPA, Blm, Msh4 ir topoizomerazės. Šie baltymai dalyvauja HJ skaldyme ir netaisyklingai suporuotų nukleotidų reparacijoje. Tiriant rekombinacinius mazgelius pastebėtas dar vienas įdomus dėsniumas. Nustatytas priklausomumas tarp mazgelių vėlyvojoje pachitenoje ir chiazmų skaičiaus.

Chiazmai – tai fiziniai nesesterinių chromatidžių persikryžiavimai homologinėse chromosomose (46 pav.). Pagal chiazmų skaičių nustatomas krosingoverio dažnis ląstelės branduolyje. Krosingoverių skaičius viename branduolyje mejozės metu įvairiuose organizmuose gana panašus. Pavyzdžiui, pelės ląstelėse – 20, lelijos – 50. Tačiau DNR molekulių tarpusavio sąveikų, apie kurias sprendžiama iš RAD51/DMC1 sandraupų, aptinkamų imunocitochemiškai, skaičiai gerokai skiriasi (250 – pelės, 2000 – lelijos ląstelėje).



45 pav. Susiformavę SK segmentai su ankstyvaisiais rekombinaciniais mazgeliais zigotenoje nustatyti penkiose augalų rūšyse (Anderson ir kt., 2001). Rodyklėmis parodyti kai kurie rekombinaciniai mazgeliai. SK vietos be mazgelių pažymėtos intarpo ženklais (^). A – *Cyphomandra betacea*; B – *Tradescantia edwardsiana*; C – *Psilotum nudum*; D – *Allium cepa*; E – *Lilium longiflorum*; F – Pilnas zigoteno bivalentas iš *Lycopersicon esculentum*



46 pav. Chiazmai susidaro mejozės pirmoje profazėje (www.igh.cnrs.fr/equip/demassy/meiosisI.gif)

Tai rodo, kad ne visos DNR-DNR sąveikos perauga į reciprokinę rekombinaciją. Šių sąveikų skaičius šiek tiek koreliuoja su SK ilgiu (pelės – 200 μm , lelijos ląstelėse – 3000 μm). Todėl galima manyti, kad šios baltymų sandraupos dalyvauja SK susidaryme. *SPO11*^{-/-} pelėse Rad51/Dmc1 telkinių nenu-

statyta, todėl manoma, kad rekombinaciniai mazgeliai svarbūs sinapsei. DNR-DNR sąveikos, kurios nepereina į reciprokinę rekombinaciją, greičiausiai pašalinamos baltymų, kurie turi helikazių-topoizomerazių aktyvumus. Jie sugeba atskirti panašias susivijusias ar net susimazgiusias molekules. Šią funkciją gali atlikti topoizomerazinis kompleksas RPA/Msh4/Blm, kuriame gali dalyvauti ir topoizomerazė IIIa. Ji atskiria DNR-DNR jungtis Rad51/Dmc1 sancaupų vietose.

Vėlyvųjų rekombinacinių mazgelių skaičius (11–22 viename žiurkės ląstelės branduolyje) ir pasiskirstymas atitinka Mlh1 baltymo telkinių pasiskirstymą. Tai patvirtina jų svarbą homologinėje rekombinacijoje.

2.3.2.6. Rekombinacija ir chromosomų pasiskirstymo į dukterines ląsteles sutrikimai

1968 m. Henderson ir Edvards iškėlė hipotezę, kad egzistuoja ryšys tarp homologinės rekombinacijos ir chromosomų atsiskyrimo sutrikimų (ang. *non-disjunction*). Pastebėta, kad rekombinacijos dažnio mažėjimą, stebimą didėjant moters amžiui, galima susieti su trisomija (Henderson ir Edvards, 1968). Jie manė, kad vyresnio amžiaus moterų mejozines chromosomas tarpusavyje laiko mažiau chiazmų, dėl to sutrinka chromosomų atsiskyrimas pirmojoje mejozėje. Ši hipotezė paskatino intensyvius citogenetinius reiškinio tyrinėjimus. Didžioji dalis rezultatų gauti tiriant pelės oocitus. Vėlesni tyrimai buvo atliekami ir su žmogaus oocitais. Hipotezė iš esmės nebuvo nei patvirtinta, nei paneigta. Pavyzdžiui, 1987 m. ištyrė 34 šeimas, turinčias palikuonių, sergančių Dauno sindromu, Werner ir kt. nustatė, kad yra ryšys tarp sumažėjusio rekombinacijos dažnio ir žmogaus trisomijos. Nors gauta ir priešingų duomenų.

Dažnai stebima, kad tarp 21-os poros chromosomų chiazmų nesusidaro arba jie susidaro tik distalinėse šių chromosomų srityse. Distaliniai chiazmai taip pat sukelia chromosomų pasiskirstymo sutrikimus. Nustatyta, kad rekombinacijos sumažėjimas gali lemti ir kitų chromosomų trisomijas (♀ – 15, 16, 18, X; ♂ – 21, X, Y).

Įrodyta, kad, nepriklausomai nuo rasės, socialinės padėties ar turimų palikuonių skaičiaus, keturiasdešimtmetės moters palikuoniams trisomijos rizika yra apie 15 kartų didesnė nei dvidešimtmetės, tačiau šio reiškinio priežastys nėra iki galo iširtos. Matyt, įtakos tam turi daugelis su organizmo senėjimu susijusių veiksnių, tarp kurių ir rekombinacijos pokyčiai.

2.3.3. Eukariotų homologinės rekombinacijos baltymai ir jų savybės

Tiek virusų ir bakterijų, tiek žmogaus ir kitų organizmų genai, dalyvaujantys HR, yra konservatyvūs. Ypač konservatyvi genetinių mainų reakcija, kuri vyksta dalyvaujant RecA/Rad51 šeimos baltymams. Tačiau ir kiti rekombinacijos etapai pasižymi gana dideliu juose dalyvaujančių baltymų konservatyvumu. 4 lentelėje pateikiamos *S. cerevisiae* ir žmogaus pagrindinių HR baltymų savybės.

4 lentelė. Baltymai, dalyvaujantys homologinėje rekombinacijoje kepinio mielių (*Sacharomyces cerevisiae*) ir žmogaus (*Homo sapiens*) ląstelėse

<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	Biocheminis aktyvumas/funkcija	Baltymai–partneriai
Rad 50	Rad50	ATPazinis aktyvumas; jungiasi prie DNR esant ATP	Mielių ląstelėse: Mre11; Žmogaus ląstelėse: Mre11, Nbs1, Brca1, BLM ir kt.
Mre11	Mre11	3'→5' dgDNR egz nukleazinis ir vgDNR endonukleazinis aktyvumai; išvynioja DNR dupleksus ir skaldo segtukus	Mielių ląstelėse: Rad50, Xrs2, Zip2, Zip3; Žmogaus ląstelėse: Mlh1, Trf2, Ku70, BLM.
Xrs2	Nbs1	Žmogaus ląstelėse valdo DNR duplekso išvyniojimą ir MRN komplekso nukleazinių aktyvumą; mobilizuoja MRN kompleksą į DNR pažaidų vietas	Mielių ląstelėse: Mre11; Žmogaus ląstelėse: Sp100, Trf1, Trf2, E2f1
Rad51	Rad51	Nuo DNR priklausomas jungimosi prie DNR aktyvumas; nuo ATP priklausomas homologiškų DNR molekulių poravimo ir mainų aktyvumas	Mielių ląstelėse: Rad52, Rad54, Rad55, Rdh54/ Tid1, Sgs1, Zip3, Dmc1, Mlh1, ir kt. Žmogaus ląstelėse: Rad51C, Rad52, Rad54, Rad54b, WNR, Xrcc3, c-Abl, p53, Brca1, Brca2 ir kt.
–	Rad51B	Jungimosi prie DNR aktyvumas (sustiprėja komplekse su Rad51C); proteinkinazinis aktyvumas; ATPazinis aktyvumas, skatinamas DNR	Žmogaus ląstelėse: Rad51C
–	Rad51C	Jungiasi prie DNR (geriau, kai yra komplekse su Rad51B); DNR skatinamas ATPazinis aktyvumas; nuo ATP nepriklausomas DNR grandinių mainų aktyvumas; nuo ATP nepriklausomas, Mg ²⁺ reikalaujantis homologiškų DNR grandinių poravimas; suformuoja filamentines struktūras komplekse su Xrcc3	Žmogaus ląstelėse: Rad51, Rad51B, Rad51D, Xrcc3
–	Rad51D	Jungimosi prie DNR aktyvumas pavieniui arba komplekse su Xrcc2; DNR skatinamas ATPazinis aktyvumas; nuo ATP nepriklausomas, Mg ²⁺ reikalaujantis homologiškų DNR grandinių poravimas; suformuoja filamentines struktūras komplekse su Xrcc2; suformuoja filamentines struktūras komplekse su Xrcc2	Žmogaus ląstelėse: Rad51C, Xrcc2
Rad52	Rad52	Jungimosi prie DNR aktyvumas; vgDNR sulipimą (renatūraciją) sukeliantis aktyvumas; silpnas grandinių mainų aktyvumas; silpnas poravimo pagal homologiją aktyvumas	Mielių ląstelėse: Rpa, Rad51, Rad52, Rad59; Žmogaus ląstelėse: Rpa, Rad51, Rad52, Ube2I/Ubc9, Ubl1, Xpb, Xpd, c-Abl
Rad54	Rad54	Jungimosi prie DNR aktyvumas; nuo dgDNR priklausomas ATPazinis aktyvumas; dgDNR išvyniojimas; dgDNR topologiją modifikuojantis aktyvumas	Mielių ląstelėse: Rad51, Mus81; Žmogaus ląstelėse: Rad51, Mus81
Rdh54/ Tid1	Rad54B	Jungimosi prie DNR aktyvumas; nuo dgDNR priklausomas ATPazinis aktyvumas	Mielių ląstelėse: Rad51, Dmc1; Žmogaus ląstelėse: Rad51

4 lentelės tęsinys

<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	Biocheminis aktyvumas/funkcija	Baltymai–partneriai
Rad55	Xrcc2	Mielėse: ATPazė; žmogaus ląstelėse: jungimosi prie DNR aktyvumas tiek pavienio baltymo, tiek komplekse su Rad51D; nuo ATP nepriklausomas, Mg ²⁺ reikalaujantis homologiškų DNR grandinių suporavimas baltymui veikiant komplekse su Rad51D; komplekse su Rad51D sudaro filamentines struktūras	Mielių ląstelėse: Rad51, Rad57; Žmogaus ląstelėse: Rad51D
Rad57	Xrcc3	Mielėse: ATPazė; žmogaus ląstelėse: jungimosi prie DNR aktyvumas tiek pavienio baltymo, tiek komplekse su Rad51C; nuo ATP nepriklausomas, Mg ²⁺ reikalaujantis homologiškų DNR grandinių suporavimas tiek dalyvaujant šiam baltymui, tiek veikiant komplekse su Rad51C; komplekse su Rad51C sudaro filamentines struktūras	Mielių ląstelėse: Rad55, Zip3; Žmogaus ląstelėse: Rad51, Rad51C
Rad59	–	Jungimosi prie DNR aktyvumas; vgDNR molekulių renatūravimo aktyvumas	Mielių ląstelėse: Rad52, Rad51

2.3.3.1. Rad51 ir Dmc1 rekombinazės

Jau įrodyta, kad *E. coli* ir kitų bakterijų ląstelėse RecA baltymas vaidina pagrindinį vaidmenį homologinėje rekombinacijoje, todėl, atsiradus techninėms galimybėms, panašių baltymų ir jų genų pradėta ieškoti eukariotuose. 1992 m. klonuoti du mielių genai, kurie kodavo baltymus, homologiškus RecA baltymui. Pirmiausia, iš *S. cerevisiae* klonuotas *RAD51* genas, o netrukus iš mielių mejozinių transkriptų klonotekos išskirtas *DMC1* (angl. *disrupted meiotic cDNA*) genas. *S. cerevisiae RAD51* genas buvo klonuotas beveik vienu metu iškart trijose laboratorijose. Jo koduojamas baltymas yra struktūrinis ir funkcinis RecA homologas. Abu baltymai turi 54 proc. panašių aminorūgščių. ScRad51 baltyme skiriami trys rajonai: N galo domenai (1–154 aminorūgštys); konservatyvus centrinis („šerdinis“) rajonas (155 – 374 a. r.); C galo sritis (375 – 400 aminorūgštys). Konservatyviajame rajone, kuris turi A ir B Walker motyvus, aminorūgščių sekos panašumas siekia 61 proc. ScRad51 neturi C gale 112 aminorūgščių, būdingų RecA, tačiau turi papildomai 120 aminorūgščių N gale. Be to, ScRad51 turi numanomą leucino „užtrauktuką“ tarp 296 ir 317 aminorūgščių. Paaiškėjo, kad pirmieji *S. cerevisiae rad51* (angl. *radiation*) mutantai buvo gauti dar 1974 m. Juose sumažėjęs mitozinės ir mejozinės rekombinacijos dažnis bei padidėjęs jautrumas JS, cisplatinai, bleomicinui, MMC, MMS. Nepaisant šių sutrikimų, mielių *S. cerevisiae RAD51* nuliniai mutantai yra gyvybingi. Mejozės metu tokiose ląstelėse kaupiasi DGT, sutrinka sporuliacija.

Dmc1 ir Rad51 baltymai turi biocheminių panašumų ir skirtumų, tiek tarpusavyje, tiek palyginti su RecA (5 lentelė). Pavyzdžiui, ScRad51, HsRad51 kaip ir RecA turi nuo DNR priklausomą ATP-azinį aktyvumą. Polimerizuoja ant vgDNR ir dgDNR molekulių sudarydamas spiralės pavidalo

filamentus. Tačiau tik ScRad51-vgDNR nukleoproteininis filamentas tinkamas substratas genetiniams mainams. Tarp ScRad51 bei RecA yra ir keletas skirtumų. RecA DNR grandinių mainus vykdo 5'→3' kryptimi vgDNR, ant kurios susidaręs filamentas. ScRad51 tokius mainus vykdo abiem kryptimis: tiek 5'→3', tiek 3'→5'. Yra ir daugiau šių baltymų biocheminių savybių skirtumų. Palyginti su RecA, ScRad51 vykdomų mainų apimtys labai ribotos. ScRad51 efektyvumą šioje reakcijoje galima padidinti pridėjus ScRpa ir Rad51 paralogus (Rad55 ir Rad57).

5 lentelė. *E. coli* RecA ir žmogaus Rad51 ir Dmc1 baltymų savybių palyginimas

Savybės	RecA	Rad51	Dmc1
Molekulinė masė (Da)	37842	36966	37707
Natyvi forma	Heksameriniai žiedai	Žiedas	Oktamerinis žiedas
Reikalavimai substratinei DNR	vgDNR>>dgDNR	vgDNR>dgDNR	vgDNR>dgDNR
Jungiasi prie vgDNR	Spiralinis nukleoproteininis filamentas	Spiralinis nukleoproteininis filamentas	Žiedų pavidalo dariniai
Jungiasi prie dgDNR	Spiralinis nukleoproteininis filamentas	Spiralinis nukleoproteininis filamentas	Spiralinis nukleoproteininis filamentas tam tikromis sąlygomis
Stechiometrija	1 monomeras : 3 nt	1 monomeras : 3 nt	Nenustatyta
Grandinės pernešimas	2-10 bp/s, > 6 kbp	Lėtas, < 1,5 kbp	Lėtas
Pernešimo kryptis	5'→3'	3'→5' ir 5'→3'	3'→5' ir 5'→3'

1993 m. buvo klonuoti žmogaus ir pelės *RAD51* genai. HsRad51 sudarytas iš 339 aminorūgščių, molekulinis svoris – 36.9 kDa. HsRad51 ir EcRecA panašumas siekia 55–56 proc. ScRad51 ir HsRad51 aminorūgščių panašumas yra 83 proc., 67 proc. iš jų – identiškos. Taigi *RAD51* yra konservatyvus eukariotuose. Jo homologų aptikta grybuose, augaluose, vabzdžiuose, paukščiuose, žinduoliuose (6 lentelė). Nors ir didelis šių baltymų panašumas, žmogaus baltymas nekomplementuoja mielių *rad51* mutantinio fenotipo.

6 lentelė. Įvairių organizmų Rad51 ir jo pagalbiniai baltymai (Modesti ir Kanaar, 2001)

Organizmas	Rad51	Rad51 asistuojantys baltymai	
		Rad52	Rad51 paralogai
<i>S. cerevisiae</i>	+	+	Rad55, Rad57
<i>C. elegans</i>	+	–	–
<i>D. melanogaster</i>	+	–	Rad51C, Rad51D
Viščiukas	+	+	Xrcc2, Xrcc3, Rad51B, Rad51C, Rad51D
Žmogus	+	+	Xrcc2, Xrcc3, Rad51B, Rad51C, Rad51D

Žinduolių RAD51 baltymas gaminamas dideliais kiekiais kiaušidžių, sėklidžių ir limfoidiniuose audiniuose.

Manoma, kad penki anksčiau minėti *HsRAD51* tipo genai (*RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D*, *XRCC2* ir *XRCC3*) galėjo atsirasti dėl *RAD51* duplikacijos. Vėliau jie, matyt, įgijo naujų savybių ir gali būti vadinami *HsRAD51* paralogais.

Mielių *RAD51*⁻ nuliniai mutantai yra gyvybingi, tačiau nepavyko gauti gyvybingų *RAD51*⁻ kamieninių pelės embriono ląstelių ir viščiuko B limfocitų. Neišgyvena žinduolių *RAD51*^{-/-}, *RAD51B*^{-/-}, *RAD51D*^{-/-} mutantai. Jie žūva embriono stadijoje. *XRCC*^{-/-} genotipo peliukai žūva gimdami. Tai rodo šių genų svarbą ląstelių dalijimuisi ir (ar) genomo stabilumo palaikymui. Iš šio tipo baltymų, aprašytų žmogaus ląstelėse, didžiausiu funkciniu konservatyvumu RecA atžvilgiu išsiskiria HsRad51. Jis kaip ir RecA turi nuo DNR priklausomą ATPazinį aktyvumą, polimerizuojasi ant vgDNR ir dgDNR molekulių, sudarydamas spiralės pavidalo filamentus. Tačiau HsRad51, palyginti su RecA, nėra labai efektyvus DNR grandinių mainuose. Jam reikalingi papildomi baltymai (HsRpa, HsRad52 ir kt.) mainams vykdyti.

Viena svarbiausių eukariotų Rad51 baltymų savybių – jų sąveika su daugeliu kitų baltymų (4 lentelė). Pavyzdžiui, – nustatyta, kad ScRad51 tiesiogiai sąveikauja su kitais Rad52 epistazinės grupės baltymais (Rad52, Rad54, Rad55, Rdh54/Tid1) ir Sgs1 (WRN ir BLM homologas). Kaip minėta, su kai kuriais iš jų Rad51 sudaro rekombinosomą ir aptinkamas DGT vietose mejozinės rekombinacijos metu. HsRad51 sąveikauja su dar daugiau baltymų. Jis taip pat sudaro įvairius kompleksus su savo paralogais, pavyzdžiui, HsRad51-Rad51C-Xrcc3.

Rad51 paralogų savybės dar tik pradedamos tirti. Pavyzdžiui, Rad51B turi proteinkinazės aktyvumą. Jis sąveikauja su daugeliu svarbių ląstelės baltymų (p53, ciklinu E, Cdk2 ir kt.). Galbūt Rad51B dėl savo kinazinio aktyvumo veikia ląstelės ciklą, todėl jis vėluoja G1 stadijoje. Rad51B ir Rad51C sudaro kompleksą, gali sąveikauti su įvairios sandaros DNR molekulėmis, ypač su dgDNR, turinčia viengrandį 3'galą. Unikalus Rad51B gebėjimas specifiskai jungtis prie HJ. Be jungimosi prie DNR, Rad51B, C, D turi nuo DNR priklausomą ATPazinį aktyvumą. Rad51C (skirtingai nuo Rad51B) gali vykdyti grandinių mainus panašiai kaip ir Rad51. Šiam vyksmui nereikalingas ATP, nes Rad51C gali denatūruoti DNR. Tai tikriausiai unikali šio baltymo savybė. Žiurkėno ląstelių linija, kurioje pažeisti *XRCC2* ir *XRCC3* genai, yra jautri JS. Joje stebimas chromosomų nestabilumas, kuris greičiausiai yra sutrikusios HR pasėkmė.

Taigi Rad51 paralogai atlieka ne perteklines funkcijas, kaip manyta anksčiau, bet turi unikalių savybių. Jų vaidmuo HR labai specifiskas. Jie veikia tik tam tikromis sąlygomis, tam tikro tipo ląstelėse arba tik tam tikrose ląstelės ciklo stadijose. Pavyzdžiui, *XRCC2* ir *XRCC3* genai veikia smegenyse, kurių ląstelėse Rad51 raiška labai maža. Vis dėlto nė vienas iš šių žmogaus baltymų negali pakeisti ScRad51 DGT sukeltose rekombinacijoje, o HsRad51 paralogai negali pakeisti HsRad51. Tai rodo šio baltymo svarbą žinduolių DNR metabolizme ir organizmo raidoje. Tiriant žmogaus Rad51 transgeną viščiuko ląstelių kultūroje, įrodyta, kad jeigu šis genas išjungiamas, tai ląstelėse, esančiose G2 ir M stadijose, kaupiasi chromosomų trūkiai ir jos žūva. HsRad51 baltymo vaidmuo organizmo raidoje pa-

mažu ėmė aiškėti, kai buvo nustatyta jo sąveikos su p53 ir BRCA baltymais. Dar vienas HR baltymų dalyvavimo organizmo raidoje pavyzdys – vaisinės muselės *spindle* (*spnB*) genas. Jeigu šis genas išjungiamas, patelės organizme sutrinka oogenezė. Iš tokių oocitų besiformuojančiame embrione pažeidžiamas bendrojo kūno plano susidarymas. Oocitams būdinga ryški ventralizacija, kurią, matyt, sukelia signalinių molekulių paskirstymo sutrikimai. Kai *spindle* genas buvo klonuotas, pasirodė, kad jo seka giminiška *recA/RAD51* šeimai. Vaisinės muselės lervos, turinčios mutaciją *spindle* gene, nepasižymėjo padidėjusiu jautrumu DNR pažaidas sukeliantiems veiksniais, tačiau jose buvo susilpnėjusi mejozinė rekombinacija ir sutrikęs chromosomų atsiskyrimas.

Eukariotų ląstelėse be Rad51 yra ir kita panašų aktyvumą turinti rekombinazė – Dmc1. Jeigu Rad51 labai svarbus DNR trūkių reparacijai mitozės metu, nors veikia ir mejozėje, tai Dmc1 reiškiasi tik mejozės metu ir reikalingas mejozinei rekombinacijai. Mielių *Dmc1* mutantai nesudaro sporų. Rad51 ir Dmc1 baltymų aminorūgščių panašumas siekia 54 proc.

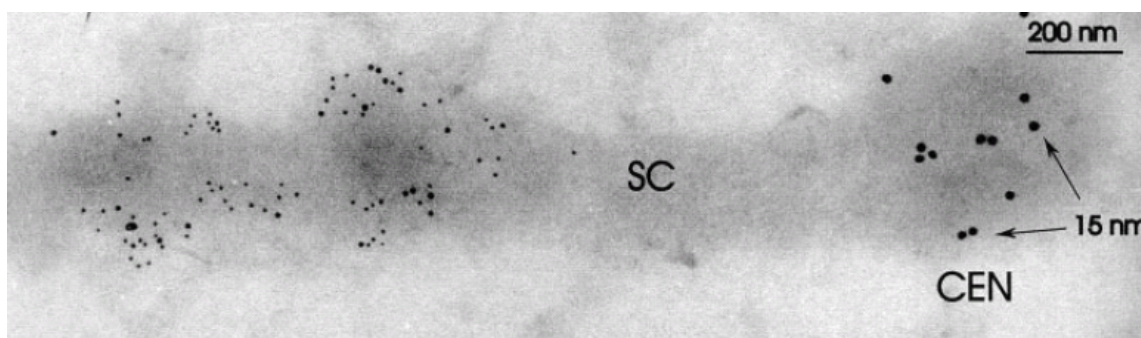
Abi rekombinazės veikia mejozėje, todėl įdomi jų tarpusavio sąveika. Ryšys tarp šių baltymų buvo nustatytas atradus mejozei specifinį baltymą Hed1, kuris, nesant Dmc1, slopina Rad51 aktyvumą. Mutacijos *HED1* gene panaikina mejozės slopinimą *dmc1* mutantuose ir aktyvuoja Rad51 mejozei specifiskų DGT ištaisymui (Tsubouchi ir Roeder, 2006). Imunocheminiai tyrimai rodo, kad Hed1 ir Rad51 tiesiogiai sąveikauja vienas su kitu. Tai patvirtina šiuo metu vyraujančią nuomonę, kad kepimo mielėse mejozės metu daugumą grandinių mainų atlieka Dmc1 baltymas. Vis dėlto tam tikromis sąlygomis jį gali pakeisti Rad51 (Sheridan ir Bishop, 2006; Tsubouchi ir Roeder, 2006). Rad51 aktyvumo valdyje mejozės metu dalyvauja ir su ašiniais elementais susiję baltymai (Xu ir kt., 1997; Niu ir kt., 2005). Įrodyta, kad trys tarpusavyje susiję ašinių elementų baltymai (Red1, Hop1 ir Mek1) reguliuoja rekombinacijos procesą, slopindami nuo Dmc1 nepriklausomą rekombinaciją. Tačiau skirtingai nei jie Hed1 slopina Rad51 labiau tiesiogiai ir specifiskai.

Dmc1 panašumas į RecA ir Rad51 nustatytas ištyrus mutantus ir atlikus klonuoto geno sekos analizę. Tam tikrų Dmc1 ir Rad51 skirtumų aptikta tiriant baltymus EM. Dmc1 tirpale linkęs sudaryti aštuonių subvienetų žiedo pavidalo struktūras. Panašius darinius jis sudarydavo ir sąveikaudamas su DNR. Dėl šios priežasties iš pradžių manyta, kad baltymas genetinius mainus vykdo kitaip nei Rad51, tačiau vėliau nustatyta, kad tam tikromis sąlygomis Dmc1 taip pat sudaro nukleoproteininius filamentus, įprastus RecA tipo rekombinazėms (Sehorn ir kt., 2004; Bugreev ir kt., 2005). Netikėta tai, kad ilgų šio baltymo nukleoproteininių filamentų ant vgdNR susidarymą skatina ne Mg^{2+} , bet Ca^{2+} jonai. Jie taip pat skatina ir Dmc1 vykdomus grandinių mainus.

Savo funkcijoms ląstelėje atlikti Dmc1 ir Rad51 naudoja skirtingus papildomus veiksnius. Rad51 polimerizaciją DGT vietoje skatina Rad52 ir Rad55-Rad57. Tuo tarpu Dmc1 žiedo susidarymas bent iš dalies priklauso nuo Rad51, o jo aktyvumas – nuo Sae3-Mei5 baltymo (Tsubouchi ir Roeder, 2003). Rad54 ir Tid1/Rdh54 baltymai skatina abiejų rekombinazių aktyvumus, tačiau *in vivo* Rad54 paprastai

veikia su Rad51, o Tid1/Rdh54 su Dmc1. Dmc1 vykdomą rekombinaciją dar skatina Hop2-Mnd1 (Henry ir kt., 2006).

Abi rekombinazės dažnai veikia kartu. Tai įrodyta daugeliu eksperimentų. Chromosomų imunologinis dažymas atskleidė, kad tiek Rad51, tiek Dmc1 sudaro nuo DGT priklausomus telkinius, kurių lokalizacija, vykstant grandinių mainams mejozėje, dažniausiai sutampa. Tai patvirtina ir tyrimai, atlikti EM (Tarsaunas ir kt., 1999). Šie baltymų telkiniai susidaro tuo pat metu kaip ir DGT ir pradeda nykti tuojau po to, kai chromosomose įvyksta sinapsė (47 pav.). Tai dar kartą patvirtina, kad pagrindinis rekombinacijos kelias eukariotuose priklauso nuo abiejų rekombinazių, bet neatmetama ir jų veikimo atskiruose rekombinacijos keliuose galimybė.



47 pav. RAD51 ir DMC1 baltymų lokalizacija žiurkės spermatocituose nustatyta imunoaukso EM metodu. DMC1 išryškina antikūnai, susiję su 5 nm dydžio aukso dalelėmis; RAD51 – antikūnai, sujungti su 10 nm dydžio aukso dalelėmis. Centromeros nudažytos su žmogaus CREST serumu bei 15 nm dydžio aukso dalelėmis. Paveiksle matomi RAD51/DMC1 baltymų telkiniai ant homologiųjų chromosomų visiškos sinapsės metu pachitenos stadijoje (pagal Tarsounas ir kt., 1999)

7 lentelė. Pagrindinių mejozės genų eukariotuose ir jų prokariotinių homologų filogenetinis paplitimas (pagal Ramesh ir kt., 2005)

	EUKARIOTAI	Spo11	Mre11	Rad50	Hop1	Hop2	Mnd1	Rad52	Dmc1	Rad51	Msh4, Msh5	Msh2, Msh6	Mlh1	Mlh2	Mh3	Pms1
Pirmuonys	<i>Giardia</i>	+ _s	+ _s	+ _s	+ _s	+ _p	+ _s	+ _s	+ _{s(2)}	–	–, –	+ _{ss} , + _s	+ _s	+ _s	–	+ _s
	<i>Trypanosoma/Leishmania</i>	+ _p	+ _p	+ _n	+ _p	+ _p	+ _n		+ _p	+ _p		+ _p , + _p	+ _p		[+ _p]	+ _p
	<i>Entamoeba</i>	+ _p	+ _p	+ _n		+ _n	+ _n	+ _n	+ _p	+ _p	+ _n , + _n	+ _n , + _n	+ _n		+ _p	+ _{n(2)}
	<i>Plasmodium</i>	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	–	+ _p	+ _p	–, –	+ _{p(2)} , + _p	+ _p	–	–	+ _p
Gyvūnai	<i>Homo</i>	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p , + _p	+ _p , + _p	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p
	<i>Mus</i>	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p , + _p	+ _p , + _p	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p
	<i>Drosophila</i>	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	–	–	–	–	+ _p	–, –	+ _p , + _p	+ _p	–	–	+ _p
	<i>Anopheles</i>	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	–	–	–	–	+ _p	+ _p , –	+ _p , + _p	+ _p	–	–	+ _p
	<i>Caenorhabditis</i>	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	–	–	–	–	+ _p	+ _p , + _p	+ _p , + _p	+ _p	–	–	+ _p
Grybai	<i>Saccharomyces</i>	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p , + _p	+ _p , + _p	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p
	<i>Schizosaccharo.</i>	+ _p	+ _p	+ _p	–	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	–, –	+ _p	+ _p	–	–	+ _p
	<i>Neurospora</i>	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	–	–	+ _p	–	+ _p	(+ _n), + _p	+ _p , + _p	+ _p	+ _p	(+ _n)	+ _p
	<i>Encephalitozoon</i>	+ _p	+ _p	+ _p	–	+ _p	+ _p	+ _p	–	+ _p	–, –	+ _p , + _p	+ _p	–	–	+ _p
Augalai	<i>Arabidopsis</i>	+ _{p(3)}	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	–	+ _p	+ _p	+ _p , + _p	+ _p , + _{p(2)}	+ _p	–	+ _p	+ _p
	<i>Oryza/Zea</i>	+ _{p(3)}	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	+ _p	–	+ _p	+ _{p(2)}		+ _p , + _{p(2)}	+ _p			+ _n
	Archebakterijos	TopoVI	SbcD	SbcC	–	–	–	–	RadA							
	Bakterijos	–	–	–	–	–	–	–	RecA			MutS				MutL

Molekuliniai evoliucijos tyrimai rodo, kad Rad51 ir Dmc1 baltymų geno-protėvio duplikacija turėjo įvykti labai anksti eukariotų evoliucijoje (Ramesh ir kt., 2005). Matyt, kad šie baltymai eukariotuose yra dažnai aptinkami, nes buvo išskirti ne tik iš kepiamo mielių, bet iš daugelio kitų organizmų.

tarp jų ir žmogaus (7 lentelė). Tiesa, iki šiol Dmc1 homologų neaptikta *Diptera* būrio atstovuose ir nematoduose. Manoma, kad šio geno delecija minėtose organizmų grupėse įvyko daug vėliau evoliucijos eigoje ir abiem atvejais nepriklausomai. Kitas kraštutinumas – *A. thaliana* ląstelėse Dmc1 yra būtinas krosingoveriui tarp homologinių chromosomų. Šio augalo *Dmc1* mutantuose diplotenoje nesusidaro chiazmai. Tuo tarpu *Rad51* mutante chiazmai susidaro. Dmc1 baltymo geno inaktyvacija tiek *A. thaliana*, tiek pelėse sukelia sterilumą. *Dmc1* $-/-$ mutantuose sutrinka sinapsė mejozėje. Ji netgi pradeda vykti tarp nehomologinių chromosomų.

2.3.3.2. Rad51 nukleoproteininio filamento susidarymo tarpininkai

Įvairių organizmų genomų sekoskaitos duomenys rodo, kad evoliucijos eigoje kito baltymų, tarpininkaujančių Rad51 vykdomoje DNR grandinių mainų reakcijoje, sudėtis (Modesti ir Kanaar, 2001) (8 lentelė). Nuo Rad51 priklausomi DNR grandinių mainai *in vitro* labai blogai vyksta, jeigu į reakcijos mišinį prieš ar kartu su rekombinaze įterpiamas RPA baltymas. Ši, mainus slopinanti RPA poveikį, galima pašalinti su Rad52 baltymu. Tyrimai rodo, kad Rad52 baltymas sąveikauja su Rad51 ir RPA. Rad52 skatina Rad51 nukleoproteininio filamento susidarymą ant vgdNR, pašalindamas nuo jos RPA (44 pav.). Mutacijos, dėl kurių pašalinamas Rad52 C-galinis rajonas, arba 409 – 412 aminorūgštys, atsakingos už sąveiką su Rad51, blokuoja Rad52 kaip nukleoproteininio filamento susidarymo tarpininko funkciją. Galbūt Rad52 reikalingas ne tik Rad51 „pakrovimui“ ant RPA padengtos vgdNR, bet ir Rad51 lokalizacijai DGT vietoje.

8 lentelė. Rekombinazės ir pagalbiniai veiksniai

Organizmai	Rekombinazė	Ssb funkcinis homologas	Tarpininkai
T4	UvsX	Gp32	UvsY
<i>E. coli</i>	RecA	SSB	RecO, RecR, RecF, RecBCD
<i>S. cerevisiae</i>	Rad51	RPA	Rad52, Rad55, Rad57
Stuburiniai	Rad51	RPA	Rad52, Rad51B, Rad51C, Rad51D, Xrec2, Xrec3, [Brca1, Brca2]

Rad55 ir Rad57 taip pat yra Rad51 nukleoproteininio filamento susidarymo tarpininkai (44 pav.). Rad55 ir Rad57 yra Rad51 paralogai, turintys 20–30 proc. identiškų su Rad51 aminorūgščių. Nuliniai *rad55* ir *rad57* mutantai yra jautrūs JS. Tyrimai rodo, kad šie du baltymai tikriausiai skatina Rad51 filamento susidarymą ir jį stabilizuoja. Jie sudaro stabilų heterodimerą, kuris jungiasi prie vgdNR ir turi silpną ATPazės aktyvumą. Sustiprinta Rad51 raiška arba mutacijos, didinančios šio baltymo gimišumą vgdNR, supresuoja *rad55* ir *rad57* mutantinį fenotipą. Rad55 sąveikauja su Rad51, tačiau nesąveikauja su RPA. Tai rodo, kad šio baltymo kaip tarpininko vaidmuo skiriasi nuo Rad52. Įdomu ir tai, kad *Rad52* mielių mutantai pasižymi daug didesniais sutrikimais nei mutantinės pagal šį geną žinduolių ląstelių linijos. Priešingai – mielių *Rad55/Rad57* mutantai neišsiskiria didesniais rekombinacijos sutrikimais, nors žinduolių ląstelėse, kuriose nuslopinti Rad51 paralogai, yra negyvybingos. Taigi galima daryti išvadą, kad galbūt žinduolių ląstelėse dalį svarbių Rad52 funkcijų perėmė Rad51 paralo-

gai. Gana netikėta ir tai, kad, remiantis sekoskaitos duomenimis, *C. elegans* ląstelėse neaptikta Rad51 vykdomoje mainų reakcijoje tarpininkaujančių baltymų. Dėl didelio nematodo *CeRad51* geno panašumo su *HsRAD51* (59 proc. identiškų aminorūgščių) negalima teigti, kad jo koduojamas baltymas galėjo įgyti papildomų savybių. Tikėtina, kad *C. elegans* Rad51 tarpininkai yra kiti baltymai, neturintys panašumo į Rad52 ar Rad51 paralogais. Kad negiminiški baltymai gali atlikti panašias funkcijas, rodo *E. coli* homologinės rekombinacijos tyrimai. Šiame organizme RecA baltymo prisijungimą prie vgdNR skatina tiek RecBCD, tiek RecFOR baltymai. Jų struktūra nepanaši nei tarpusavyje, nei su Rad52 ar Rad51 paralogais.

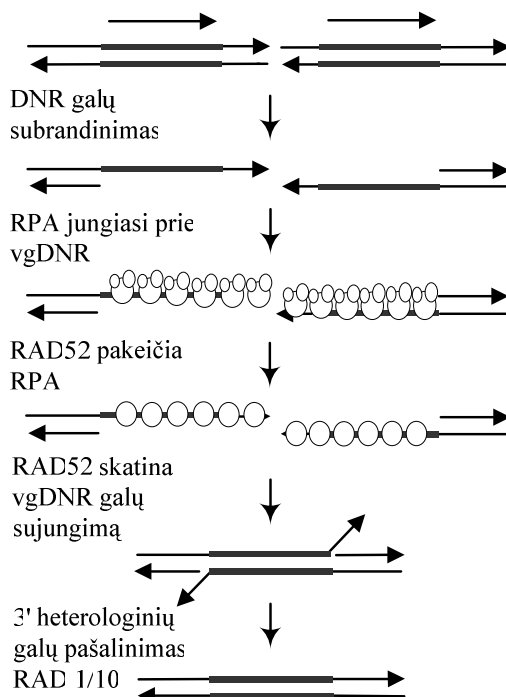
Rad54 baltymas priklauso chromatiną permodeliuojančių baltymų Swi2/Snf2 šeimai. Jis skatina Rad51 jungimąsi prie vgdNR *in vitro* esant RPA bei stabilizuoja nukleoproteininį filamentą. Vis dėlto genetiniai *rad54* mutantų tyrimai nepatvirtina *in vivo* tokios šio baltymo funkcijos. Šiuose mutantuose susidaro Rad51 telkiniai ir jie egzistuoja ilgiau nei laukinio tipo kamienuose. Vėlgi *in vitro* eksperimentai rodo, kad Rad54 ir jam giminiškas Rdh54 skatina D-kilpos susidarymą. Abu šie baltymai yra nuo dgDNR priklausomos ATPazės, galinčios sukelti superspiralizacijos pokyčius. Jų vykdomas grandinių atskyrimas DNR molekulėje gali skatinti homologijos paiešką bei naujų vandenilinių jungčių susidarymą homologijos vietoje. Taip pat manoma, kad Rad54 baltymas gali pakeisti nukleosomas ar baltymus, slopinančius grandinės įterpimą į DNR molekulę. Mielųjų *rad54* mutantuose vyksta DNR iš *MAT* ir *HML* lokusų poravimasis, tačiau nevyksta DNR sintezė nuo 3' galo. Tai rodo, kad šis baltymas ypač svarbus ir posinapsinėje stadijoje. Yra duomenų, patvirtinančių Rad54 gebėjimą skatinti heteroduplekso plėtimąsi.

Manoma, kad stuburiniuose gyvūnuose Rad51 padeda ir BRCA baltymai (Powell ir Kachnic, 2003). *BRCA1* vaidmuo HR pradėjo aiškėti tiriant mutantų ląstelių kultūras. Ląstelių linijos, kuriose nėra BRCA1 baltymo, jautresnės jonizuojamajai spinduliutei. Tokiose ląstelėse HR dažnis sumažėjęs keletą kartų. Daugiau žinoma apie BRCA2 vaidmenį HR. BRCA2 baltymas labai didelis, jį sudaro 3418 aminorūgštys (385 kDa). Bene vienintelė abejonių nekelianti šio baltymo funkcija, HR skatini-mas. Šis baltymas sąveikauja su keletu HR baltymų, tarp jų ir RAD51. Pastarasis jungiasi su BRCA2 pasikartojančiomis sekomis, vadinamomis BRC, kurias koduoja labai didelis *BRCA2* 11-tas egzonas. Nors yra aštuonios tokios BRC sekos, RAD51 stipriausiai sąveikauja su dviem iš jų (BRC3 ir BRC4). Manoma, kad BRCA2 skatina RAD51 nukleoproteininio filamento susidarymą ląstelės ciklo S fazėje, neleisdamas įvykti chromosomos persitvarkymams. *BRCA2* -/- ląstelėse šioje stadijoje stebimos rekombinacijos klaidos, dėl kurių susidaro chromosomų aberacijos. Dar vienas galimas teigiamas BRCA2 poveikis HR yra RPA pašalinimas nuo vgdNR. *BRCA2* nebūdingas tik žinduoliams. Jo homologų taip pat aptinkama augaluose ir grybuose (Kowalczykowski, 2005). Vienas toks baltymas pavadintas BRH2 (angl. *BRCA2* *homologue*), išskirtas iš *Ustilago maydis*. Dėl mažesnės savo molekulinės masės bei paprastesnės sandaros (turi tik vieną BRC seką) šis baltymas daug patogesnis eksperimentuose *in vitro* nei BRCA2. Panaudojus BRH2, nustatyta, kad jis „užkrauna“ RAD51 ant DNR toje vie-

toje, kur jungiasi vg ir dgDNR. Taigi jis eukariotuose veikia kaip bakterijų RecFOR baltymų funkcinis homologas. Šie ir kiti tyrimų duomenys rodo, kad BRCA2 ir jo homologai kitose organizmų grupėse veikia kaip RAD51 tarpininkai HR būdu šalinant DGT.

2.3.3.3. Nuo *RAD51* nepriklausoma rekombinacija

Nuo RAD51 priklausomas rekombinacijos kelias yra pagrindinis būdas šalinti DGT mitozinėse mielių ląstelėse ir geno konversijai vykti, tačiau kai kuriais atvejais rekombinacija gana efektyviai vyksta ir *rad51* mutantuose. Tai rodo papildomo rekombinacijos kelio egzistavimą. Pastarasis reikalauja *RAD52* ir galbūt *RAD59*. Kaip minėta, *RAD52* geno delecija mielėse sukelia labai didelius rekombinacijos sutrikimus: visiškai išsiderina geno konversija, sutrinka viengrandžių DNR galų susijungimas, telomerų atstatymas, rekombinacija tarp invertuotų homologiškų sekų. O mutacija *RAD51* gene neturi įtakos vgDNR galų susijungimui, tik 5–10 kartų sumažėja rekombinacija tarp invertuotų homologiškų sekų, telomerų rekombinacija taip pat ne visiškai sutrinka. Tiek žmogaus, tiek mielių Rad52 baltymas, kaip rodo EM, iš monomerų sudaro žiedo pavidalo struktūras. Išvalytas Rad52 jungiasi prie vgDNR ir skatina komplementarių DNR grandinių susijungimą (48 pav.). Šią reakciją palankiai veikia ir RPA baltymas, kurį RAD52 vėliau pašalina nuo vgDNR. HsRad52 skatina grandinių mainus ir D-kilpų susidarymą.



48 pav. RAD52 vykdomas vgDNR galų susijungimas (pagal Symington, 2002). Po susijungimo likusius nesuporuotus vgDNR galus pašalina RAD1-RAD10 nukleazė, kuri skelia jungtį tarp vg ir dgDNR

RAD59 buvo nustatytas mutantuose, kuriuose sutrikusi nuo *RAD51* nepriklausoma rekombinacija tarp invertuotų homologiškų sekų. *RAD59* svarbus vgDNR galams susijungti. Jeigu viengrandžiai galai yra trumpi, sujungimą vykdo Rad52. Išvalytas Rad59 jungiasi prie vgDNR ir dgDNR bei skatina kom-

plementarių vgDNR molekulių susijungimą. Tačiau Rad59 negali pakeisti Rad52 nuo Rad51 nepriklausomoje rekombinacijoje. Taigi šis baltymas vertinamas kaip Rad52 aktyvumą skatinantis veiksnys.

2.3.4. Homologinė rekombinacija augaluose

HR augaluose tirti verta dėl keleto svarbių priežasčių. Pirma, augaluose skirtingai nei gyvūnuose, svarbiausių HR genų išjungimas neduoda letalaus fenotipo. Todėl, tiriant gautus mutantus, galima daugiau sužinoti apie šių genų funkcijas. Antra, augaluose generatyvinės ląstelės susidaro iš somatinių vėlyvoje organizmo raidos stadijoje. Todėl pokyčių, įvykusių somatiniuose audiniuose, perdavimo kitoms kartoms galimybė yra didesnė (Schuermann ir kt., 2005).

Augalų HR tyrimai stipriai pasistūmėjo į priekį dėl naujų transpozoninės, T-DNR bei iRNR mutagenezės metodų panaudojimo ir *A. thaliana* genomo sekos nustatymo (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000). Augaluose mejozinė rekombinacija taip pat prasideda DGT susidarymu. Skirtingai nei daugelis kitų organizmų *Arabidopsis* turi net tris Spo11 baltymo paralogus. *A. thaliana SPO11-1* geno mutante beveik nevyksta sinapsė, labai sumažėjęs chiazmų skaičius. Tolesniame etape daugelyje organizmų svarbus vaidmuo tenka MRX (MRN) baltymų kompleksams. Gauti vairenio *Mre11* ir *Rad50* ortologų mutantai. Juose vyksta chromosomų fragmentacija, sutrinka sinapsė. Tai rodo, kad vairenio MRE11-RAD50 kompleksas dalyvauja ankstyvuosiuose HR etapuose. Iki šiol augaluose nerasta trečiojo MRX (MRN) komplekso komponento homologų. Tolesniame mainų etape dalyvauja *A. thaliana DMC1* ir *RAD51* genai. Skirtingai nei gyvūnų augalų *RAD51* *-/-* mutantai išgyvena. Be to, šios rekombinazės augaluose sąveikauja su dviem BRCA2 paralogais, kurių mutantų augaluose fenotipas labai panašus į *Rad51* *-/-* ar *Dmc1* *-/-* paralogų mutantus: vyksta chromosomų fragmentacija, nėra sinapsės. Augaluose aptikta ir *RAD51* bei *XRCC3* giminiškų genų. Augalų *XRCC3* geno mutantai yra sterilūs, pažeistos vėlyvosios jų mejozės stadijos. Tačiau mejozės metu susidarantys bivalentai atrodo normaliai. Iki šiol neaišku, ar augaluose yra *RAD52* geno homologų.

Manoma, kad kai kurie bakterijų MutS ir MutL baltymų homologai skatina HJ migraciją ir sukarpyimą. *Arabidopsis MLH1* mutantas neturi mejozės sutrikimų. Mutacija *AtMSH4* gene mažina chiazmų skaičių, lėtina ir sutrikdo sinapsę. Galbūt augalų MSH4 kaip ir žmogaus veikia kartu su MSH5, palaidydami greta viena kitos homologines chromosomas, sujungtas HJ (Snowden ir kt., 2004). *Arabidopsis* genome aptiktas ir *ATM* homologas. Jo mutantų fenotipas panašus į *XRCC3* mutantų.

Homologinė rekombinacija vyksta ir augalų mitochondrijų bei chloroplastų genomuose. Šie organoidai turi savas homologinės rekombinacijos sistemas. Įdomiausia tai, kad mitochondrijose ir plastidėse, kaip ir bakterijų ląstelėse, homologinė rekombinacija yra pagrindinis genetinių mainų būdas. Nustatyta, kad chloroplastuose vyksta vidumolekulinė ir tarpmolekulinė homologinė rekombinacija. Pavyzdžiui, dėl rekombinacijos tarp toje pačioje molekulėje esančių vienos krypties pasikartojančių sekų gali susidaryti kviečių ir miežių, regeneruotų iš mikrosporų ląstelių kultūros, *albino* mutantai.

Nepaisant to, kad augalų HR jau labai seniai naudojama praktikoje (kryžminimui ir atrankai hibridų, kurie, kuriant naujas veisles, išsiskiria naujais požymių deriniais) ir to, kad jau padaryta pažanga augalų genomikoje, dar lieka nemažai neatsakytų klausimų apie HR mechanizmus šioje organizmų grupėje.

2.3.5. Chromatino vaidmuo šalinant DGT homologinės rekombinacijos būdu

DGT šalinimo mechanizmai *in vitro* dažniausiai tiriami naudojant „nuogas“ DNR molekules ir įvairius rekombinacijos baltymus, tačiau tokia DNR labai skiriasi nuo DNR, egzistuojančios ląstelėje fiziologinėmis sąlygomis. Ląstelėje DNR yra organizuota į chromatina ir glaudžiai susijusi su baltymais. Tokia organizacija leidžia suglausti ir apsaugoti DNR nuo nukleazų poveikio. Chromatino struktūros vienetas yra nukleosoma. Jos šerdinę dalį sudaro ~146 bp DNR atkarpa, dukart apvyniota aplink histonų oktamerą, kurį sudaro po dvi keturių rūšių histonų molekules: H2A, H2B, H3 ir H4. Šių baltymų molekules turi domenų, kurie dalyvauja baltymų tarpusavio sąveikoje bei jų sąveikoje su DNR. Tokios sąveikos lemia nukleosomos šerdinės dalies susidarymą. Be to, šie histonai turi laisvus NH₂ galus, vadinamus histonų „uodegomis“, kurios išsikišusios iš nukleosomos. H2A bei H2B dar turi ir karboksilinio galo „uodegas“. Eukariotuose aptinkama ir keletas retesnių histonų, kurių aminorūgščių sudėtis šiek tiek pakitusi. Tokie histonai daro įtaką tiek pačios nukleosomos struktūrai, tiek chromatino organizacijai. Chromatino sandarą stipriai veikia ir įvairūs fermentai, kurie gali kovalentiškai modifikuoti histonus bei pakeisti, permodeliuoti paties chromatino organizaciją. Histonus modifikuoti kovalentiškai gali daug baltymų: histonų acetiltransferazės (HAT), histonų metiltransferazės, protein kinazės, ubikvitinproteinligazės ir SUMO proteinligazės.

Didelis chromatino suglaustumas trukdo aptikti ir ištaisyti DGT. Tačiau jau seniai žinoma, kad DGT sukelia chromatino persitvarkymą. Vėliau buvo išaiškinta, kad DGT sumažina chromatino gijų kompaktiškumą, keičia nukleosomų padėtį ir sukelia histonų oktamerų atsipalaidavimą. Dėl šių pokyčių pažaidos labiau prieinamos pažaidų „jutikliams“. DGT taip pat sukelia histonų „uodegų“ potransliacines modifikacijas. Svarbiausia modifikacija yra histono H2A (žinduoliuose H2AX) išsikišusios karboksilinio galo dalies [KATQAS*QEY- COOH] motyvo fosforilinimas – tai vadinama γ fosforilinimu. Fosforilinama 139 serino liekana. Per keletą minučių fosforilintas H2AX (vadinamas γ -H2AX) išplinta per tūkstančius bazių porų, supančių DGT. H2AX nėra žemesniuose eukariotuose. Tačiau motyvas, kuris fosforilinamas šiame histone, aptinkamas kituose H2A šeimos nariuose.

Yra du alternatyvūs DGT šalinimo keliai: HR ir NR, kurių pasirinkimą, matyt, lemia ląstelės būseną. Žinduolių ląstelėse NR vaidina svarbiausią vaidmenį šalinant DGT ląstelės ciklo G1 stadijoje, o HR – S stadijoje, nes tuo metu atsiranda papildoma genetinės medžiagos kopija, kurią galima panaudoti kaip šabloną šalinant DGT. Ląstelės atsakui į DGT labai svarbios PIK kinazės: ATM (Tel1 *S. cerevisiae*), ATR (Mec1 *S. cerevisiae*) ir DNR-PK. Šie baltymai jungiasi prie trūkusių arba jau subrendusių DNR galų dažniausiai per adapterinius baltymus. Šiuo metu vyrauja nuomonė, kad dvigrandžius trū-

kius pirmiausia aptinka MRN/MRX arba Ku70-Ku80 (Downs ir kt., 2007). Šių baltymų savybė – sąveika su DGT. Jie pritraukia PIK kinazes, o pastarosios fosforilina H2AX. DGT efektorinis baltymas MDC1, mobilizuojamas į DGT vietą nepriklausomai nuo H2AX ir atpažįsta šio histono fosforilinimą.

ATM baltymas – vienas svarbiausių ląstelės atsake į DGT susidarymą. Šis baltymas dažniausiai aptinkamas besidalijančių ląstelių branduoliuose, kur į DGT susidarymą energingai reaguoja. ATM – 350 kDa oligomerinis baltymas, kuris turi kinazės aktyvumą. Šį aktyvumą skatina medžiagos, sukeliančios DGT *in vivo* ir linijinės DNR molekulės *in vitro*. Atominės jėgos elektroninis mikroskopas parodė, kad ATM monomerai jungiasi prie DNR galų. Apšvitinus ląsteles jonizuojamąja spinduliuote, ATM fosforilina H2AX, Chk2, p53, NBS1, BRCA1 ir kt. baltymus, vykdo autofosforilinimą. Pastarasis sukelia baltymo perėjimą iš oligomerinės būsenos į monomerinę, kuri svarbi DGT šalinimui. Taigi ATM veikia ir kaip DGT jutiklis, ir kaip signalo nešiklis. Intensyvus H2AX histono „uodegos“ fosforilinimas (γ H2AX susidarymas) aplink atsiradusį trūkį, manoma, sutelkia į tą vietą MRN kompleksą, RAD51, BRCA1 ir kt. baltymus, dalyvaujančius DGT šalinimo procese (Shiloh, 2003).

Matyt, chromatino dekondensacija yra viena pirmųjų DGT atsiradimo pasekmių. Ji sukelia tolesnius įvykius, kurių vienas pirmųjų – histono H2AX fosforilinimas. Jį gali vykdyti visos trys PIK kinazės, bet svarbiausias vaidmuo tenka ATM. Apie DGT susidarę γ H2AX židiniai sutampa su 53BP1 sankauptomis bei vėliau atsirandančiais BRCA1 ir MRN baltymų telkiniais. Mutantų tyrimai parodė, kad γ H2AX reikalingas ne šių baltymų sutelkimui į DGT vietą, o jų palaikymui DGT saituose. Kai γ H2AX išplinta į abi trūkio puses, prie jo jungiasi MDC1 baltymas. Pastarasis tiesiogiai sąveikauja su MRN kompleksu, kuriame esantis NBS1 sąveikauja su ATM ir jį aktyvuoja. Taigi į DGT reaguojantys baltymai gali jungtis prie chromatino tokia tvarka: MDC1, MRN ir ATM. ATM kinazė vykdo histono fosforilinimą ir pagamina daugiau γ H2AX vis didesniu atstumu nuo trūkio vietos. Prie modifikuoto histono vėl jungiasi nauji, jau minėti, baltymai. H2AX mutantai, kurie gali būti fosforilinami, tačiau dėl mutacijų „uodegos“ rajone negali prisijungti MDC1, nesukelia 53BP1 ir NBS1 telkinių susidarymo bei negali aktyvuoti ATM (Su, 2006). Žmogaus ląstelėse, kuriose neveikia *MDC1* genas, sutrinka γ H2AX gausėjimas. Manoma, kad MDC1, prisijungęs prie γ H2AX, jį apsaugo nuo fosfatazės ir (arba) padeda išlikti ATM aktyvios būsenos. Pelėse su neveikliu *H2AX* genu pastebima daug anomalijų: jos jautrios JS, linkusios sirgti onkogeninėmis ligomis, jų kamieninėse ląstelėse sumažėjęs HR dažnis. Matyt, viena iš H2AX funkcijų – skatinti efektyvų DGT šalinimą HR būdu.

Jau minėta, kad, atsiradus DGT, ATM įvyksta žymūs pokyčiai: dimerų/oligomerų monomerizacija, Ser1981 autofosforilinimas. Daugeliu atvejų ATM aktyvacijai būtinas MRN/MRX kompleksas, kuris, kaip rodo naujausi tyrimai, skatina ATM autofosforilinimą ir monomerizaciją. Tai vyksta, kai MRN/MRX suriša DNR galus arba galbūt padidina DGT koncentraciją tam tikroje ląstelės branduolio vietoje. Esant dideliame DGT kiekiui, ATM aktyvuojasi savaime. Be to, yra nustatyta, kad NBS1 baltymas reikalingas ATM autofosforilinimui.

Apibendrinus galima daryti išvadą, kad dvigrandžiai trūkia chromatine sukeltą „signalų“. Vienas jų – chromatino decondensacija, kuri skatina ATM aktyvaciją, chromatino ir 53BP1 sąveiką bei RAD51 reparacijos komplekso sutelkimą. Kitas signalas – MRN/MRX komplekso jungimasis prie DNR galų, esančių DGT. Jis vyksta nepriklausomai nuo ATM/ATR ir sukelia ATM aktyvaciją. Manoma, kad MRN gali kooperuotis su BRCA1, kuris taip pat sugeba jungtis prie pažeistos DNR. Trečiasis signalas – vgDNR atsiradimas. Prie jos jungiasi RPA ir po to ATR ir Rad17 kompleksai. Nors šie keliai nepriklausomi, jiems visiems reikalingas MRN/MRX, kuris padeda susidaryti vgDNR-RPA kompleksui. Tačiau iki šiol nėra tiksliai žinoma, kaip Rad51 ir jam asistuojantys baltymai sutelkiami į DGT vietą.

Chromatino permodeliavimas tikriausiai palengvina reparacijos ir kontrolės baltymų priėjimą prie DNR pažeistos vietos. Kaip minėta, pats chromatino atpalaidavimas DGT vietoje gali aktyvuoti ATM ir panašius baltymus. Todėl dar viena atsako ypatybė – daugelio baltymų kaupimasis apie DGT. Be anksčiau minėtų, aptinkama įvairių baltymų kompleksų, kurie sudaryti iš skirtingų subvienetų. Daugelio jų kataliziniai subvienetai yra ATPazės. RSC (angl. *remodels the structure of chromatin*) komplekso katalizinį subvienetą mielėse koduoja *STH1* genas. Šis subvienetas *in vivo* jungiasi prie DGT ir galbūt tiesiogiai dalyvauja reparacijoje. Nuo RSC aktyvumo priklauso nukleosomų padėties DGT vietoje pokyčiai. Mielių kamienai, neturintys veiklaus RSC komplekso, yra jautrūs jonizuojamajai spinduliuotei. Kitas baltymų kompleksas – SW1/SNF – taip pat lokalizuojasi DGT vietoje, tik daug lėčiau nei RSC. *S. cerevisiae* ląstelėse, kuriose pažeisti šių baltymų genai, sutrinka sinapsė tarp sveikos ir DGT turinčios homologiškų sekų.

Jau žinoma, kad žinduolių ir daugelio kitų eukariotų ląstelėse, skirtingai nei bakterijose, genai, koduojantys baltymus, veikiančius šalinant DGT, valdomi ne tik transkripcijos, bet ir potransliaciniame lygmenyje. Daugialąsčiuose organizmuose p53 ir jo homologai sukelia reparacijai reikalingų fermentų genų transkripciją. Svarbūs įvykiai, susiję su šiuo reiškiniu, valdomi potransliaciniame lygmenyje: vyksta baltymų fosforilinimas, jų migracija ląstelės viduje, naujų kompleksų susidarymas bei skilimas.

2.3.6. Rekombinacijos „karštieji“ taškai

Mainų dažnis mejozės metu įvairiose genomo vietose nevienodas. Jo skaitmeninė išraiška, tenkanti fizikinio atstumo vienetui, gali skirtis keliomis eilėmis net toje pačioje chromosomoje. Tame pačiame genome yra vietos, kur rekombinacijos dažnis daug didesnis už vidutinį lygį („karštieji taškai“) arba mažesnis už jį („šaltieji taškai“). „Karštieji“ HR taškai labai svarbūs genetinės įvairovės susidarymui ir taisyklingam chromosomų paskirstymui į dukterines ląsteles mejozės metu (Nishant ir Rao, 2005). Žmogaus ir kitų organizmų tyrimais įrodyta, kad mejozinio krosingoverio dažnio skirtumai priklauso nuo rūšies, individo ir lyties. HR dažnis buvo nustatomas mikroskopu pagal chiazmus tarp homologiškų chromosomų arba pagal rekombinantinių palikuonių skaičių atliekant kryžminimus ir nau-

dojant fenotipinius žymenis. Dabar, kai žinomos žmogaus ir kai kurių svarbiausių modelinių organizmų genomo sekos, kai sudaryti tūkstančių molekulinų žymenų genolapiai, galima daug tiksliau nustatyti rekombinacijos dažnį ir jo svyravimus. Gautas vaizdas labai sudėtingas ir jame sunku surasti bendrusius dėsniumus, galiojančius įvairioms rūšims.

Teoriniai modeliai teigia, kad HR lygis gali turėti įtakos genetiniam kintamumui. Pavyzdžiui, genomo vietose, kur rekombinacija labai maža arba visiškai nevyksta, galima tikėtis neatsitiktinių alelių derinių. Tokiose vietose turi būti ir daug mažesnis DNR polimorfizmo lygis.

Bene daugiausia šis reiškinys tiriamas mielių, vaisinės muselės ir žmogaus genomuose. *S. cerevisiae* „karštieji taškai“ koreliuoja su DGT vietomis, kurios paprastai yra promotorių sekose, tačiau DGT atsiradimui transkripcija nebūtina. Naudojant nukleazes, nustatyta, kad „karštiesiems taškams“ būdinga mažai kondensuota chromatino struktūra. Gerai ištirtas *S. pombe* „karštasis taškas“ yra *ade6* lokuse, turinčiame mutaciją *M26*. Šioje vietoje pastebėtas rekombinacijos dažnio priklausomumas nuo DNR sekos 5'-ATGACGT-3' (Schuchert ir kt., 1991). Ši seka yra heterodimerinio baltymo Mts1/Mts2 jungimosi vieta. Dėl mutacijos poveikio atsiranda chromatino erdvinės struktūros pokyčių, kurie nulemia didesnę jautrumą nukleazei. Anksčiau HR dažnis žmogaus genome buvo nustatomas palyginant tėvų ir palikuonių fenotipus genealoginiuose medžiuose. Dabar yra sukurtas metodas, kurį naudojant galima įvertinti rekombinacijos dažnį žmogaus spermatozoiduose. Nustatant HR dažnį genetiniai atstumai lyginami su fiziniu atstumu tarp žymenų. Tą įmanoma padaryti, kai žinomos genomų sekos.

Išsamūs genetiniai ir fiziniai vaisinės muselės genolapiai buvo žinomi dar prieš genomikos erą. Tikslūs fiziniai genolapiai buvo sudaryti panaudojus žymenų *in situ* hibridizaciją ant politeninių chromosomų, kurių vienos juostos dydis yra apie 21 kbp. Remiantis gautais duomenimis, apskaičiuota, kad HR dažnis visame genome yra $\approx 1,5$ cM/Mbp. Moteriškosios lyties individuose jis vidutiniškai lygus 3,0 cM/Mbp, o vyriškosios lyties individų genomuose normaliomis sąlygomis HR visiškai nevyksta. Dažnio svyravimo ribos nuo 0 cM/Mbp iki 5 cM/Mbp. HR beveik nevyksta vaisinės muselės patelėse 4-oje homologinių chromosomų poroje ir yra labai sumažėjusi prie metacentrinių (2-os ir 3-os) chromosomų centromerų. Akrocentrinėje X chromosomoje HR dažnio sumažėjimas prie centromeros nežymus. Rekombinacijos sumažėjimas labiau pasireiškia prie telomerų.

1996–1998 m. buvo sudarytas pirmas išsamus žmogaus genolapis. Jis sudarytas naudojant mikrosatelitinius žymenis vadinamose CEPH (pranc. *Centre d'Etude du Polymorphisme Humain*) šeimose. Panaudoti 5264 mikrosatelitai (Dib ir kt., 1996). 2001m., palyginus genetinius ir fizinius (nukleotidų sekų) žmogaus genolapius, apskaičiuotas vidutinis rekombinacijos dažnis – 1,3 cM/Mbp (Yu ir kt., 2001). Ši skaitinė reikšmė labai artima nustatytai vaisinėje muselėje. Vidutinis HR dažnis skirtingų lyčių individuose nevienodas. Vyriškosios lyties jis siekė apie 0,9 cM/Mbp, o moteriškosios – 1,7 cM/Mbp. Aptikti rajonai, kuriuos galima vadinti „šaltaisiais“ HR rajonais, kuriuose HR dažnis keleto megabazių intervale buvo $<0,3$ cM/Mbp, taip pat genomo vietos, kuriose jis

buvo neįprastai didelis ($> 3,0$ cM/Mbp). Panašus, tik didesnės apimties darbas atliktas dar kartą. Kong ir kt. (2002) sudarė genolapį ištyrę 146 Islandijos šeimas ir panaudoję 5136 mikrosatelitus, – tai atitiko 1257 mejozes. Pastarojo genolapio skiriamoji geba buvo penkis kartus didesnė nei ankstesnio. Nustatytas vidutinis HR dažnis buvo šiek tiek mažesnis $\approx 1,1$ cM/Mbp. Kraštutinės reikšmės svyravo nuo 0 cM/Mbp iki 5 cm/Mbp. Mažas rekombinacijos dažnis nustatytas prie metacentrinių chromosomų centromerų. Taip pat pastebėtas atvirkštinis priklausomumas tarp chromosomos ilgio ir vidutinio HR dažnio joje. Todėl galima manyti, kad būtinas tam tikras krosingoverių skaičius taisyklingam homologinių chromosomų poravimuisi ir pasiskirstymui. Ryškūs rekombinacijos dažnio skirtumai pastebėti net tos pačios chromosomos skirtinguose petyse.

Iki šiol neištirtos priežastys, lemiančios HR dažnio skirtumus. Aišku, kad tam įtakos gali turėti nukleotidų seka, tačiau tuo paaiškinti visko neįmanoma. Pavyzdžiui, moterų autosomose rekombinacijos dažnis yra apie 1,65 karto didesnis nei vyrų. Islandiškame genolapyje krosingoverio dažnis vyrų chromosomose didesnis prie telomerų, o moterų – prie centromerų, tačiau autosomose iki šiol neaptikta DNR sekų skirtumų, kurie priklauso nuo lyties. Todėl, remiantis prielaida, kad rekombinacija turi įtakos evoliucijai, moterų „indėlis“ šiam procesui turėtų būti didesnis.

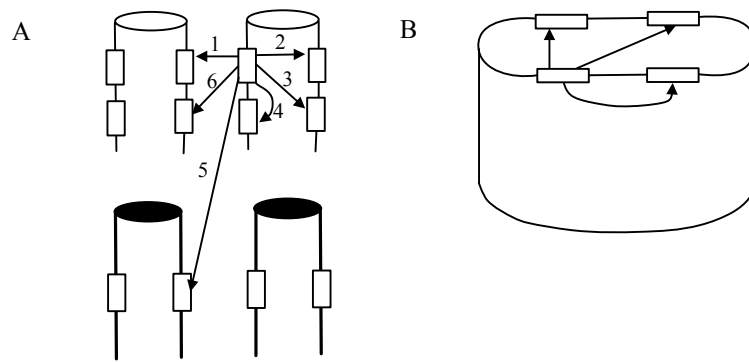
2.3.7. Ektopinė rekombinacija

2.3.7.1. Ektopinės rekombinacijos mechanizmai

Daugelis rekombinacijos tyrimų buvo atliekama su genais, kurie haploidiniame genome sutinkami viena kartą, tačiau nereikėtų pamiršti, kad organizmuose, ypač eukariotuose, yra daug pasikartojančių genų ir daugybė pasikartojančių sekų. Kartais pakanka net nedidelių homologiškų sekų gabaliukų, kad rekombinacija vyktų neįprastoje vietoje (gr. *ektopos* – nutolęs). Dėl to ilgesnės pasikartojančios struktūros turėtų labai išplėsti homologinės rekombinacijos galimybes, o tai galėtų paveikti genomo stabilumą.

Intensyviausiai tyrinėjama mielių *S.cerevisiae*, *S. pombe* ektopinė rekombinacija. Šiems darbams sukuriamos įvairios genetinės konstrukcijos, kuriomis galima dirbtinai padidinti konkretaus geno kopijų skaičių genome. Ektopinė rekombinacija gali vykti tiek vienos chromosomos ribose (tarpchromatidinė, viduchromatidinė), tiek tarp skirtingų chromosomų (49 pav.). Jos pobūdis priklausys nuo pasikartojančių sekų išsidėstymo (pratėgiui, išbarstyta) bei krypties (vienakryptės, invertuotos). Kadangi mielėse yra daug disperguotų genų šeimų, didelis heterochromosominės ektopinės rekombinacijos dažnis turėtų sukelti dažnas chromosomų aberacijas. Pavyzdžiui, diploidiniai mielių kamienai turi apie 70 kopijų 6 kb dydžio retrotranspozono *Ty*. Tačiau tiesioginiai rekombinacijos dažnio tarp šių elementų tyrimai parodė, kad jis yra kur kas mažesnis nei reikėtų tikėtis remiantis gautais tyrimų su dirbtinėmis sistemomis duomenimis. Jeigu natūraliai esančios pasikartojančios sekos rekombinuotų tuo pačiu dažniu kaip ir dirbtinai įterptos, tai sunku įsivaizduoti,

kaip organizmui pavyktų išvengti letalių genomo persitvarkymų. Šiam prieštaravimui paaiškinti sukurtos bent dvi hipotezės.



49 pav. Rekombinacijos tarp pasikartojančių genų atvejai (Petes ir Hill, 1988). A – rekombinacija tarp eukariotų chromosomų. Chromatidės pavaizduotos po DNR replikacijos. B – ektopinė rekombinacija prokariotų chromosomoje, kurioje įvykusi dalinė replikacija. Pasikartojantys genai pavaizduoti stačiakampiais. Rekombinacijos metu (A) gali įvykti geno konversija (1, 2), delecijos (3, 4, 6), duplikacijos (3, 6), translokacijos (5); susidaryti dicentrinės chromosomos (3, 5, 6) ir acentriniai fragmentai (3, 5, 6)

Viena jų teigia, kad ląstelėse yra mechanizmas, kuris specifiskai slopina ektopinę natūralių pasikartojančių sekų rekombinaciją. Manoma, kad šią funkciją atlieka RecQ šeimos helikazės ir topoizomerazės. Pavyzdžiui, mutacija mielių *TOP3* gene didina rekombinacijos dažnį tarp δ pasikartojančių sekų, sulėtina mutantinių kamienų augimo tempus. *SGS1* geno mutantuose padidėja rekombinacija tarp homeologinių (panašių) sekų. Svarbus gali būti ir chromosomų poravimasis, nes jis priverčia rekombinuoti tik alelines sekas. Ne vieno eksperimento rezultatai parodė, kad rekombinacija tarp vienodų sekų, esančių homologinėse chromosomose, yra 10–100 kartų dažnesnė nei tarp tų pačių sekų, esančių heterologinėse chromosomose. Rekombinacija tarp *arg4* sekų nehomologinėse chromosomose buvo 10–20 kartų retesnė, nei joms esant homologinėse chromosomose alelinėse padėtyse. Pastebėta, kad padėties poveikis pradeda mažėti, kai genas yra nutolęs > 20 kbp nuo alelinės padėties homologinėje chromosomoje. Todėl chromosomų išsidėstymas greta viena kitos poravimosi metu, sinapsė bei alelinė homologinė rekombinacija mažina ektopinės rekombinacijos galimybę (Goldman ir Lichten, 2000).

Gali būti, kad natūraliai esančių pasikartojančių genų sekos specifiskai slopina tarpusavio sąveikas. Šiuo požiūriu lemiamos reikšmės gali turėti pasikartojančių sekų homologijos laipsnis bei jų kopijų dydis. Eksperimentais nustatyta, kad mielėse mejozės metu vykstantiems reciprokiniams mainams reikalingi 150–250 bp homologiški fragmentai. Jeigu jie trumpesni, arba homologija tarp jų nėra 100 proc., rekombinacijos dažnis labai sumažėja. Panaši homologija reikalinga ir mitoziniams mainams.

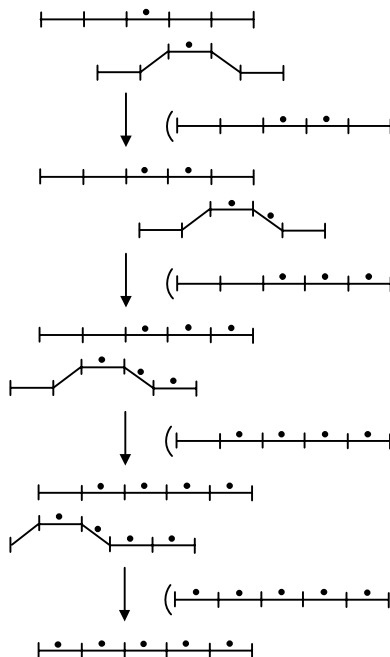
Žmogaus genome taip pat vyksta pasikartojančių sekų, genų segmentų, genų ir genų sankaupų ektopinė rekombinacija. Kai kuriais atvejais tai sukelia žalingus genetinės medžiagos persitvarkymus ir gali būti ligų priežastis. Nustatyta nemažai tokių atvejų. Pavyzdžiui, α talasemija susergama dėl α

globino geno delecijos, atsirandančios dėl netolygaus pasikartojančių šio lokuso segmentų krosingoverio. Maždaug pusės hemofilija A sergančių pacientų gene koduojančiame VIII faktorių, yra įvykusi inversija. Tai nulemia rekombinacija tarp dviejų pasikartojančių ir priešingai viena kitai orientuotų sekų, kurių viena yra gene, o kita – 5' padėtyje nuo jo. Ektopinė rekombinacija yra kai kurių daltonizmo, augimo hormono geno (*GHI*) praradimo, periferinės neuropatijos, vadinamos Charcot-Marie-Tooth liga, ir kitų ligų priežastis. Ektopinei rekombinacijai galima priskirti ir kai kuriuos specifinius homologinės rekombinacijos atvejus: pavyzdžiui, antigenų įvairovės susidarymą *Trypanosoma* ir *Neisseria*.

2.3.7.3. Pasikartojančių sekų evoliucija

Ji susijusi su reiškiniu, pavadintu bendra arba suderinta genų šeimos evoliucija. Genų šeima yra genų, kilusių iš bendro protėvio ir todėl panašių savo DNR seka bei funkcijomis, grupė. Genų šeimos evoliucija bei jos mechanizmai nuo seno yra diskusijų objektas (Nei ir Rooney, 2005). Apie 1970 m. buvo išaiškinta, kad *Xenopus* rRNR koduoja didelis skaičius pratėgiui išsidėsčiusių pasikartojančių genų. *X. laevis* ir *X. mulleri* rRNR genų šeimas sudaro 450 pasikartojančių sekų. Kiekviena jų sudaryta iš 18S, 5,8S ir 28S genų, išorinių transkribuojamų tarpiklių (*ETS1* ir *ETS2*), vidinių transkribuojamų tarpiklių (*ITS1* ir *ITS2*) ir tarpgentinio tarpiklio *IGS*. Panaudodami DNR ir RNR hibridizaciją, Braunas ir kt. nustatė, kad *IGS* nukleotidų sekos labai panašios toje pačioje rūšyje, tačiau labai (apie 10 proc.) skiriasi *X. laevis* ir *X. mulleri* rūšyse (Brown ir kt., 1972). Šį reiškinį buvo sunku paaiškinti tuo metu populiariu „divergencinės evoliucijos“ modeliu, kuriuo remiantis šios sekos abiejose rūšyse turėtų būti panašios. Be to, abiejų rūšių 18S ir 28S genų sekos buvo beveik vienodos. Iš tikrųjų jos labai panašios net labai nutolusiuose evoliuciniu požiūriu organizmuose (pavyzdžiui, augaluose ir gyvūnuose). Tam paaiškinti Braunas pasiūlė naują modelį, kuris pavadintas „suderinta genų šeimos evoliucija“ (angl. *concerted evolution*). Pagal jį visi genų šeimos nariai tam tikros rūšies genome evoliucionuoja kartu. Mutacija, atsiradusi vienoje ar kitoje sekoje, po to išplinta po visus šeimos narius, o naujai atsiradęs alelis paplinta po visą genų šeimą. Jo plitimą, Brauno nuomone, lemia netolygus krosingoveris. Jis vyksta atsitiktinai tarp įvairių genų šeimos narių. Todėl suvienodina (homogenizuoja) juos. Genų skaičius gali padidėti ir sumažėti atsitiktinai, bet jų atliekamų funkcijų svarba išlaiko jį daugmaž pastovų. Tokios evoliucijos mechanizmas aiškinamas ir geno konversija (Jeffreys 1979) (50 pav.). Jos vaidmuo panašus į netolygaus krosingoverio, išskyrus tai, kad netolygus krosingoveris gali padidinti ar sumažinti geno kopijų skaičių, o geno konversija – negali. Pagal šį modelį galima paaiškinti rRNR genų evoliuciją, jis imtas taikyti ir kitoms genų šeimoms. Vis dėlto vėliau jo universalumu suabejota ir pasiūlytas kitas, vadinamas „gimimo ir mirties evoliucijos“ modelis (angl. *birth and death evolution*) (Nei & Hughes, 1992). Pagal šį modelį, vieni nauji genai, atsiradę dėl duplikacijų, išlieka genome ilgą laiką, o kiti prarandami arba dėl mutacijų tampa neveiklūs. Daug geriau šis modelis tinka daugeliui multigeninių šeimų: imunoglobulinų, atsparumo ligoms genų, MHC genų, MADS ir homeosekas turinčių genų.

„Suderintos“ evoliucijos modelis visiškai neatsižvelgia į stabilizuojančios atrankos poveikį. Jau įrodyta, kad ši atranka šalina nesinonimines pakaitas DNR molekulėse. Todėl evoliucijos metu veikia netolygus krosingoveris, stabilizuojanti atranka ir mutacijos. Nepaisant to, kad „gimimo ir mirties“ evoliucijos modelis yra naujesnis ir universalesnis, tenka pripažinti, kad tais atvejais, kai analizuojamų genų sekos labai mažai skiriasi, genų šeimos evoliuciją galima paaiškinti tiek vienu, tiek kitu modeliu.



50 pav. Suderinta genų šeimos evoliucija geno konversijos būdu. Pasikartojantys geno (●) konversijos ciklai paverčia pasikartojančius genus vis labiau homogeniškais kiekvienoje chromosomoje

2.4. Homologinės rekombinacijos panaudojimas

Ilgus tūkstantmečius žmogus, to nežinodamas, naudojo homologinę rekombinaciją, išveddamas gyvūnų ir augalų veisles. Naudingomis savybėmis pasižyminčių individų atranka dažniausiai būdavo tam tikrų rekombinantų atranka. 20 a. pabaigoje, sukūrus molekulinę žymenų technologijas, atsirado galimybė atlikti selekciją ne tik fenotipo, bet ir genotipo lygmenyje. Molekulinė selekcija, panaudodama klasikinius rekombinogenezės dėsningumus bei genų inžinerijos metodus, turi plačias perspektyvas išvedant naujas veisles.

Pradedant Morgano ir jo mokinių darbais, genetinė rekombinacija buvo panaudojama dviem praktiniams tikslams:

- 1) genetinių lokusų kartografavimui chromosomose;
- 2) genetinių kamienų konstravimui.

Ir šiandien tai yra pagrindinės homologinės rekombinacijos praktinio pritaikymo sritys, tačiau plėtojama ir trečioji – genų terapija.

2.4.1. Genų kartografavimas eukariotuose

1911 m. Morganas iškėlė hipotezę, kad sankiba ir rekombinacija rodo genų išsidėstymo chromosomose tvarką. 1913 m. jo mokinys Sturtevantas (A.H. Sturtevant) sukūrė pirmąjį (*D. melanogaster*) genolapį.

Ypač svarbi – žmogaus genų sankibos analizė. Pirma, ji naudojama pagal geneologinius duomenis nustatyti genams, atsakingiems už paveldimą ligą. Informacija apie sankibą yra būtina tuomet, kai nėra žymenų, rodančių ligą sukeliančius alelius. Tai svarbu tiksliai diagnozei bei genetinei individų ir šeimų konsultacijai. Antra, ji gali būti panaudojama klonuojant genus. Pavyzdžiui, sankibos analizė buvo panaudota nustatant CFTR (angl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) baltymą koduojančio geno padėtį kitų žymenų atžvilgiu ir jį klonuojant.

2.4.1.1. Eukariotų genolapių sudarymo principai

Tam tikros rūšies genolapio sudarymas yra santykinio genetinio atstumo tarp jai būdingų genų (žymenų) apskaičiavimas, jų tarpusavio išsidėstymo tvarkos nustatymas bei paskirstymas į atskiras sankibos grupes. Sankibos grupę sudaro visi vienoje chromosomoje esantys genai (žymenys). Genų išsidėstymo tvarka bei jų lokalizacija tam tikrose chromosomose dažniausiai nustatoma pagal rekombinacijos (krosingoverio) tarp šių genų dažnį. Norint sukurti tikslesnį genolapį, reikia rekombinacijos dažnį apskaičiuoti kiek galima didesniai žymenų porų skaičiui. Vertėtų prisiminti, kad genolapiai gali būti sudaromi naudojant ir kitus metodus: delecijas, restrikcinę analizę, molekulinis ir fluorescuojančius zondus, heteroploidiją ir kt. Šie metodai dažnai naudojami kartu su mūsų aptariamu rekombinacijos dažnio apskaičiavimo principu, nes jis iki šiol tebėra svarbiausias sudarant genolapius.

Norint geriau suprasti genolapių kūrimo metodiką, reikėtų prisiminti rekombinacijos ir genų pasiskirstymo mejozėje dėsningumus, kuriuos nustatė Mendelis ir Morgano mokyklos atstovai. Mejozės metu du to paties lokuso aleliai, esantys skirtingose chromosomose, patenka į gametas vienodu dažniu. Jeigu šiuos alelius pavadinsime a ir A , tai diploidinis heterozigotinis pagal šį lokusą individas (jo genotipas aA) sudarys gametas, iš kurių pusė turės alelį A , o kita pusė – a . Kito lokuso aleliai B ir b į gametas pateks taip pat santykiu 1:1 (50 proc. gametų turės alelį B , o kitos 50 proc. – alelį b). Jeigu šie du lokusai (a/A ir b/B) nesukibę (yra skirtingose chromosomose), tai jų aleliai į gametas pateks nepriklausomai vieni nuo kitų ir diheterozigotoje ($AaBb$) susidarys keturių tipų gametos: $AaBb \rightarrow AB, Ab, aB, ab$. Dabar užrašykime pagal šiuos du lokusus homzigotinių, tačiau genetiškai skirtingų individų (P1 ir P2) kryžminimą, kurio metu turėtų susidaryti diheterozigotiniai F1 palikuonys:

$$P1 AABB \times P2 aabb$$

$$F1 AaBb.$$

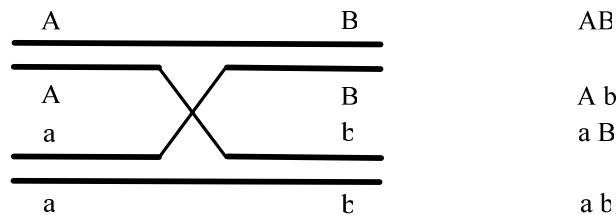
Užrašykime F1 hibrido analizuojamąjį kryžminimą, kuris dažnai atliekamas norint nustatyti, ar genai yra sukibę:

F1 AaBb × P2 aabb.

F1 individe susidarys keturių rūšių gametos (AB, Ab, aB, ab). Eksperimente apie šių gametų genotipą galime spręsti iš analizuojamojo kryžminimo palikuonių fenotipo:

Fa
 AaBb – tėvinis fenotipas;
 Aabb – rekombinantinis fenotipas;
 aaBb – rekombinantinis fenotipas;
 aabb – tėvinis fenotipas.

Visos keturios palikuonių grupės bus vienodo dydžio (skilimo santykis – 1:1:1:1). Du fenotipai Ab bei aB skiriasi nuo tėvų ir yra rekombinantiniai. Jie, esant nepriklausomam požymių paveldėjimui, sudaro 50 proc. analizuojamojo kryžminimo palikuonių. Jeigu genai *A* ir *B* yra sukibę (jeigu yra toje pačioje chromosomoje), rekombinantai susidarys tik įvykus krosingoveriui tarp šių genų, o jų dažnis bus mažesnis nei 50 proc. Tai galima paaiškinti tuo, kad krosingoveris įvyksta keturių chromatidžių stadijoje (kiekviena homologinė chromosoma dukart didesnė ir sudaryta iš dviejų chromatidžių) ir jame dalyvauja dvi nesesterinės chromatidės. Todėl didžiausias krosingoverio dažnis, kuris gali būti tarp dviejų sukibusių genų, yra 50 proc. Bet toks jis gali būti tik tuo atveju, jeigu lokusai bus toli vienas nuo kito, pavyzdžiui, skirtinguose chromosomos galuose. Tuo atveju tarp jų visada įvyks bent vienas krosingoveris (51 pav.).



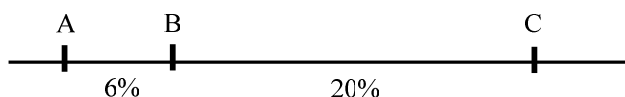
51 pav. Bivalento keturių chromatidžių stadijoje diagrama (mejozės diplotenos stadija). Krosingoveris tarp dviejų iš keturių chromatidžių gali duoti maksimalų 50 proc. rekombinacijos dažnį tarp genų, esančių skirtinguose chromosomų galuose (Ab ir aB – rekombinantai). Kai genai yra arčiau vienas kito, perkryža tarp jų susidarys ne visada ir rekombinacijos dažnis bus mažesnis nei 50 proc. (pagal Jones ir kt., 1997)

Krosingoverio metu susidaro nauji tėvų genų ar žymenų deriniai. Jie gali susidaryti dvejopai (kaip minėta anksčiau): nepriklausomai pasiskirstant dviejų nesukibusių lokusų aleliams arba įvykus krosingoveriui tarp sukibusių lokusų. Rekombinantinių palikuonių procentinė dalis bendrajame palikuonių skaičiuje yra rekombinacijos arba krosingoverio dažnis. Šis dydis mums parodo santykinį atstumą tarp dviejų lokusų chromosomoje. Rekombinacijos dažnis (K) tarp dviejų lokusų gali būti nustatomas iš analizuojančiojo arba grįžtamojo kryžminimo palikuonių skaičiaus fenotipinėse grupėse:

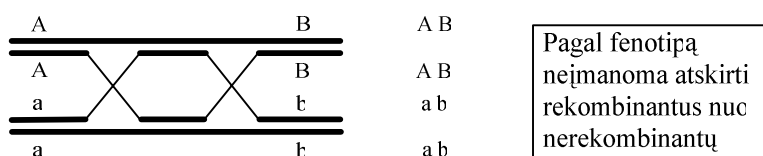
$$K = n_1/n \times 100 \text{ proc.}, n - \text{visas palikuonių skaičius}; n_1 - \text{palikuonių krossoverų skaičius}.$$

Jeigu iš 200 palikuonių 12 yra rekombinantiniai, tai rekombinacijos dažnis tarp 1 ir 2 lokusų yra 6 proc. ($12 : 200 \times 100 \text{ proc.} = 6 \text{ proc.}$). Tarkime, kad rekombinacijos dažnis tarp A ir B lokusų lygus 6

proc.; tarp B ir C – 20 proc.; o tarp A ir C – 24 proc. Turėdami šiuos duomenis, galime išdėstyti lokusus vienas kito atžvilgiu chromosomoje tokia tvarka: A, B, C.



Rekombinacijos dažnis 1 proc. pavadintas centimorgana (cM) Morgano garbei. Reikėtų atkreipti dėmesį į tai, kad mūsų sudarytame genolapyje genetiniai atstumai nesutampa (nėra adityvūs): $6 + 20 = 26$ yra tikslesnis atstumas tarp lokusų A ir C (aukščiau pateiktame pavyzdyje jis lygus 24 cM). Netikslius rekombinacijos dažnis tarp minėtų lokusų gaunamas dėl dvigubo krosingoverio, kurio metu susidarę palikuonys kaip rekombinantai neįvertinami (todėl realus rekombinacijos dažnis gaunamas mažesnis nei yra iš tikrųjų) (52 pav.).



52 pav. Bivalento diagrama keturių chromatidžių stadijoje (diplotenoje) rodo, kaip dvigubi krosingoveriai toje pačioje chromatidžių poroje duoda rekombinantinius palikuonis, fenotipiškai neskiriančius nuo tėvinių (nerekombinantinių) fenotipą turinčių individų. Dėl šios priežasties apskaičiuotas genetinis atstumas yra mažesnis (pagal Jones ir kt., 1997).

Todėl genolapiai sudaromi sudėjus atstumus tarp žymenų, nutolusių nedideliais intervalais. Taip pat tenka pripažinti, kad genetiniai atstumai ne visada koreliuoja su fiziniiais, nes kai kuriose geno vietose krosingoveris vyksta dažniau nei kitose.

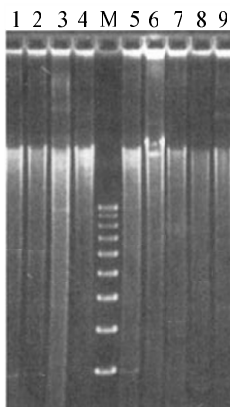
2.4.1.2. Molekulinių žymenų panaudojimas genolapiuose

Dabar genolapiai sudaromi dažniausiai naudojant molekulinis žymenis, kurie turi nemažai privalumų, palyginti su tradiciniais morfologiniais. Pastaruosius pirmasis panaudojo Mendelis. Genolapiams juos pritaikė Sturtevantas, kuris ir buvo pirmojo genolapio autorius. 1913 m. jis sudarė vaisinės muselės (*Drosophila melanogaster*) X chromosomos genolapį ir šį darbą paskelbė „Eksperimentinės zoologijos“ žurnale (*Journal of Experimental Zoology*) (Sturtevant, 1913). Morfologiniai žymenis yra labai negausūs, palyginti su molekuliniiais. Todėl, naudojantis tik jais, sukurti tikslius genolapius neįmanoma. Molekuliniai žymenis gali būti skirstomi į dvi grupes: biocheminius ir DNR žymenis. Biocheminiai žymenis pradėti naudoti 20 a. antrojoje pusėje. Plačiausiai naudojami biocheminiai žymenis yra izofermentai. Jie naudojami ir sudarant genolapius. Tačiau izofermentų, kaip ir morfologinių žymenų, įvairovė nedidelė. Žinoma tik kelios dešimtys skirtingų izofermentinių sistemų. DNR žymenis sukurti ir pradėti naudoti daug vėliau – 20 a. aštuntajame dešimtmetyje. DNR žymenimis laikomi polimorfinių lokusų aleliai, besiskiriantys nukleotidų seka ir dažniausiai neutralūs fenotipo atžvilgiu, t.y. šie žymenis nepasireiškia fenotipe ir yra tik tam tikros DNR skirtingi variantai, kuriuos galima aptikti naudojant įvairius molekulinės biologijos metodus: DNR skaldymą restrikcijos endo-

nukleazėmis, molekulinę hibridizaciją, polimerazinę grandininę reakciją ir kt. DNR žymenys turi keletą savybių, dėl kurių jie nepakeičiami sudarant genolapius:

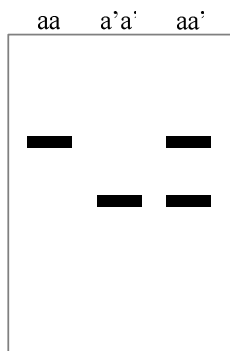
- jie žymiai mažiau veikiami aplinkos sąlygų nei morfologiniai ar biocheminiai žymenys;
- informatyvūs bet kurioje organizmo raidos stadijoje;
- jų nustatymas gali būti automatizuotas;
- nepaprastai didelė įvairovė leidžia kartografuoti chromosomų sritis, turinčias mažai genų;
- dažniausiai fenotipiškai neutralūs;
- vienodi bet kurioje organizmo dalyje;
- nesąveikauja tarpusavyje.

Panagrinėkime vienos iš molekulinių DNR žymenų grupės, vadinamos RFLP (angl. *restriction fragment length polymorphism*), nustatymą ir panaudojimą sudarant genolapius. Kaip sako pats pavadinimas, čia naudojamos restrikcijos endonukleazės – tai fermentai, kurie atpažįsta DNR specifines sekas ir skaldo jas (II klasės restrikcijos endonukleazės). Įvykus mutacijai tam tikro fermento atpažinimo sekoje, DNR toje vietoje neskaldoma. Kadangi mutacijos retas, tačiau neišvengiamas reiškinys, tai netgi giminiškų individų genomo DNR sekų, kurias atpažįsta tam tikros restriktažės, išsidėstymas gali skirtis – tai yra DNR polimorfizmas. Todėl, suskaldžius ta pačia restrikcijos endonukleaze dviejų skirtingų individų DNR, susidarys daugybė DNR fragmentų ir kai kurie iš jų skirsis savo dydžiu. Pavyzdžiui, daugelio augalų genomas sudarytas iš 10^8 – 10^9 nukleotidų. Įvykus net nedaugelio iš jų mutacijoms, naudojant įvairias restriktažes, galima gauti nemažai potencialių molekulinų žymenų. Suskaldžius genomine DNR restriktažėmis, susidaro toks didelis DNR fragmentų skaičius, kad net išfrakcionavus juos elektriniame lauke agarozės ar poliakrilamido gelyje, matomas beveik vientisas šleifas (53 pav.). Didesni DNR fragmentai gelyje sutelkti arčiau neigiamo elektrodo, o mažesni – arčiau teigiamo. Jeigu klonuoti vieną tokį fragmentą ir jį pažymėti radioaktyvia ar fluorescuojančia žyme, tai galime gauti molekulinį zondą, su kuriuo galima nustatyti tam tikrą DNR lokusą. Toks hibridizuojamas zondas jungsis prie jam homologiškos DNR sekos fragmento.



53 pav. Restrikcijos endonukleaze suskaldytų genomines DNR pavyzdžių (1–9) vaizdas po elektroforezės agarozės gelyje. M – DNR fragmentų dydžio standartas; www.mun.ca/.../scarr/Southern_Blot_analysis.html

54 paveiksle matome vaizdą, kurį galima išgauti, atlikus trijų giminiškų individų genomo DNR, suskaldytos tam tikra restriktaze, hibridizaciją pagal Sautherną su turimu hipotetiniu zonu. Pirmojo individo (aa) genomines DNR autoradiogramoje matoma viena lėta juosta. Taip yra todėl, kad tiriamas individas yra homozigotinis šio lokuso atžvilgiu, o zonu nustatomi du vienodo dydžio DNR fragmentai, esantys homologinėse chromosomose. Homozigotinis individas turi du vienodus to lokuso alelius. Šiuo atveju abejose diploidinio organizmo chromosomose restriktazės atpažinimo sekos yra identiškose vietose. Todėl po restrikcijos, elektroforezės, Sautherno blotingo ir autoradiografijos ši būseną matoma kaip viena juosta fotoplokštelėje. Kitas individas ($a'a'$) gali duoti kitokio dydžio juostą, nes jo DNR sekoje, kurią atpažįsta restriktazės, įvykusi mutacija taip pat gali būti homozigotinės būsenos. Mutacija gali arba panaikinti restriktazės atpažinimo seką, arba sukurti naują kitoje vietoje. Dėl to pakis zonu nustatomo DNR fragmento dydis (gali pakisti ir nustatomų fragmentų skaičius) ir judėjimo elektriniame lauke agarozės gelyje greitis. Trečiasis individas yra pirmųjų dviejų hibridas (aa') ir turi dvi skirtingo dydžio juostas, atitinkančias pirmojo ir antrojo individų juostas. Taigi čia jau turime tam tikro RFLP lokuso heterozigotą. Kadangi šiame lokuse yra du skirtingi aleliai, jis yra polimorfiškas. Lokuse matomas restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmas. Du skirtingo dydžio DNR fragmentai, matomi trečiame takelyje, yra to paties RFLP lokuso aleliai. Kadangi lokusą identifikuoja žymėtas molekulinis zondas, todėl lokusui suteikiamas zondo pavadinimas.



54 pav. Hibridizacija pagal Southern'ą su radioaktyviu molekulinio zonu leidžia nustatyti RFLP lokuso alelius individuose. Pirmajame takelyje: homozigota aa pagal didesniąjį RFLP alelį; antrajame: homozigota $a'a'$ pagal mažesniąjį RFLP alelį; trečiajame: heterozigota aa' . Kodominuojantis RFLP žymenų pobūdis leidžia nustatyti visus tris galimus vieno lokuso genotipus

Svarbus RFLP žymenų požymis – jų kodominuojantis paveldėjimo pobūdis, kurį atspindi galimybė nustatyti tikslų konkretaus individo genotipą aa , $a'a'$ ar aa' duotajame lokuse. Dėl šios priežasties RFLP žymenys daug informatyvesni už morfologinius žymenis, kuriems dažniausiai būdingas visiškas dominavimas, t. y. galimybė atskirti tik du fenotipus, kuriuos nulemia (AA ar Aa) ir aa genotipai.

Restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmas atsiranda dėl mutacijų. Kadangi grįžtamųjų mutacijų tikimybė tame pačiame lokuse labai maža, todėl RFLP žymenys labai pastovūs ir patikimi. Be to, jų įvairovė keliomis eilėmis didesnė nei standartinių morfologinių ar biocheminių žymenų.

RFLP aleliai, kurie aptinkami naudojant žymėtus molekulinis zondus, dažniausiai paveldimi pagal tuos pačius Mendelio dėsnis kaip ir morfologiniai žymenys (pavyzdžiui, žiedų spalva, stiebo for-

ma ir kt.). Šiuo atveju taip pat galima atlikti kryžminimą tarp tėvinių individų, kurie turi skirtingus to paties lokuso alelius. F1 hibridai bus heterozigotiniai ir turės abu RFLP alelius (54 pav.). Tarpusavyje kryžminant F1 hibridus, gaunama F2 palikuonių populiacija. Analizuojant šiuos palikuonis pagal įvairių lokusų alelių pasiskirstymą, galima nustatyti, ar du konkretūs RFLP lokusai paveldimi nepriklausomai vienas nuo kito, ar jie yra sukibę. Esant lokusų sankibai, kaip ir morfologinių žymenų atveju apskaičiuojami rekombinantų susidarymo dažniai. Nustatytas rekombinacijos dažnis rodo atstumą tarp dviejų tarpusavyje sukibusių RFLP lokusų.

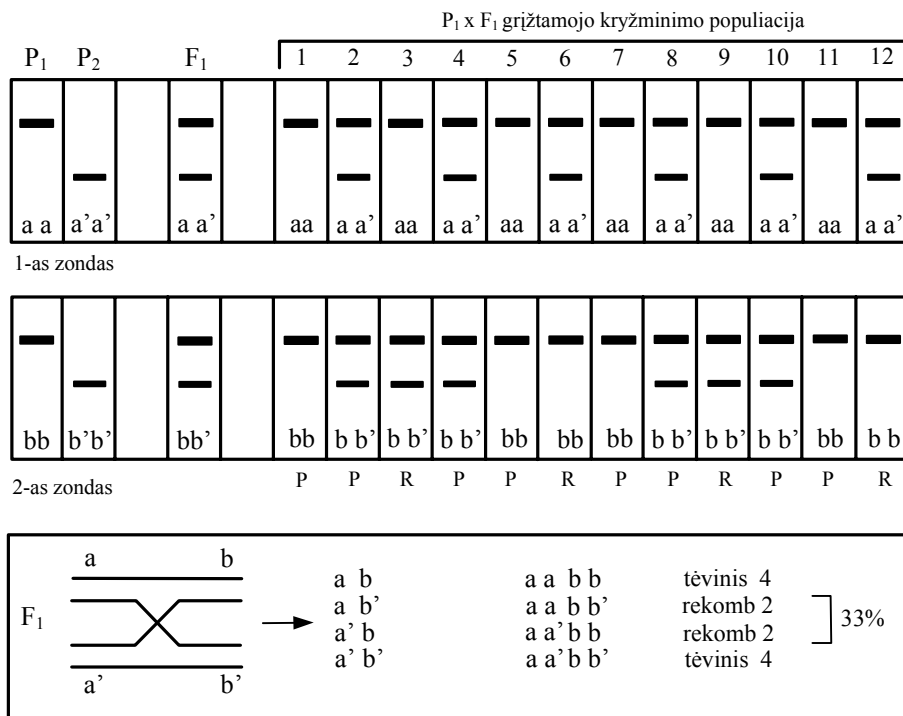
Paprasčiausias būdas RFLP žymenų genolapiui sudaryti – sukryžminti homozigotines linijas, kurios skiriasi viena nuo kitos RFLP lokusų, nustatomų naudojant tam tikrus zondus, aleliais. Po to augalų F1 hibridai gali būti įvairiai panaudojami vadinamosioms genolapio populiacijoms (angl. *mapping population*) gauti.

- 3) Kai kuriais atvejais iš F1 hibridų galima gauti dvigubus haploidus. Augalai šiuo atveju regeneruojami iš žiedadulkių, kurios yra haploidinės. Po to atkuriamas diploidiškumas. Todėl gautuose dvigubuose haploiduose kiekvienas lokusas yra homozigotinis.
- 4) Gali būti atliekamas F1 hibridų grįžtamasis kryžminimas su vienu iš tėvų.
- 5) F1 hibridai dauginami savidulkos būdu ir taip gaunama F2 populiacija.
- 6) Rekombinantinės inbred-linijos gaunamos iš F1 hibridų. Šiuo atveju sukuriama ilgaamžė genolapio populiacija.

Genolapio populiaciją paprastai sudaro tėviniai individai, F1 hibridai ir vienu iš aprašytų būdų gauti F1 palikuonys. Tėvai ir F1, F2 kartų individai analizuojami naudojant daug skirtingų molekulinį zondų. Naudojant molekulinis zondus nustatomi visų genolapio populiacijos individų genotipai ir apskaičiuojamas rekombinacijos dažnis tarp RFLP žymenų lokusų. Taigi pirmiausia išskiriama tiriamo genomo DNR, o tada, naudojant zondus, analizuojami RFLP žymenų paveldėjimo dėsningumai šioje grupėje. Žymenų skaičius priklauso nuo tėvų giminingumo laipsnio (kuo mažiau giminiški, tuo didesnė skirtumų tikimybė), zondų skaičiaus ir kokybės.

Paprastai vienai rūšiai naudojami keli zondų ir restrikcijos endonukleazių deriniai ir gaunama daug RFLP molekulinį žymenų.

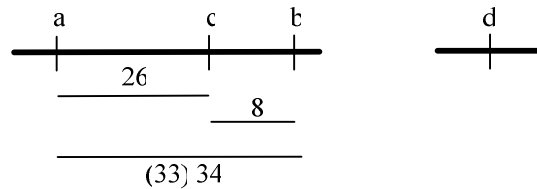
Turint zondus ir genolapio populiaciją, galima pradėti jos individų RFLP žymenų analizę (55 pav.).



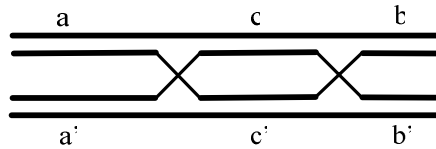
55 pav. Supaprastinta RFLP lokusų kartografavimo, naudojant grįžtamąjį kryžminimą, schema. Genolapio populiaciją sudaro tėvai (P₁ ir P₂), F₁ ir P₁×F₁ palikuonys. Dviejų skirtingų lokusų aleliai nustatyti molekuliniais zondais 1 ir 2. Rekombinantai yra individai, kurie dvejose autoradiogramose (kiekvieno zondo atskirai) turi iš viso tris juostas. Paveikslo apačioje paaiškinta, kaip susidaro rekombinantai tarp šių dviejų lokusų (*a* lokusas nustatomas zonu 1, o *b* – zonu 2) (pagal Jones ir kt., 1997)

Diagrama, pateikta 55 paveiksle, labai supaprastinta, nes joje analizuojama tik 12 individų ir naudojami tik du molekuliniai zondai – 1 ir 2. Įvairūs zondai duoda skirtingus RFLP juostų vaizdus individų genomineje DNR. Paveikslo apačioje paaiškinta, kaip vertinami gauti rezultatai pagal juostų pasiskirstymo tvarką, kaip atpažįstami rekombinantai ir tėvinių fenotipą turintys individai, kaip apskaičiuojamas rekombinacijos dažnis tarp dviejų lokusų. Šiame pavyzdyje rekombinantai yra individai (3, 6, 9, 12), kurie dvejuose geliuose (su dviem zondais) turi tris juostas. Taigi iš 12 grįžtamojo kryžminimo palikuonių keturi yra rekombinantai. Todėl rekombinacijos dažnis tarp RFLP lokusų bus 33 proc. Naudojant daugiau zondų, rezultatų analizė atliekama pagal tą patį principą: dvi autoradiogramos, gautos naudojant skirtingus zondus, lyginamos tarpusavyje, nustatoma, kokią dalį tarp visų palikuonių sudaro rekombinantai (56 pav.). Jeigu panaudoti 80 zondų ($n = 80$), tai gausime 3160 galimų lokusų porų $[(n - 1) \times (n/2)]$ ir šių duomenų pagrindu galima sukurti tikslų genolapį. Tačiau šiuo atveju skaičiavimai atliekami naudojant kompiuterines programas. Genolapio populiacijos analizės duomenys įrašomi pasinaudojant paprastu binariniu kodu ir kiekvieno zondo indikatoriumi. Vienos chromosomos genolapis galėtų atrodyti kaip linija, suskaldyta statmenų brūkšnelių, kurių kiekvienas žymi tam tikro lokuso padėtį. Lokusai dažniausiai pavadinti jų nustatymui naudotų zondų pavadinimais.

Rekombinacijos tyrimo rezultatai
 a-b = 33%
 a-c = 26
 c-b = 8
 a-d = 50



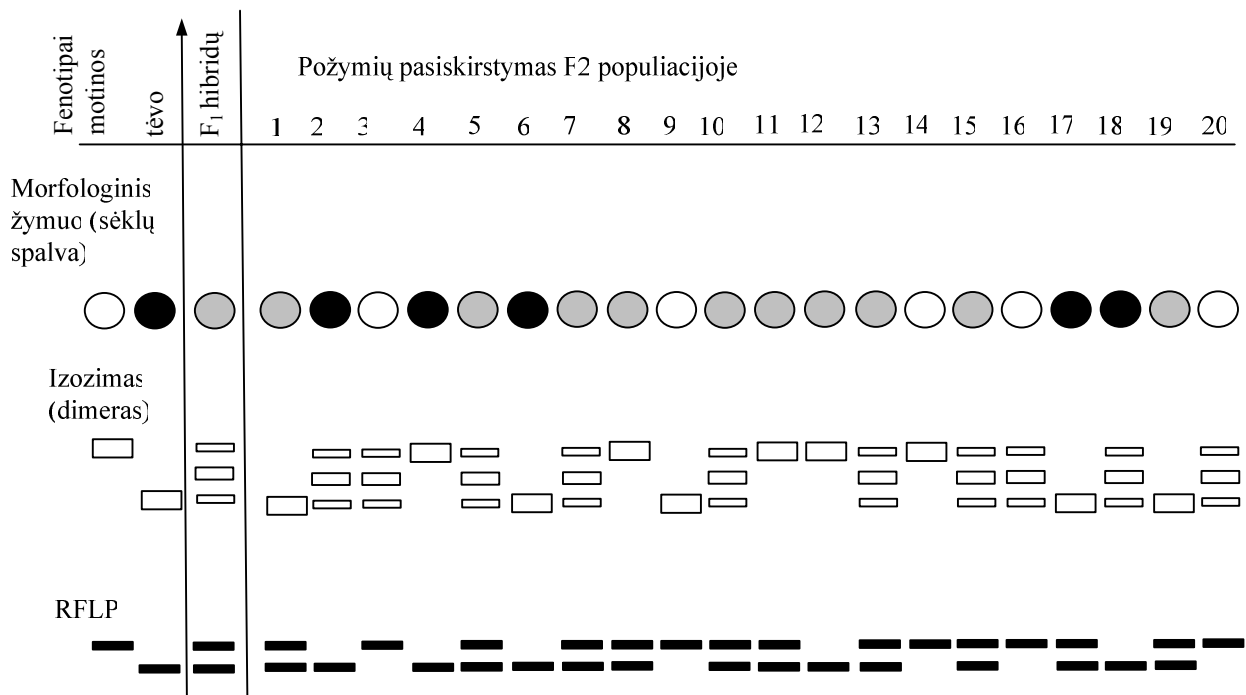
Dėl dvigubo krosingoverio rezultatai ne visiškai sutampa



80 zondų = 3160 tarpusavio galimų derinių

56 pav. Rekombinacijos dažnių reikšmių panaudojimas genolapiams sudaryti (Jones ir kt., 1997). Norint sukurti RFLP genolapį, būtina apskaičiuoti rekombinacijos dažnių reikšmes dideliame lokusų porų skaičiui, po to nustatyti lokusų išsidėstymo tvarką, geriausiai atitinkančią jų paskirstymą į sankibos grupes. Tai gali būti atlikta tik naudojant kompiuterines programas

Po to, kai panaudojus molekulinis žymenis sudaromas genolapis, toliau kartografuojami morfologiniai, biocheminiai ir kiti žymenys jame. Molekulinių žymenų genolapis pranašesnis už sudarytus tik morfologinių ar biocheminių žymenų pagrindu, nes jis yra daug tikslesnis ir išsamesnis. Jame beveik nėra tuščių vietų, nes daugelis molekulinis žymenų (RFLP, AFLP, RAPD, SNP ir kt.) tolygiai pasiskirsto genome.

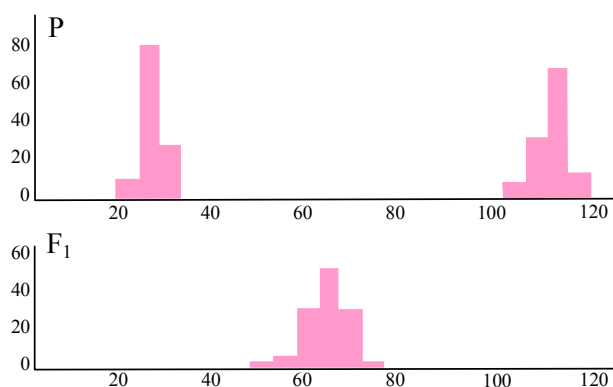


57 pav. Sankibos tarp molekulinis, biocheminių ir genetinių žymenų nustatymo schema (pagal Paterson ir kt., 1991). Pavyzdžiui, nustatant, ar lokusas, lemiantis sėklų spalvą, sukibęs su tam tikru RFLP lokusu, atliekami individų, besiskiriančių sėklų spalva ir RFLP lokuso aleliais, kryžminimai. Genolapio populiacijoje (šiuo atveju F₂) nustatomi tėvinių ir rekombinantinių fenotipą turintys individai. Matyti, kad 12 ir 17 individai turi naujus požymių derinius, todėl iš 20 tirtų palikuonių du yra rekombinantai

Norint sukurti jungtinį genolapį, kuriame be molekulinį žymenų būtų kartografuoti ir morfologiniai, biocheminiai žymenys, reikia nustatyti pastarųjų padėtį molekulinį žymenų atžvilgiu. Toks genolapis labai perspektyvus, nes gali būti panaudotas svarbiems genams, nulemiantiems, pavyzdžiui, atsparumą biotiniam ar abiotiniam stresui, adaptyvumą, klonuoti. Taigi norint kartografuoti morfologinius ar kitokius žymenis molekuliniam genolapyje, reikia turėti mus dominančio požymio alternatyvias išraiškas, t.y. būtinas požymio fenotipinis kintamumas. Pavyzdžiui, populiacija gali būti polimorfiška alelių, lemiančių sėklų spalvą, atžvilgiu. Šie aleliai pasiskirstys į gametas su tam tikrais RFLP žymenimis (57 pav.). Apskaičiavus rekombinacijos dažnio tarp šio ir RFLP lokuso alelių reikšmes, galima nustatyti pigmentacijos geno vietą genolapyje. Tą patį principą galima panaudoti ir lokusams, nulemiantiems atsparumą ligoms, kenkėjams, sausrui ir kt.

2.4.1.3. Kiekybinių požymių lokusų kartografavimo principai

Dauguma augalų ir gyvūnų požymių, turinčių praktinę reikšmę, yra kiekybiniai. Nuo kokybinių juos skiria variacinis kintamumas, kuris pastebimas ir homozigotinėse, genetiškai grynose linijose (58 pav.).



58 pav. Dviejų tabako linijų, besiskiriančių vainiklapių ilgiu, kryžminimo rezultatai. Abscisių ašyje – vainiklapių ilgis (mm); ordinačių – augalų, turinčių tam tikrą vainiklapių ilgį, skaičius grynojoje linijoje

Kiekybinių požymių pavyzdžiu gali būti derlingumas, atsparumas stresui, aukštis, svoris. Genų kurie lemia šiuos fenotipus, paprastai būna keli ar keliolika. Jie išsklaidyti įvairiose genomo vietose, tarpusavyje susiję tik fiziologiškai ir vadinami poligenais. Naudojant molekulinis žymenis, galima nustatyti, kiek ir kokiose genomo vietose esantys vadinamieji kiekybinių požymių lokusai (angl. *quantitative trait loci* – *QTL*) veikia sudėtingo požymio pasireiškimą.

Kiekybinių lokusų kartografavimas tapo įmanomas tik atradus molekulinis žymenis. Naudojant juos, buvo sukurti labai išsamūs genolapiai, o pagal juos nustatoma ir kiekybinių lokusų padėtis. Tarkime, mus dominantis kiekybinis požymis yra augalo aukštis. Šiuo atveju genolapio populiacija gaunama sukryžminus dvi tėvines linijas, kurios skiriasi tiek savo aukščiu, tiek RFLP lokusų aleliais (59 A pav.). RFLP aleliai ir kiekybinių požymių lokusai (KPL), lemiantys augalo aukštį, pasiskirsto palikuonių kartose. Paprastumo dėlei įsivaizduokime, kad turime vieną KPL, kuris susideda iš tam tikro skai-

čiaus greta esančių genetinių determinantų. Šie, tarpusavyje sąveikaudami, ir valdo kiekybinio požymio (augalo aukščio) pasireiškimą. Taigi šis KPL gali būti paveldimas labai įvairiai daugybės molekulinų žymenų atžvilgiu, kurie gali būti greta jo, labiau nutolę arba visai kitoje sankibos grupėje. Taigi apie šias situacijas išsamiau (59 pav.).

1. RFLP lokusas *a* yra glaudžiai susijęs su KPL. Tarkime, F1 RFLP alelis *a* yra toje pačioje homologinėje chromosomoje, kaip ir žemą augalo aukštį lemiantys KPL aleliai, o RFLP alelis *a'* yra toje pačioje homologinėje chromosomoje, kaip ir aukštą augalo ūgį lemiantys KPL aleliai. Tada F1 augalai bus tarpinio aukščio ir heterozigotiniai *aa'*. Grįžtamojo kryžminimo palikuonyse RFLP alelis *a* paveldimas kartu su žemesnį ūgį lemiančiais augalo KPL aleliais, o alelis *a'* paveldimas kartu su kiekybinių požymių lokuso aukštaūgiškumo aleliais. Jeigu nustatysime augalų, turinčių *a* bei *a'* alelius, aukštį ir jį pavaizduosime koordinačių sistemoje, tai gausime dvi atskiras individų grupes, kurių aukščiai grupuosis apie tam tikrą modalinę klasę (59 B 1 pav.).

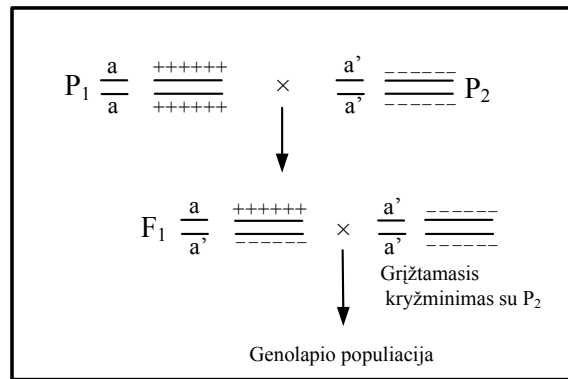
2. RFLP lokusas *b* artimai susijęs su KPL, lemenčiu augalo aukštį. Šiuo atveju F1 palikuonys bus heterozigotos *bb'* ir kaip ir ankstesniu atveju – tarpinio aukščio. Tačiau juose įvykus krosingoveriui tarp aukščio ir RFLP lokusų, susidarys nedidelis skaičius rekombinantų, turinčių naujus aukščio alelių ir RFLP alelių derinius. Nors tarp palikuonių dauguma *b* alelį turinčių palikuonių bus žemaūgiai, o *b'* – aukštaūgiai, tačiau keletas rekombinantų turės kitus šių alelių derinius. Ši situacija grafiškai pavaizduota 59 B 2 pav. Dvi kreivės jau šiek tiek persidengia.

3. RFLP lokusas *c* nutolęs nuo KPL toje pačioje chromosomoje dar didesniu atstumu. Didelis krosingoverio dažnis F1 nulems šioje situacijoje, naujų derinių tarp RFLP ir aukščio alelių susidarymą, o dvi kreivės beveik sutaps (59 B 3 pav.).

4. RFLP lokusas *d* nesusijęs su KPL. Jeigu molekulinis žymuo ir KPL yra skirtingose chromosomose, tai jie bus paveldimi nepriklausomai ir bus kreivių visiškas persidengimas (59 B 4 pav.).

Taigi KPL kartografavimo logika gana paprasta. Mes siejame tam tikrą KPL su turimais kartografuotais molekuliniais žymenimis, analizuojame jų tarpusavio paveldėjimo dėsninumus ir nustatome KPL padėtį genolapyje. Ji žymima kaip tam tikras intervalas, o ne pavienis taškas, nes toje chromosomos dalyje gali būti sutelkta įvairus skaičius genetinių determinantų, darančių įtaką požymio ekspressyvumui. Eksperimentiniame darbe su KPL efektu būna siejamas labai įvairus skaičius RFLP lokusų. Taigi mes galime atidėti efekto tikimybę lokuso padėties atžvilgiu ir po to kartografuoti KPL arčiausiai esančių žymenų atžvilgiu. Grįžtant prie 59 paveiksle pateiktos situacijos galime teigti, kad turime vieną KPL, esantį tarp 1 ir 2 RFLP lokusų. Tačiau realioje situacijoje kiekybinių požymių lokusų, darančių įtaką tam tikram kiekybiniam požymiui, būna daugiau. Naudojant šią metodiką, sudėtingą požymį galima genetiškai išskaidyti, o turimus konkrečius molekulinis žymenis, susijusius su svarbiausiais požymį veikiančiais KPL, panaudoti molekulinėje selekcijoje.

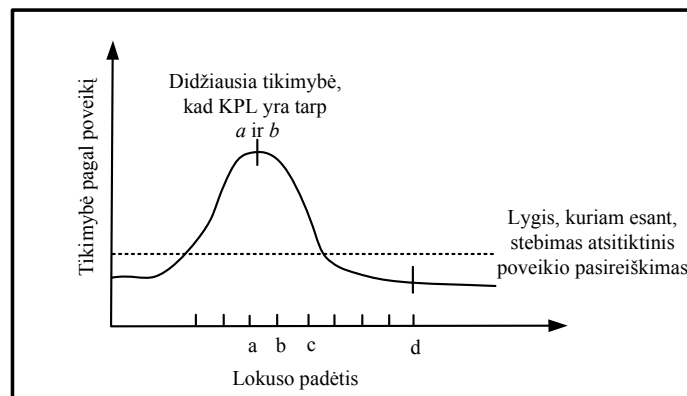
A



B

Lokusas	F1 sankiba	Fenotipas	Išvada
1	$\frac{a}{a'}$ (represented by a line with six '+' signs above and six '-' signs below)	Graphs for aa' and $a'a'$ showing two distinct peaks. Labeled 'poveikis'.	1-as lokusas yra arti KPL
2	$\frac{b}{b'}$ (represented by a line with six '+' signs above and six '-' signs below)	Graphs for bb' and $b'b'$ showing two overlapping peaks. Labeled 'poveikis'.	2-as lokusas sukibęs su KPL
3	$\frac{c}{c'}$ (represented by a line with six '+' signs above and six '-' signs below)	Graphs for cc' and $c'c'$ showing two overlapping peaks. Labeled 'poveikis'.	3-as lokusas sukibęs su KPL, bet yra nuo jo toli
4	$\frac{d}{d'}$ (represented by a line with six '+' signs above and six '-' signs below)	Graphs for dd' and $d'd'$ showing a single broad peak. Labeled 'poveikis'.	4-as lokusas nesukibęs su KPL
Visi lokusai		Graph showing a single broad peak.	

C

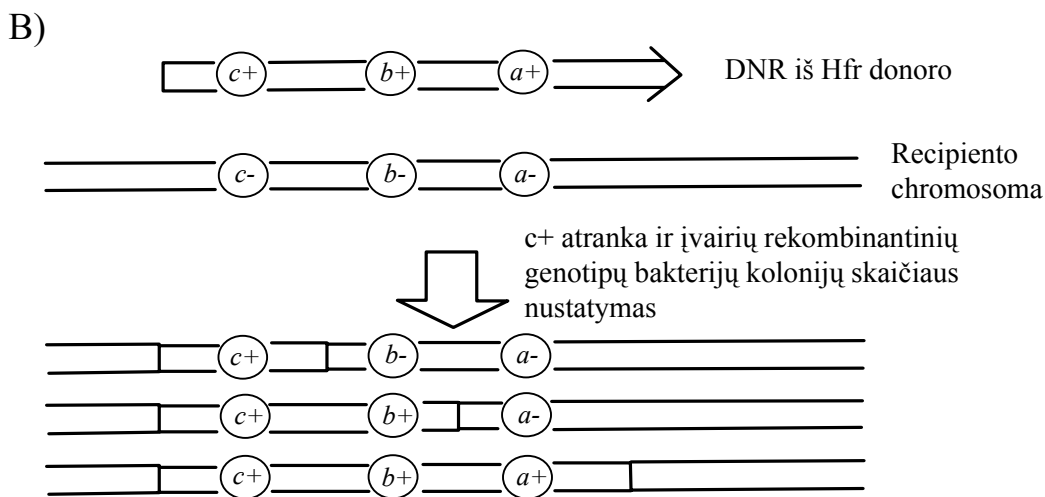
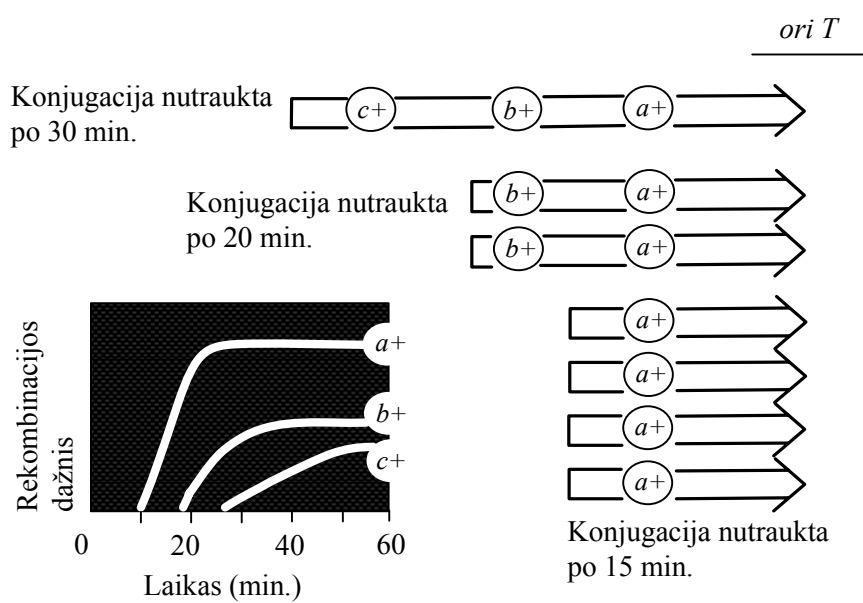


59 pav. Kiekybinio požymio lokuso (KPL) kartografavimo metodika (pagal Jones ir kt., 1997). A – genolapio populiacija gaunama sukryžminus tėvines linijas, besiskiriančias savo RFLP žymenimis ir kiekybinio požymio (aukščio) išraiška. Heterozigotinis F1 augalas kryžminamas su vienu iš tėvų (P₂) (grįžtamasis kryžminimas) ir gaunama palikuonių, besiskiriančių analizuojamais požymiais, populiacija; B – KPL ir įvairių molekulinį žymenų lokusų sukibimas gali būti įvertinamas pagal tai, kaip augalo aukštis susijęs su vienu iš dviejų kiekvieno molekulinio žymens lokuso aleliu.; C – KPL padėtis genolapyje nustatoma pagal didžiausią tikimybės reikšmę, apskaičiuotą kiekvienam lokusui. Ši reikšmė – tai santykis tarp tikimybės, kad stebimas efektas yra dėl KPL ir žymens lokuso sankibos ir tikimybės, kad stebimas efektas yra atsitiktinis

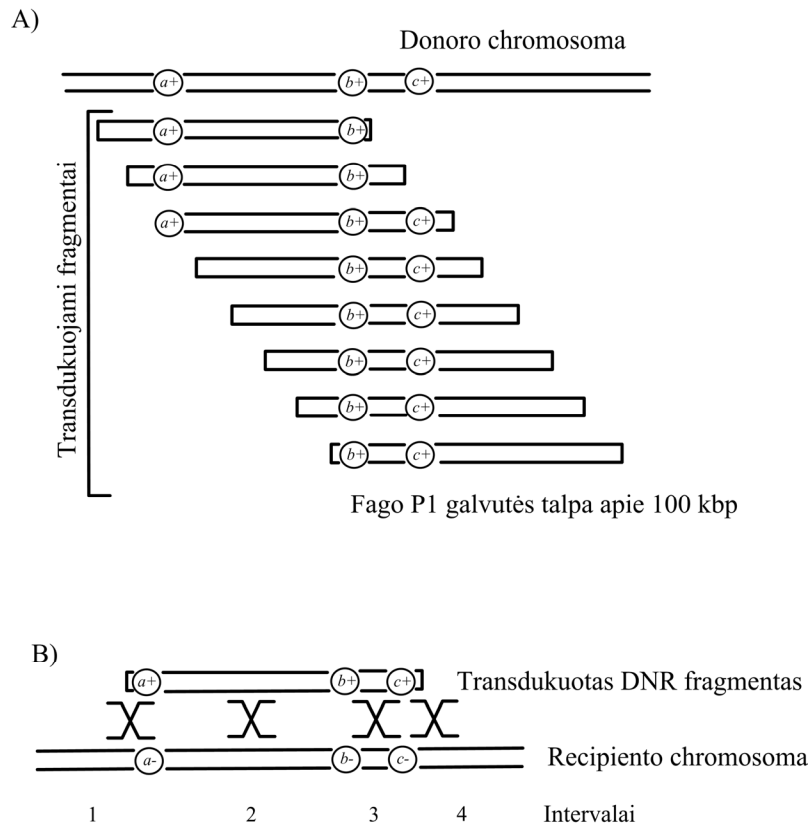
2.4.2. Bakterijų genų kartografavimas

Kartografavimą bakterijose sunkina tai, kad jos yra haploidinės ir nesidaugina lytiniu būdu. Tačiau šios problemos sėkmingai sprendžiamos naudojant įvairius DNR perkėlimo iš vienos bakterijų ląstelės į kitą būdus. Vienas iš jų – konjugacija, yra labiausiai panaši į eukariotų kryžminimąsi: ląstelė–donoras (F^+) kryžminama su ląstele–recipientu (F^-). F plazmidė, aptinkama ląstelėse donoruose, yra būtina kryžminimuisi ir chromosominės DNR pernašai į recipiento ląstelę. Bakterijos chromosoma pernešama tik tuo atveju, kai F plazmidė yra integruota į ją. Tai labai retas atvejis, bet yra atrinkti kamienai, kuriuose F jau yra chromosomoje. Šiuo atveju DNR pernaša yra žymiai dažnesnė. Tokie kamienai vadinami *Hfr* (angl. *high frequency of recombination*). Kryžminant *Hfr* su F^- kamieniu, į pastarąjį (recipientą) plazmidė gali pernešti didelius donoro chromosomos fragmentus (netgi visą chromosomą). Kartografuojant naudojami du metodai. Pirmasis – nutrauktas poravimasis. Šiuo atveju *Hfr × F^- konjugacijos procesą tam tikrais laiko momentais nutraukia terpės su antibiotikais supurtymas arba antibiotikų, slopinančių DNR replikaciją, pridėjimas. Žymenys, esantys iš vienos F plazmidės įsijungimo į chromosomą pusės, pernešami pirmiausia, o iš kitos – vėliausiai, todėl jų išsidėstymą galima nustatyti pagal konjugacijos laiką, reikalingą genui pernešti į recipientą. Labiau nutolusiems genams pernešti reikės daugiau laiko (60 A pav.). Antrasis metodas remiasi rekombinacijos dažnio tarp žymenų nustatymu (60 B pav.). Konjugacija tinka apytiksliam mutacijų kartografavimui, tačiau nelabai naudinga arti esančių genų išsidėstymo tvarkai nustatyti. Tam naudojamas bendrosios transdukcijos metodas. Jo esmę sudaro bakterinės chromosomos fragmentų įpakavimas į bakteriofago galvutes ir tokios DNR pernešimas į recipiento ląstelę, kurioje DNR rekombinuoja su šeimininko chromosoma. Svetimą DNR į savo galvutę bakteriofagas gali įpakuoti per klaidą. Kadangi į galvutę telpa nedaug DNR (pvz., 100 kb į *E. coli* bakteriofago P1 galvutę), todėl tik tokio dydžio fragmente esantys žymenys gali būti pernešami kartu (61 pav.). Tai vadinama kotransdukcija.*

A)  Laikas nuo pernešimo pradžios (min.)



60 pav. Genų išsidėstymo tvarkos bakterijos chromosomoje nustatymas konjugacijos būdu: A – konjugacijos nutraukimas. Konjugacija nutraukiama stipriai supurčius paimtus (po 15, 20, 30 min.) besikryžminančių bakterijų mėginius ir išsėjus ląsteles ant selektyvių tiriamiems žymenims (a^+ , b^+ , c^+) terpių. Per 10 min. pernešamas a^+ , per 17 – b^+ , per 25 – c^+ . Todėl šių genų išsidėstymo tvarka: a^+ , b^+ , c^+ . a^+ yra arčiausiai F plazmidės pernešimo pradžios taško $oriT$. B – perneštų genų rekombinacija su recipiento chromosoma. Donoro ir recipiento ląstelės sumaišomos, tarp jų vyksta konjugacija. Po to bakterijos pasėjamos ant selektyvios mitybinės terpės, kur gali daugintis tik recipiento ląstelės, gavusios c^+ geną. Tai rodo, kad į šias bakterijas buvo perneštas donorinės DNR fragmentas nuo $oriT$ iki c^+ . Po to pagal rekombinacijos tarp a , b , c alelių dažnį (pagal rekombinantinius genotipus) nustatomas atstumas tarp šių genų (pagal Leach, 1996)



61 pav. Kartografavimas kotransdukcijos būdu. Metodus naudojamas gretimų genų išsidėstymo tvarkai chromosomoje nustatyti. Kotransdukcijos dažnis, rodantis atstumą tarp genų, priklauso nuo dviejų procesų: pakavimosi į fago galvutę ir rekombinacijos su recipientio chromosoma. A – pakavimasis: tikimybė, kad du genai įpakavimo metu pateks į fago galvutę kartu, priklauso nuo atstumo tarp jų. Paveiksle pavaizduoti genai *a* ir *b* kartu įpakuojami tris, *b* ir *c* – šešis, *a* ir *c* – vieną kartą. B – rekombinacija: ant transdukuoto fragmento yra trys genai ir keturi intervalai (1–4), kurie gali dalyvauti rekombinacijoje su chromosoma (pagal Leach, 1996)

Kuriant genetinius kamienus, dažniausiai reikia pakeisti tik nedidelę DNR sritį nepakeičiant aplinkui esančios DNR. Todėl būtina įterpti tik nedidelį donoro DNR fragmentą. Dėl šios priežasties bendroji transdukcija yra labai patogus metodas bakterijų rekombinantiniams kamienams sukurti.

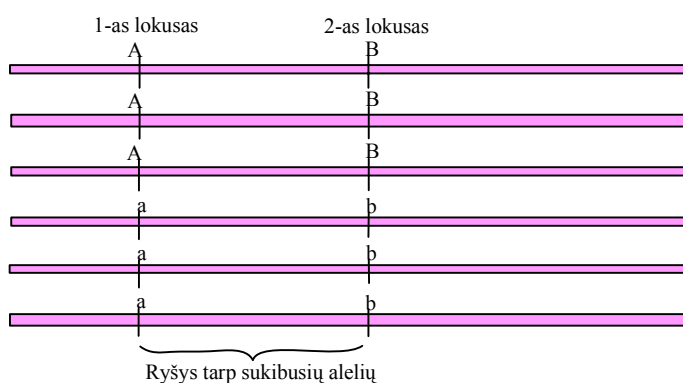
2.4.3. Nepusiausvira sankiba

Nepusiausvira sankiba – tai neatsitiktinis ryšys tarp skirtingų lokusų alelių (62 pav.). Pastaruoju metu susidomėjimas nepusiausvira sankiba (angl. *linkage disequilibrium*, *LD*) labai padidėjo dėl dviejų priežasčių:

- 1) patobulinti genomo tyrimo metodai leidžia greitai nustatyti haplotipus (chromosomai būdingus alelių rinkinius) daugelyje genetinių lokusų. Tokių metodų pavyzdžiu gali būti vieno nukleotido polimorfizmo (angl. *single nucleotide polymorphism*, *SNP*) nustatymas, DNR sekoskaita ir kt.;
- 2) atlikus išsamią tam tikros populiacijos individų genomo analizę, patikima nepusiausvira sankiba (kelių dešimčių kbp ir daugiau) leidžia nustatyti genetinius rajonus, susijusius su tam tikru fenotipu (požymiu), pavyzdžiui, atsparumu vienai ar kitai ligai. Ir priešingai, tuo atveju, kai nepusiausvira sankiba sparčiai sumažėja už tam tikro geno ribų, atsiranda galimybė identifikuoti už požymį atsakingą geną, ištyrus nedidelį kandidatinių genų skaičių (Rafalski ir Morgante, 2004).

Nepusiausvira sankiba atspindi bendrąją chromosomų kilmę. Jeigu chromosomoje yra bent keli polimorfiniai lokusai, tai kiekviena nauja mutacija visada yra nepusiausviroje sankiboje, nes iš pradžių ji aptinkama tik vieninteliame haplotipe. Bėgant laikui, rekombinacija mažina nepusiausviroje sankibos apimtį. Nepusiausviroje sankibos tarp alelių egzistavimas atspindi tam tikro haplotipo populiacijoje vykusios rekombinacijos istoriją.

Nepusiausviroje sankibos tyrimų pradžia galima būtų laikyti 1909 metus, kai Weinberg'as pastebėjo ir aprašė dviejų gretimų lokusų alelių sąsajos dėsnį populiacijoje (Xiong ir Guo, 1997). Daugiausia nepusiausviroje sankibos tyrimų atlikta dirbant su žmogaus populiacijomis. Individualūs SNP haplotipai konkrečiame gene metodiškai yra analizuojami ieškant sąsajos su dominuojančiuoju fenotipu. Didelės apimties nepusiausviroje sankiba gali sumažinti SNP lokusų skaičių, kuris turi būti išanalizuotas siekiant apibūdinti genotipus kaip visumą.



62 pav. Nepusiausvira sankiba tarp alelių dviejuose lokusuose. Esant nepusiausvirai sankibai, nustatius alelį viename lokuse, kartu gaunama informacija ir apie atitinkamą alelį kitame lokuse

Populiacijoje randama nepusiausvira sankiba yra daugelio veiksnių sąveikos padarinys. Ypač svarbu yra naujų mutacijų dažnis ir rekombinacijos greitis (dažnis). Naujos mutacijos sukuria naujus haplotipus. Bėgant laikui, nepusiausvira sankiba mažėja. Rekombinacija suardo haplotipus ir mažina nepusiausvirą sankibą. Tai vyksta tuo greičiau, kuo didesnis rekombinacijos dažnis. Dažniausiai, bet ne visada, nepusiausvira sankiba palaipsniui mažėja tolygiai nuo tam tikro pasirinkto alelio. Tai rodo didesnę rekombinacijos tikimybę platesniame chromosomos intervale. Kur nevyksta rekombinacija, ten yra visiška nepusiausvira sankiba. Be to, nepusiausvirą sankibą veikia ir dauginimosi būdas. Pavyzdžiui, augalai skirtingai nei žinduoliai gali daugintis savidulkos būdu ir kryžmiškai. O tai lemia didelius nepusiausviroje sankibos skirtumus jų chromosomose. Rūšyse, kuriose vyrauja savidulka (vairėnyje, sojoje, miežyje), rekombinacija dėl didelio šių rūšių individų homozigotiškumo vyksta tarp identiškų haplotipų. Todėl šiuo atveju ji nesumažina nepusiausviroje sankibos. Tokiose rūšyse nepusiausvira sankiba gali siekti nuo dešimčių iki šimtų kbp (9 lentelė). Kryžmadulkėse augalų rūšyse (kukurūzuose, daugumoje spygliuočių) stebima daug mažesnė nepusiausvira sankiba. Kai kuriose kukurūzų populiacijose nepusiausvira sankiba tesiekia keletą šimtų bp (Tenaillon ir kt., 2001).

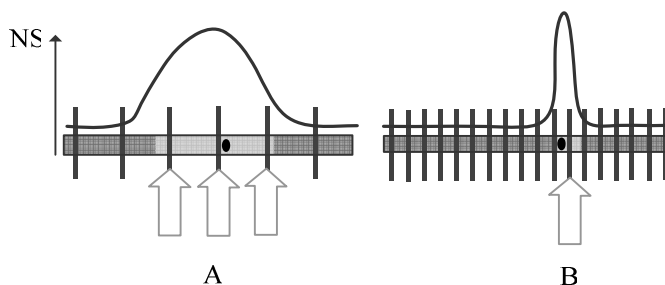
9 lentelė. Nepusiausviroje sankibos dydis įvairiose organizmų rūšyse (Tenaillon ir kt., 2001)

Rūšis	NS
Žmogus	5 – 60 kbp
Galvijai	> 10cM
Baltažiedis vairėnis	50 – 100 kbp
Soja	> 50 kbp
Paprastoji eglė	~ 100 bp ir ~ 200 bp
Vynmedis	> 500 bp
Kukurūzas	~ 400 bp
Kukurūzo imbredlinijos (JAV)	~ 1 kbp

Siekiant nustatyti ryšį tarp genotipo ir fenotipo, individai iš įvairių populiacijų genotipuojami pagal daugelį lokusų, atskirtų nedideliais intervalais vieni nuo kitų. Po to ieškoma ryšio tarp nustatytų polimorfizmų lokusuose ir tam tikro fenotipo. Kiek lokusų reikia iširti vienam genomo ilgio vienetui, norint surasti tokią koreliaciją, labai priklauso nuo nepusiausviroi sankibos lygio konkrečioje populiacijoje. Užuo tyrus visą genomą, galima nustatyti keletą konkrečių genų, remiantis jų genetinėmis ypatybėmis ar genolapio duomenimis. Tada konkretaus geno SNP arba haplotipai sujungiami ir lyginami su individų, turinčių tą ar kitą haplotipą, fenotipu. Taip ieškoma statistiškai reikšmingų skirtumų tarp polimorfizmo pasiskirstymo skirtingo fenotipo individuose.

Kuriant genolapius, dažniausiai naudojamos iš F1 gautos palikuonių genolapio populiacijos. Perspektyvi alternatyva – kartografuoti genus sąsajos analizės (angl. *association analysis*) metodu gamtinėse populiacijose. Nepusiausvira sankiba yra svarbiausias sąsajos analizės veiksnys. Atstumas, kuriuo pasireiškia nepusiausvira sankiba, nulems, kiek reikės žymenų ir koku dažnumu jie turi būti pasiskirstę genome (63 pav.). Sąsajos analizė, dar vadinama nepusiausviroi sankibos kartografavimu (angl. *LD mapping*), pirmiausia pradėta naudoti kai kurių žmogaus ligų, pvz., Alzheimerio, cistinės fibrozės ir kitų ligų prigimčiai nustatyti. Sąsajos metodas tiria, ar tam tikras alelis dažniau randamas sergančiuose ar sveikuose individuose. Koreliacijų paieška vykdoma populiacijos lygmenyje (Lander ir Schork, 1994). Neseniai metodas pradėtas taikyti ir kituose organizmuose, tarp jų ir augaluose. Naudojant gamtines populiacijas kartografavime įmanoma žymiai padidinti genolapių skiriamąją gebą. Potencialiai sąsajos analizė gali nustatyti gene vienintelį polimorfizmą, kuris atsakingas už fenotipo pokytį. Galbūt pirmąkart nepusiausvirą sankibą kartografavimui panaudojo Fisheris 1947 m. Jis lokusų išsidėstymo tvarką nustatė naudodamas rezus faktoriaus (Rh) alelių dažnius (Cardon ir Bell, 2001). Genetinės sąsajos ir sankibos analizės pagrįstos tuo pačiu dėsniumu – tai greta esančių DNR sekų paveldėjimas kartu. Sankibos analizėje toks sukibusių genų paveldėjimas tiriamas tik keliose kartose. Sąsajos analizė remiasi tokių gretimų DNR sekų išsaugojimu draugėje daugybę kartų. Didelėse ir sparčiai augančiose populiacijose (pvz., žmogaus) rekombinacija yra svarbiausia jėga, kuri, keičiantis kartoms, suardo sankibą ir sąsajas tarp DNR sekų (ar genų alelių). Kadangi sankibos analizė apima tik nedidelį laikotarpį (keletą kartų), todėl rekombinacijai tam tikrame genomo rajone įvykti nėra daug galimybių. Rajonai, siejami su tam tikra anomalija (ar požymiu), kurios tikra priežastis yra mutacija. Dažnai jie labai dideli ir gali apimti šimtus ar net tūkstančius genų. O sąsajos analizė remiasi rekombinacijos istorija tam tik-

roje populiacijoje, todėl tokie su liga susiję rajonai kryžmiškai besidauginančių individų populiacijoje teoriškai gali būti labai maži (genas ar jo dalis). Iš kartos į kartą mutantinis alelis atskiriamas nuo originaliam haplotipui būdingo alelių rinkinio. Tačiau tam tikros DNR sekos būdingos senoviniam genotipui gali išlikti. Tai ir yra nepusiausvira sankiba, suteikianti genetinį pagrindą sąsajos metodui.



63 pav. Nepusiausvira sankibos (NS) dydžio ir skiriamosios gebos priklausomumas ieškant sąsajų tarp DNR polimorfizmo ir fenotipo (Rafalski, 2002): A – kai nepusiausvira sankiba didelė, ji pamažu mažėja didėjant atstumui nuo geno, atsakingo už fenotipą (genas – ovalas šviesiai pilkoje zonoje); B – kai nepusiausvira sankiba maža, ir ji dar staigiai mažėja už priežastinio geno ribų, tai, norint rasti susijusį su požymiu žymenį (rodyklė), reikia nustatyti žymiai daugiau ir dažniau išsidsčiusių žymenų

Nepusiausvirai sankibai įvertinti dažniausiai naudojami statistiniai metodai yra r^2 ir D' . Tarkime, turime alelių porą A ir a viename lokuse ir B bei b – kitame. Jų dažniai atitinkamai yra $\pi_A, \pi_a, \pi_B, \pi_b$. Tada galimų haplotipų dažniai bus $\pi_{AB}, \pi_{ab}, \pi_{aB}, \pi_{Ab}$. Nepusiausvira sankibos statistikos esmė – skirtumas tarp stebimų ir teoriškai laukiamų haplotipų dažnių: $D_{ab} = (\pi_{AB} - \pi_A\pi_B)$. Abiejų metodų savytumas – šių skirtumų matavimo specifika (Flint-Garcia ir kt., 2003):

$$r^2 = \frac{(D_{ab})^2}{\pi_A\pi_a\pi_B\pi_b}$$

$$|D'| = \frac{(D_{ab})^2}{\min(\pi_A\pi_b\pi_a\pi_B)}, \quad D_{ab} < 0;$$

$$|D'| = \frac{(D_{ab})^2}{\min(\pi_A\pi_B\pi_a\pi_b)}, \quad D_{ab} > 0.$$

Nustatyti molekulinį žymenį, esantį nepusiausvirinėje sankiboje su tam tikru kiekybiniu požymiu lokusu, yra tas pats kaip rasti adatą šieno kupetoje. Todėl pirmasis žingsnis – nustatyti konkrečius (kandidatinius) genus, dalyvaujančius šių požymių genetinėje kontrolėje. Taigi pirmiausia genolapyje reikia nustatyti sankibą tarp konkretaus geno (ar jo žymens) ir kiekybinio požymio lokuso. Toliau, pasitelkiant sąsajos analizę, ieškoti ryšio tarp konkretaus geno polimorfizmo ir mus dominančio požymio kintamumo. Konkretus genas gali būti kelių rūšių. Funkcinis konkretus genas – tai *žinomas* genas, kuris galbūt veikia požymio išraišką. Jis gali būti numanomas *a priori* remiantis žiniomis apie mus dominančio požymio biocheminius ir raidos kelius. Raiškos konkretus genas būna tada, kai geno raiškos pokyčiai sutampa su streso poveikiu ar organizmo raidos pokyčiais ir susiję su atitinkamų kiekybinių

požymių kintamumu. Padėties konkretūs genai – tai genai, kurie genolapyje patenka į konkretaus KPL intervalą. Genai, atitinkantys visus šiuos tris kriterijus (funkciją, raišką ir padėtį), yra patikimi kandidatiniai genai, kurie gali būti patvirtinti kartografuojant nepusiausvirą sankibą gamtinėse populiacijose arba genetinės transformacijos būdu. Tik tada bus galima sukurti instrumentą molekulinei sudėtingų požymių selekcijai.

Svarbiausiu 20 a. genetikos laimėjimu būtų galima laikyti išaiškinimą, kaip genas kontroliuoja elementarų požymį, o, žiūrint iš šiandienos perspektyvos, svarbiausia, ką genetika gali duoti 21 a., galėtų būti genų ir alelių, valdančių sudėtingus (kiekybinius) požymius, nustatymas ir praktinis jų naudojimas.

2.4.4. Genetinių kamienų kūrimas homologinės rekombinacijos būdu modifikuojant recipiento genomą

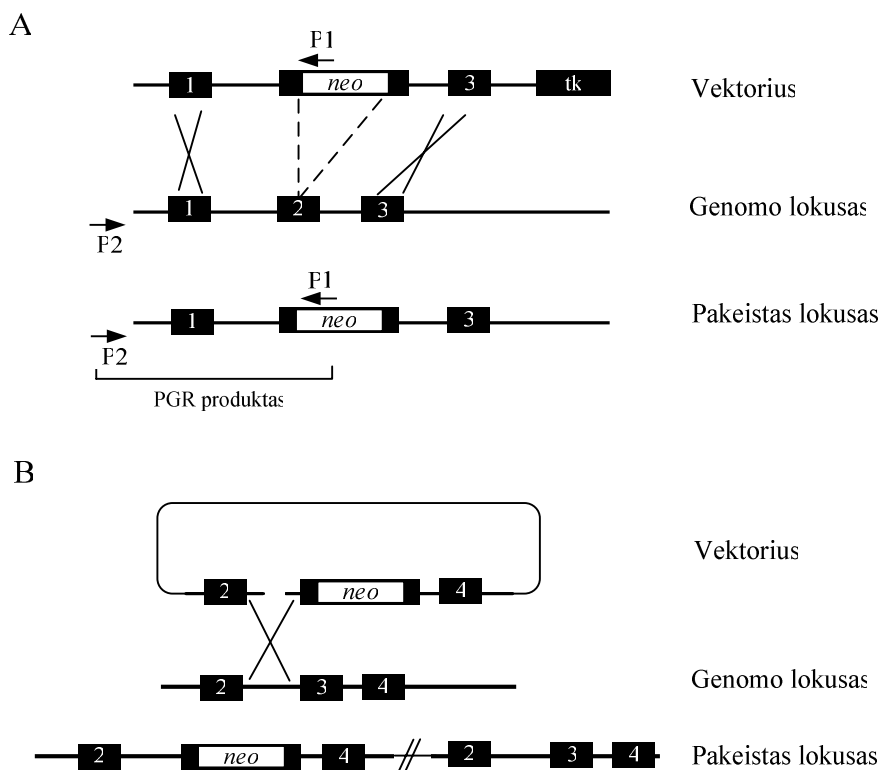
Homologinė rekombinacija, pritaikyta keičiant chromosomoje esantį geną modifikuota kopija, pirmą kartą pritaikyta *E. coli* genome. Tam panaudoti iš fago λ sukurti vektoriai, kurie buvo įterpiami į bakterijos chromosomą homologinės rekombinacijos būdu, prieš tai panaikinus fago gebėjimą vykdyti sait-specifinę rekombinaciją. Naują postūmį panašaus pobūdžio darbams davė sėkmingi bandymai, atlikti su mielėmis *S. cerevisiae*, o vėliau pritaikyti ir pelių genetikoje. Szostakas ir kt. įrodė, kad DNR, įterpta į *S. cerevisiae*, gali transformuoti mielių ląsteles, vykstant homologinei rekombinacijai su chromosominiais genais (žr. 2.3.2.4.skirsnį). Jie taip pat nustatė, kad šią rekombinaciją skatino dvi-grandis trūkis DNR homologijos vietoje. Nustatyta, kad toks trūkis ištaisomas nukopijuojant chromosomoje esančią informaciją. Šie darbai davė pradžią panašioms eksperimentams su žinduoliais, pirmiausiai pelėmis, ir jų ląstelių kultūromis. Pelės savo anatomija ir fiziologija panašios į žmogų. Kaip žinduolių modelinė sistema pelės labai tinka dėl mažo dydžio ir didelio vislumo. 80 proc. pelės genų turi vienintelį geną ortologą žmogaus genome. Daugiau kaip 90 proc. žmogaus ir pelės genomo gali būti sugrupuoti į chromosomų segmentus, kuriuose ryški sintenija (Waterston ir kt., 2002).

Kryptinga genomo modifikacija homologinės rekombinacijos būdu pelės kamieninėse embriono ląstelėse dabar yra įprastas metodas, leidžiantis modifikuoti bet kurį pasirinktą genomo lokusą. Pradžioje metodo panaudojimą pelės ir kitų žinduolių ląstelių kultūrose sunkino tai, kad nedėsninga rekombinacija šioje sistemoje yra 1000–10000 kartų dažnesnė už homologinę. Pavyzdžiui, kai pirmą kartą į žmogaus β -globino lokusą buvo įterptas vektorius homologinės rekombinacijos būdu, tai nustatytas šios rekombinacijos dažnis transformuotose ląstelėse buvo lygus 0,001 (Smithies ir kt., 1985). Todėl būtina griežta rekombinantų po homologinės rekombinacijos atranka. Reikėjo sukurti būdus, kuriais galima įveikti šią problemą. Vienas iš tokių – PGR metodas. Naudojant PGR metodą galima aptikti retus homologinius rekombinantus transformuotų ląstelių masėje ir padidinti jų kiekį. Embriono kamieninės ląstelės gaunamos iš pelės blastocisto (Evans ir Kaufman, 1981; Martin, 1981). Ląsteles įmanoma auginti sintetinėje terpėje, kurioje galima sėkmingai atrinkti rekombinantus. Po genetinio per-

tvarkymo tokios ląstelės vėl išvirkščiamos į pelės blastocistą ir iš jų gali formuotis visų tipų ląstelės. Gaunamas individas–mozaika (chimera), sudarytas iš ląstelių, turinčių tėvinį ir rekombinacinį genotipus. Jeigu iš transformuotų embrioninių ląstelių susiformuoja bent šiek tiek mozaikinės pelės generatyvinių ląstelių, tai kai kurie jų palikuonys visose savo ląstelėse gali turėti pakitusį geną. 1987 m. gauta homologinė rekombinacija į pažeistą pelės hipoksantino fosforiboziltransferazės (HPRT) geną (Doetschman ir kt., 1987; Thomas ir Capecchi, 1987).

Dar vienas svarbus aspektas šiuose eksperimentuose – genotipas, kuriame galima būtų tirti gautas mutacijas. Vienas dažniausiai naudojamų yra 129 pelių kamienas. Iš jo lengviausia gauti kamieninių ląstelių linijas.

Modifikuojant pelių genomą homologinės rekombinacijos būdu, naudojami dviejų tipų vektoriai: pakeitimo ir įterpimo (64 pav.).



64 pav. Homologinės rekombinacijos vektorių, naudojamų genams modifikuoti, klasifikacija (Müller 1999): A – pakeitimo vektorius. Antrasis tikslinio geno egzonas modifikuojamas, į jį įterpus atsparumo neomicinui (*neo*) geną, esantį linijiniame vektoriuje. HSV timidino kinazės genas (*tk*) prarandamas homologinės rekombinacijos metu. Juodi stačiakampiai – egzonai; ištisinės x pavidalo figūros – krosingoverio vieta; punktyrinės linijos – kai kurios homologiškos sekos. P1 ir P2 – PGR pradmenys, naudojami rekombinantų, gautų HR būdu, atrankai; B – įterpimo vektorius, kuris suskaldytas homologijos rajone tarp 2-ojo ir 3-ojo egzonų. *Neo* genas – žymuo atrankai. Homologinė rekombinacija sukelia vektorių sekų įsiterpimą ir dalinę genomo sekų duplikaciją. Plona linija – plazmidės kontūrai

Dauguma pelės nulinių mutantų gauti panaudojant pakeitimo vektorius (Müller, 1999). Nustatyta, kad tokiuose genų pakeitimo ar išjungimo eksperimentuose homologinės rekombinacijos dažniui įtakos turi keli veiksniai:

- 1) rekombinacijos dažnis didėja, kai didėja homologijos saito tarp vektoriaus ir tikslinio lokuso ilgis maždaug nuo 0,5 kbp iki 10 kbp. 0,5 kbp yra minimalus homologijos saito dydis šioje sistemoje;
- 2) rekombinacijos dažnis didesnis naudojant iš to paties organizmo genomo paimtą DNR;
- 3) absoliutūs rekombinacijos dažniai, matyt, priklauso nuo paties lokuso savybių. Tai gali nulemti jo chromatino organizacija.

Dabar, kai atliekamos sudėtingos manipuliacijos genetiniams pelių kamienams sukurti, vis plačiau taikomos sait-specifinės rekombinacijos sistemos. Jų konstravimo ir panaudojimo principai bus aptarti 3.1.7. skirsnyje.

Žinduolių genų išjungimo metodų, panaudojant homologinę rekombinaciją embrionų kamieninėse ląstelėse, sukūrimas turėjo didžiulę reikšmę visiems žinduolių biologijos tyrimams. Todėl nenuostabu, kad trys daugiausia šioje srityje nusipelnę mokslininkai (M.R. Capecchi, M.J. Evans ir O. Smithies) 2007 m. įvertinti Nobelio premija.

3. Sait-specifinė rekombinacija

Tai šiek tiek pasenęs terminas. Istoriskai šiai reiškinių grupei buvo priskiriami gana įvairūs rekombinacijos vyksmai, pavyzdžiui, fagų integracija ir ekscizija ar judriųjų elementų transpozicija. Dabar apie transpoziciją ir taip vadinamąją konservatyviąją sait-specifinę rekombinaciją (KSSR) kalbama atskirai. Vis dėlto šioms reiškinių grupėms būdingi kai kurie bendri bruožai, skiriantys juos nuo homologinės rekombinacijos ir nedėsningos rekombinacijos, ir bent iš dalies pateisinantys senojo termino vartoseną. Sait-specifinėje rekombinacijoje dalyvaujančios baltymų molekulės (rekombinazės) atpažįsta specifines sekas ir sąveikauja su jomis. Šio tipo persitvarkymai nukleorūgščių molekulėse vyksta nepriklausomai nuo *recA* (*Rad51*) geno veiklos. Nepaisant šių panašumų, egzistuoja dideli skirtumai tarp transpozicijos ir KSSR. Skiriasi šių reiškinių mechanizmai bei galutiniai rezultatai, todėl apie juos kalbėsime atskirai.

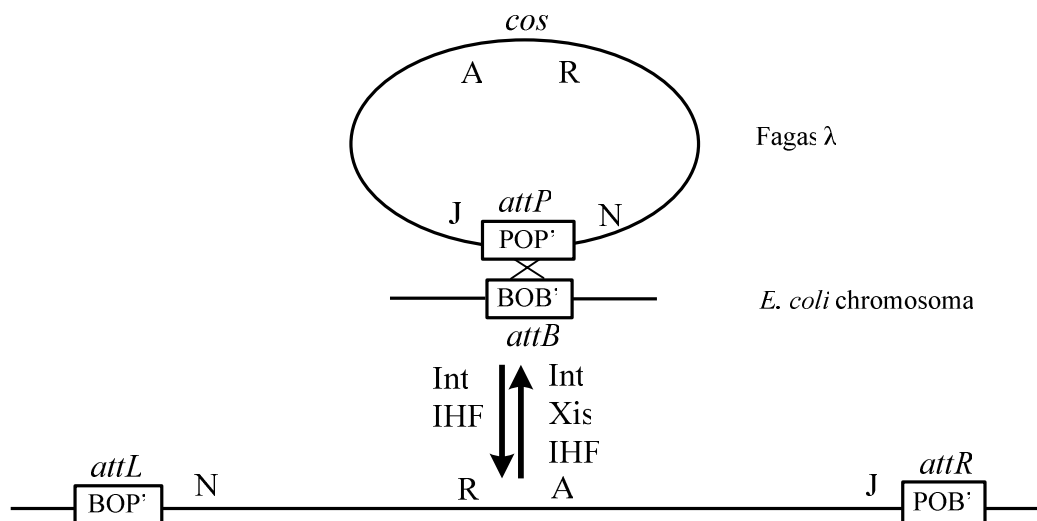
3.1. Konservatyvioji sait-specifinė rekombinacija

1962 m. A. M. Campbell atrado **konservatyviąją sait-specifinę rekombinaciją** (KSSR). Mokslininkas, aiškindamas šį reiškinį, iškėlė hipotezę, kad fagas λ gali įsiterpti ir išsikirti iš *E. coli* genomo (Campbell, 1962). Pagrindinė KSSR savybė yra ta, kad ji vyksta tarp įvairaus dydžio specifinių sekų. DNR trūkiai ir sujungimai labai tikslūs, juose nevyksta DNR sintezė, nesusidaro delecijų ar duplikacijų. KSSR – reciprokinė rekombinacija. Sąveikoje dalyvaujančios DNR molekulės turi įvairaus dydžio (priklausomai nuo sistemos) identiškas sritis. Be to, KSSR metu susidaro laikina kovalentinė jungtis tarp suskaldytos DNR molekulės galo ir rekombinazės baltymo. Taip yra laikinai išsaugoma fosfodiesterinės jungties energija. O transpozicijoje dalyvaujančios DNR molekulės dažniausiai neturi jokios homologijos, DNR trūkis ir sujungimas susiję su didesne ar mažesne DNR sinteze. Ši rekombinacija nereciprokinė. Tarp transpozazės (ar integrazės) ir DNR nesusidaro laikina kovalentinė jungtis. Vykstant KSSR, du skirtingi replikonai gali būti sujungiami į vieną, replikonai gali būti atskirti, taip pat gali vykti DNR rajono inversija. Pagal tai KSSR sistemos skirstomos į integracijos-ekscizijos, atskyrimo-ekscizijos bei inversijos sistemas.

3.1.1. Integracijos-ekscizijos sistemos

Bene geriausiai ištirti šio tipo reiškiniai – fagų integracija ir ekscizija. Kaip minėta, Campbell, tirdamas liamboidinius fagus, atrado šio tipo rekombinacijos mechanizmą. Campbell teisingai numatė, kad lizogeninės būsenos metu fagas λ yra integravęsis į bakterijos chromosomą. Integracijos metu vyksta sait specifinė-rekombinacija tarp fago *attP* ir bakterijos *attB* saitų (65 pav.). Rekombinacijai reikalingi du baltymai: fago koduojamas Int baltymas ir *E. coli* baltymas IHF (angl. *Integration host factor*). Profagas bakterijos chromosomoje atsiduria *attL* ir *attR* saitų apsuptyje. Tuo metu, kai fagas išsikerpa iš bakterijos chromosomos, vyksta rekombinacija tarp šių sekų. Jos yra *attP* ir *attB* hibridai.

Profago ekscizijai reikalingi Int, IHF ir Xis (λ) baltymai. Proceso metu ląstelėje dar dalyvauja ir *E. coli* koduojamas baltymas Fis. Šiam KSSR tipui priklauso nemažai įvairiausių fagų integracijos ir ekscizijos sistemų (pavyzdžiui, $\phi 80$, P2, P4, P22 ir kt.).

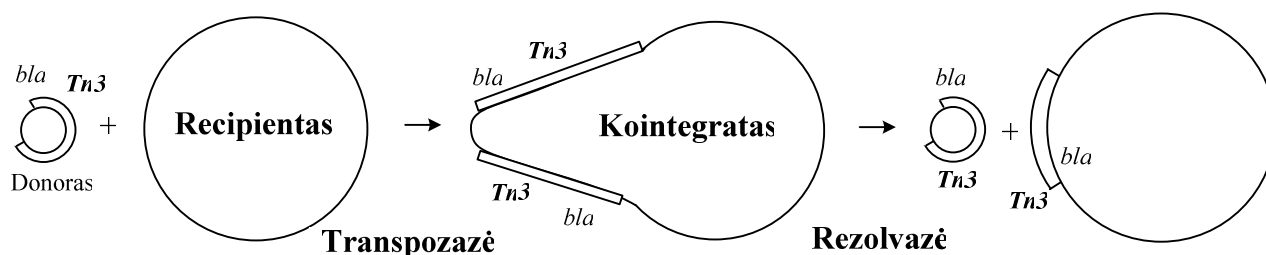


65 pav. Fago λ integracijoje bei ekscizijoje dalyvaujantys baltymai ir rekombinacijos saitai

3.1.2. Atskyrimo-ekscizijos sistemos

3.1.2.1. Transpozonų kointegratų atskyrimas

Tn3 tipo transpozonų šokinėjimas vyksta dviem etapais. Pirmajame etape vyksta replikatyvioji transpozicija tarp replikono donoro, turinčio transpozoną, ir replikono, neturinčio šio judraus geno elemento. Iš abiejų replikonų susidariusi jungtinė DNR molekulė vadinama kointegratu. Jame donoro ir recipiento replikonai atskirti viena kryptimi orientuoto transpozono Tn3 kopijų (66 pav.), transpoziciją vykdo *tnpA* geno produktas – baltymas TnpA (transpozazė). Antras etapas – KSSR. Čia vyksta kointegrato skaldymo (replikonų atskyrimo) reakcija specifiniuose *res* saituose, kurie yra kiekvienoje Tn3 kopijoje. Šią reakciją vykdo transpozono koduojama rezolvazė, geno *tnpR* produktas. Reakcijos pabaigoje vėl susidaro du replikonai, iš kurių kiekvienas turi po Tn3 kopiją.



66 pav. Kointegrato susidarymas ir suskaidymas vykstant Tn3 transpozicijai. Pirmą etapą vykdo Tn3 transpozazė. Antras etapas – kointegrato suskaidymas yra KSSR, kurią vykdo judraus geno elemento koduojama rezolvazė. *bla* – β laktamazės genas

3.1.2.2. Plazmidžių segregacija

Kad plazmidės būtų stabiliai perduodamos iš motininės ląstelės dukterinėms, jos turi turėti mechanizmus, užtikrinančius jų paskirstymo patikimumą. Yra du pagrindiniai šių mechanizmų tipai: 1) daugiakopijinės plazmidės pasiskirsto atsitiktinai. Po to jų skaičius dukterinėse ląstelėse pasiekia įprastą lygį; 2) mažakopijinės plazmidės negali pasikliauti atsitiktinumu. Svarbų vaidmenį tokių plazmidžių paskirstyme į dukterines ląsteles atlieka ir konservatyvioji sait-specifinė rekombinacija. Šio mechanizmo dėka dimeriniai (arba multimeriniai) plazmidės dariniai, atsirandantys dėl homologinės rekombinacijos, suskaldomi iki atskirų plazmidžių. Pavyzdžiui, fagas P1 lizogeninėje būsenoje dažniausiai egzistuoja ne integruotas į bakterijos chromosomą, bet kaip dimerinės plazmidės. Prieš *E. coli* dalijantis, dimerinės plazmidės turi būti paverstos monomerinėmis, kurios vėliau patenka į dukterines ląsteles. Išskyrimą atlieka P1 baltymas Cre rekombinazė. Rekombinaciją jis vykdo specifiniuose *lox* saituose. Kitas pavyzdys – daugiakopijinė plazmidė ColE1. Ši plazmidė turi sait-specifinės rekombinacijos seką *cer*, kurioje vykstant KSSR multimerinės plazmidės paverčiamos monomerais – čia veikia Cer rekombinazė. Šį baltymą koduoja *E. coli* genai *xerC* ir *xerD*. Įdomu tai, kad pačiai bakterijai šių genų produktai reikalingi genomams, susidariusiems po replikacijos, atskirti. Tai vyksta *dif* saite, kurį atpažįsta šie baltymai. Taigi fagas ir čia pasinaudoja šeimininko rekombinacijos aparatu.

3.1.2.3. Ekscizija raidos metu

Jei aplinkoje trūksta azoto, tai kai kurių melsvabakterių (pavyzdžiui, *Anabaena*) ląstelės gali diferenciuotis į specializuotas ląsteles, heterocistas (67 pav.). Jos skirtos atmosferinio azoto fiksavimui. Aktyvūs genai, reikalingi šiam sudėtingam procesui užtikrinti, susidaro vykstant dviem KSSR reakcijoms. Jų metu išsikerpa DNR segmentai (11 kbp ir 55 kbp), įsiterpę į koduojamąsias atitinkamų genų sekas. Proceso dalyvaujančios rekombinazės vadinamos XistA ir XistR.



67 pav. *Anabaena* sp. heterocistos. dbpedia.org/resource/Heterocyst

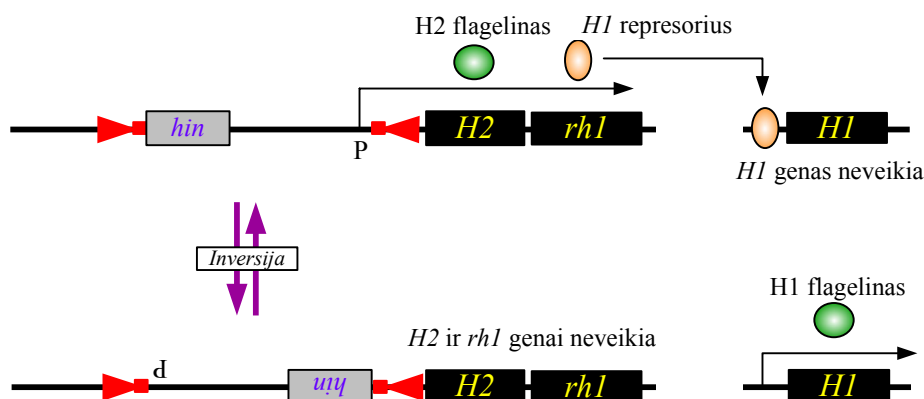
3.1.3. Inversijos sistemos

Šiuo atveju rekombinazės vykdo tam tikrų sekų inversijas. Dėl to pakinta genų raiška. Dažnai šio tipo rekombinacijos nulemia bakterijų patogeniškumo pokyčius.

3.1.3.1. Hin, Gin, Cin, Pin sistemos

Hin sistema veikia *Salmonella typhimurium* ir keičia žiuželio baltymus koduojančiųjų genų (*H1* ir *H2*) raišką (68 pav.). Tai padeda bakterijai apsaugoti nuo šeimininko imuninio atsako. Fage Mu vei-

kia Gin sistema, fage P1 – Cin sistema. Dėl jų sukeltų inversijų keičiamos fago ataugėlių savybės – tai leidžia fagui užkrėsti platesnį šeimininkų ratą. Pin sistemą koduoja *E. coli e14* segmentas, kuris greičiausiai yra defektyvus fagas.

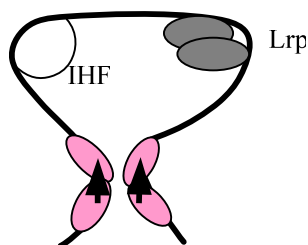


68 pav. Hin rekombinazės vykdoma rekombinacija *Salmonella typhimurium* genome. Dėl fragmento, esančio tarp sekų *hix* (raudoni trikampiai), inversijos veikia vienas ar kitas flagelino genas. H2 flagelino genas (*H2*) ir H1 flagelino geno represoriaus genas (*rh1*) pavaldūs tam pačiam promotoriui. Todėl, vykstant šių genų raiškai, H1 flagelino genas (*H1*) yra neveikus. Įvykus inversijai, H2 flagelino ir *H1* represoriaus genai tampa neveikliais, nes pašalinamas jų promotorius, todėl gali reikštis *H1* genas. www.mun.ca/.../Topics/Site_specific_Recomb.html

Hin, Gin, Cin ir Pin rekombinazės funkciškai yra vienodos ir gali pakeisti viena kitą. Jos labai panašios ir savo struktūra (aminorūgščių homologija – 60 proc.).

3.1.3.2. Fim sistema.

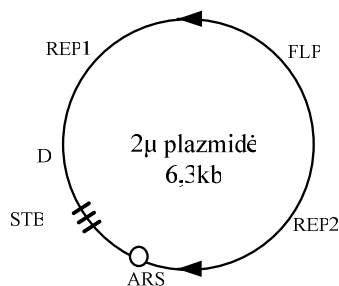
E. coli fimA genas koduoja svarbiausią fimbrijų baltymą. Šios ataugos būdingos daugeliui gramneigiamų bakterijų ir svarbios prisitvirtinti prie šeimininko ląstelių (Gally ir kt., 1993). Fimbrijos yra stiprus imunogenas. Todėl, siekdamas išvengti imuninio atsako, bakterijos vykdo fimbrijų tipų kaitą. Tokia vadinamoji fazių kaita vyksta labai įvairiai. Vienas iš mechanizmų – DNR segmento inversija. Fim sistemos veikla – vienas tokių atvejų. Inversijos metu kinta 314 bp DNR segmento, turinčio *fimA* promotorių, orientacija (69 pav.). Taigi šis segmentas *in cis* valdo *fimA* geno raišką. Todėl *fimA* genas veikia, kai minėtas 314 bp segmentas yra orientuotas viena kryptimi, ir neveikia, kai orientuotas kita kryptimi. Rekombinaciją (inversiją) valdo du genai *fimB* ir *fimE*. Ji gali vykti veikiant vienam iš jų. Inversijai reikalingi ir papildomi baltymai, pavyzdžiui, IHF. Ši KSSR sistema skiriasi nuo Hin tipo invertazių. FimB ir FimE baltymai panašūs (48 proc. aminorūgščių identiškos). Jie taip pat giminiški fago λ integrazės šeimos sait-specifinėms rekombinazėms.



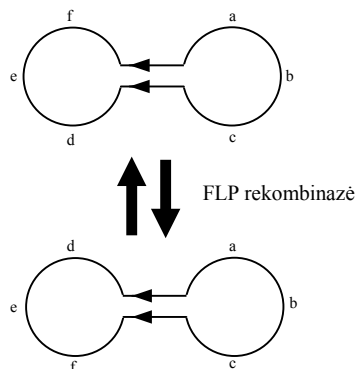
69 pav. Fim invertuojamo segmento sinapsės modelis (pagal I. Blomfield; www.kent.ac.uk/blomfield/). Sinapsei vykti, be invertuojamų segmentų (juodos rodyklės), FimB ar FimE baltymų (spalvoti ovalai iš abiejų segmentų pusių), dar reikalingi ir papildomi veiksniai: IHF bei Lrp. Manoma, kad šių baltymų jungimasis pašalina antrines DNR struktūras, trukdančias vykti rekombinacijai

3.1.3.3. FLP sistema

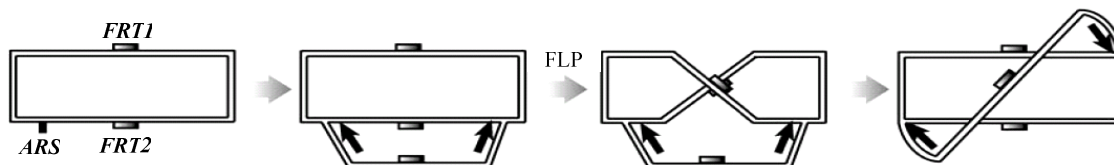
Kepimo mielių *S. cerevisiae* branduolyje dažnai randamos plazmidės, kurios vadinamos 2μ (70 pav.). Šios plazmidės yra ryškus „egoistinės“ DNR pavyzdys, jos nesuteikia šeimininkui jokios naudos, tačiau turi apie 50–100 savo kopijų. Taip pat jos turi KSSR sistemą, kuri invertuoja didelį plazmidės segmentą. Inversiją vykdo plazmidės koduojama FLP rekombinazė. Ji atpažįsta FRT saitą ir sukelia jame dvigrandį trūkį, skatindama rekombinaciją. Inversija reikalinga plazmidės kopijų padauginimui. Plazmidės kopijų skaičius negali būti padidintas įprastu būdu, nes eukariotų ląstelėse DNR replikacija vyksta tik vieną kartą ląstelės ciklo metu. Replikacijai vykstant nuo ARS (70 pav.), susidarytų tik dvi plazmidės kopijos vieno ciklo metu. Todėl čia panaudojamas sait-specifinės rekombinacijos mechanizmas. Plazmidė turi dvi invertuotas 599 bp sekas, kuriose yra rekombinacijos saitai FRT. Šiuose saituose, veikiant FPL, vyksta rekombinacija, invertuojamas plazmidės segmentas ir nuo ARS prasidėjusi dvikryptė replikacija perjungiamą į replikaciją pagal „besisukančio rato“ mechanizmą (71 ir 72 pav.). *FLP* geno raišką valdo *REP2*, *REP1* ir *D* genai. Jų koduojami baltymai slopina *FLP* raišką. Slopinimo efektyvumas priklauso nuo plazmidės kopijų skaičiaus. Kuo daugiau yra jos kopijų, tuo slopinimas stipresnis. Kai mielių ląstelėje yra mažai šios plazmidės kopijų, *FLP* geno veikla įjungiamą ir vyksta sait-specifinė rekombinacija.



70 pav. 2μ plazmidės genolapio schema. ARS (angl. *autonomous replication sequence*) – dvikryptės replikacijos pradžios vieta; *FLP* – sait-specifinės rekombinazės geno vieta. *REP2*, *REP1*, *D* – genai, valdantys *FPL* geno raišką; *STB* – trumpos vienakryptės pasikartojančios sekos, reikalingos plazmidžių paskirstymui į dukterines ląsteles mitozės ir mejozės metu. Rodyklėmis pažymėtos sekos, dalyvaujančios inversijoje www.sci.sdsu.edu/.../plasmids/yeast-plasmid.html



71 pav. FLP rekombinazės vykdoma inversija www.sci.sdsu.edu/.../plasmids/yeast-plasmid.html



72 pav. Dėl FLP vykdomos rekombinacijos tarp *FRT1* ir *FRT2* sekų nuo ARS prasidėjusi dvikryptė replikacija perjungama į replikaciją pagal „besisukančio rato“ mechanizmą, nes replikacijos šakutės nukreipiamos viena paskui kitą (pagal Ghosh ir kt., 2006)

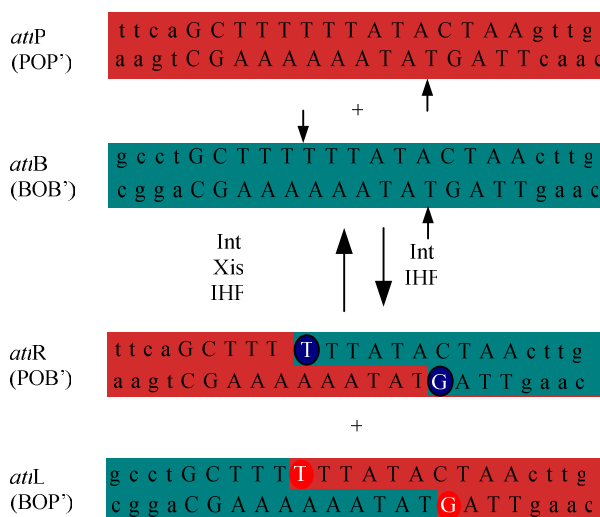
3.1.4. Konservatyviosios sait-specifinės rekombinacijos mechanizmai

Daugelio KSSR sistemų veikimas buvo pademonstruotas *in vitro* paprastuose druskų tirpaluose. Buvo išgryninti rekombinaciniai baltymai, o rekombinacijai svarbios sekos išaiškintos pasitelkus mutacinę analizę. Šių tyrimų pradžia galima laikyti 1975 m. paskelbtą H. A. Nesh'o straipsnį, kuriame buvo aprašyta *in vitro* atlikta sait-specifinė rekombinacija naudojant fago λ ir *E. coli* baltymų ekstraktus. Vėliau pavyko išgryninti šios sistemos baltymus, dalyvaujančius rekombinacijoje. KSSR mechanizmai panašūs. Rekombinacijos saitai kerpami substratinėje DNR tam tikrose vietose, kuriose abiejų saitų sekos yra vienodos. Trūkių galai sujungiami naujai, trūkio-sujungimo reakcijos vyksta per tarpinį kovalentinį baltymo (rekombinazės) ir DNR kompleksą. Rekombinazė kuri laiką išlieka kovalentiškai prisijungusi prie laisvų DNR galų. Taip išsaugoma fosfodiesterinės jungties energija. Taigi KSSR metu vyksta labai darnios skaldymo ir sujungimo reakcijos, kurių metu DNR neprarandama ir nauja nesintetinama. Jų metu nedalyvauja joks makroerginis veiksnys.







3.1.4.1. Reikalavimai substratinei DNR

KSSR sistemos skiriasi savo DNR substratais, pavyzdžiui, rezolvazės ir invertazės sąveikauja tik su superspiralizuota DNR, turinčia tik tam tikra tvarka organizuotus rekombinacijos saitus: rezolvazėms jie turi būti toje pačioje DNR molekulėje, orientuoti ta pačia kryptimi, invertazėms – toje pačioje DNR, tačiau orientuoti priešingomis kryptimis. Tačiau yra ir išimčių, pavyzdžiui, kai kurios šio tipo rekombinazės (pavyzdžiui, Cre, FLP) gali sąveikauti su bet kokios konfigūracijos rekombinacijos saitais, esančiais toje pačioje DNR, tiek skirtingose DNR molekulėse arba orientuotais atsitiktine tvarka

toje pačioje molekulėje, taip pat joms nereikia superspiralizuotos DNR. Int baltymo atveju rekombinacijos saitai gali būti bet kokios konfigūracijos, tačiau *attP* seka turi būti superspiralizuota. Kitiems *att* saitams rekombinacijos metu superspiralizacija nebūtina. Visi rekombinacijos saitai panašūs tuo, kad turi vienodas sritis, kuriose ir vyksta grandinių mainai. Kiekvienas po rekombinacijos susidaręs saitas-hibridas turi hibridinį DNR fragmentą, kuriame kiekviena DNR grandinė yra skirtingos kilmės (susidarė dėl dviejų skirtingų DNR galų sujungimo). Ši sritis rekombinacijoje yra esminė. Homologija joje būtina. Pavyzdžiui, *attP* ir *attB* saitų konservatyvus rajono ilgis siekia 15 bp, o persidengiančių sekų ilgis hidridiniame saite – 6 nt (73 pav.). Tokį persidengimo (hibridinį) rajoną supa priešinga kryptimi orientuotos atpažinimo sekos. Prie jų jungiasi rekombinacijos baltymai. Rekombinacijos saitai pagal savo sandarą gali būti skirstomi į paprastus ir sudėtingus. Paprastų saitų atveju rekombinacijai vykti pakanka informacijos, esančios persidengimo rajone bei atpažinimo sekose. Šio tipo saitams priklauso *attB*, *lox*, *FRT* (74 pav.). Antrojo tipo saitų struktūra daug sudėtingesnė, pavyzdžiui, Hin sistemos saitams būdinga ne tik persidengimo rajonas bei atpažinimo sekos, tačiau ir taip vadinamasis rekombinacijos enhanceris. Prie pastarosios sekos jungiasi baltymas Fis.



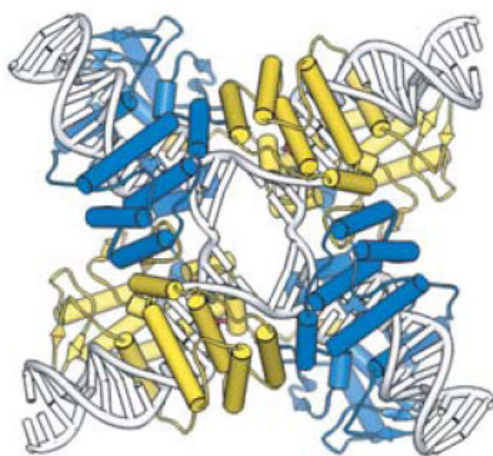
73 pav. Bakteriofago λ integracijai būtinas jo paties koduojamas Int baltymas ir bakterijos IHF baltymas. Jie jungiasi tam tikrose vietose prie DNR sekų, vadinamų *attP* ir *attB*. Abu rekombinacijos saitai (*attP* ir *attB*) turi konservatyvias 15 bp sekas. Po rekombinacijos susidaro *attR* ir *attL* saitai, kurie yra *attP* ir *attB* hibridai (pagal Weisberg ir Landy, 1983)

Seka (saitas)		Baltymas
<i>lox</i>		Cre
<i>FRT</i>		FLP
<i>attB</i>		Int
<i>attP</i>		Int
<i>gix, hix</i>		Gin, Hin
<i>res</i>		rezolvazė

74 pav. KSSR rekombinazių atpažinimo sekų struktūra. Visose sekose yra vietos (viena prieš kitą nukreiptos rodyklės), prie kurių jungiasi rekombinazės. Šios atpažinimo vietos supa „persidengimo“ rajoną, kuriame vyksta DNR trūkiai ir grandinių mainai (neužtušuoti stačiakampiai; dydis – nuo 2 bp iki 8 bp). Kai kurie rekombinacijos saitai turi tik rekombinazių prisijungimo vietas (*lox*, *FRT*, *attB*), o kiti turi vietas, prie kurių jungiasi papildomi baltymai (IHF – užtušuoti stačiakampiai; Fis – apskritimai; Xis – X). (Pagal Sadowski, 1993)

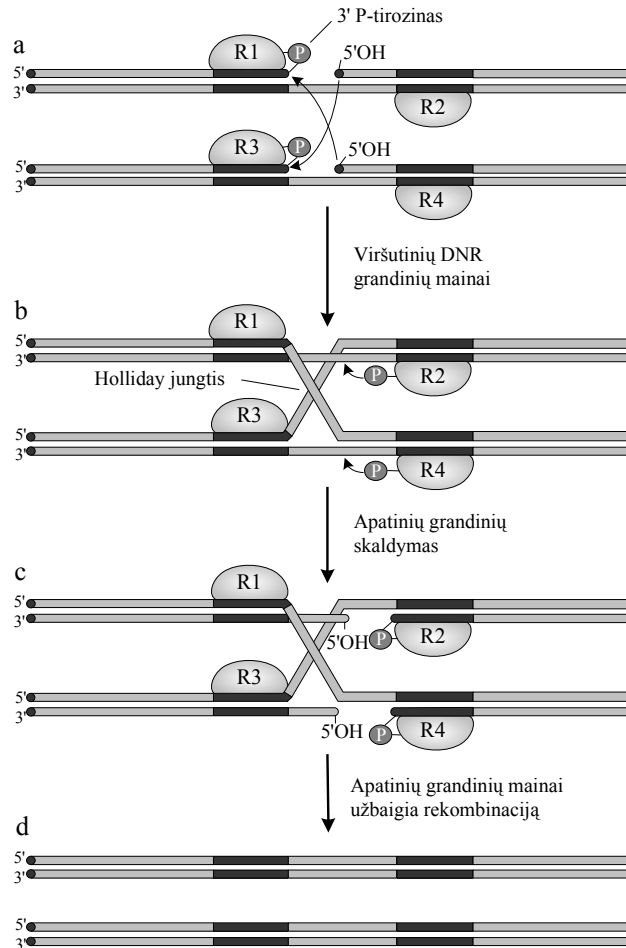
3.1.4.2. Rekombinacijos baltymai

Rekombinazės turi katalizinius centrus, vykdančius grandinių mainus. Prisijungę prie rekombinacijos saito atpažinimo sekų, jos tam tikrose vietose skaldo DNR, sudarydamos lipnius galus. Reakcijos metu susidaro laikina kovalentinė jungtis tarp rekombinazės subvienetų ir DNR molekulės galų. Priklausomai nuo baltymo struktūros, trūkio chemijos ir grandinių mainų mechanizmų, iki šiol žinomas sait-specifines rekombinazes galima skirstyti į integrazės ir rezolvazės/invertazės šeimas (Sadowski, 1993). Šie pavadinimai gana sąlyginiai, nes į didžiulę integrazės šeimą patenka ir kai kurios invertazės (FLP, FimB, FimE ir kt.), ir rezolvazės (Cre, XerCD ir kt.). Todėl dabar integrazės šeimos baltymai vadinami tirozino rekombinazėmis, o rezolvazės šeimos – serino rekombinazėmis (Grindley ir kt., 2006). Skirtingų šeimų rekombinazės neturi jokio panašumo. Jų vykdomų grandinių mainų reakcijos taip pat skiriasi. Todėl manoma, kad skirtingų šeimų rekombinazės atsirado ir evoliucionavo nepriklausomai viena nuo kitos.



75 pav. Cre rekombinazės ir DNR sinapsinis kompleksas. Keturi Cre baltymo subvienetai laiko rekombinacijos tarpinį produktą su Holidėjaus jungtimi beveik kvadratinėje plokštumoje. Aktyvūs subvienetai nuspalvinti geltonai, neaktyvūs - mėlynai (pagal Grindley ir kt., 2006)

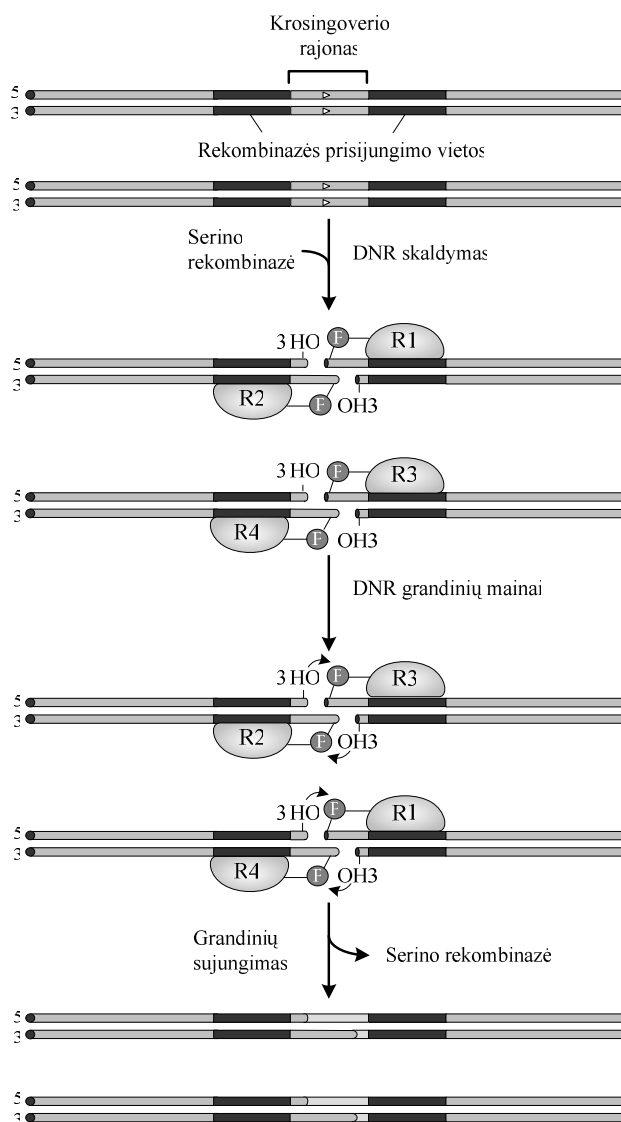
Tirozino rekombinazių šeima. Tyr rekombinazės labiausiai paplitusios prokariotuose, tačiau jų randama ir eukariotuose: grybuose, žiuželiniuose, net kai kuriose sudėtingesnių eukariotų retrotranspozonų šeimose. Kaip rodo PSI-BLAST paieškos rezultatai, joms giminiškų baltymų yra apie 1000 – tai fagų ir transpozonų (λ , P2, P22, ϕ 21, ϕ 80, HP1, Tn916, Tn1545) integrazės, taip pat kai kurios rezolvazės (Cre, XerCD) ir invertazės (FimBE, FLP). Šiuos baltymus sudaro apie 300–400 aminorūgščių, jie panašiai skaldo DNR molekules. Visi jie turi bendrą katalizinį domeną su panašių sekų motyvais. Trūkių vietoje susidaro 5'-OH viengrandžiai galai iš 6–8 nukleotidų. Baltymas kurį laiką būna prisitvirtinęs prie 3' galo fosfotirozinine jungtimi. Integrazės panašios ir savo struktūra. Naudojant X spindulių kristalografiją, sužinota nemažai tirozino rekombinazių detalių. Iširtos Cre, Flp ir λ Int sinapsinių kompleksų struktūros. Šie baltymai sudaro C formos apkabas apie DNR substratą (75 pav.). Ypač konservatyvus šių baltymų karboksilinis domenas, kuriame esančios aminorūgščių liekanos dalyvauja rekombinazės katalizuojamoje grandinių mainų reakcijoje. Labai svarbus į katalizinio cento sudėtį įeinantis Tyr. Greta jo yra konservatyvus aminorūgščių motyvas RKHRH. Be tirozino, dar labai svarbios Arg ir His. Mutacijos šias aminorūgštis koduojamojoje DNR užkerta kelią rekombinacijos procesui, tačiau neturi įtakos prisijungimui prie DNR. Už pastarąją reakciją atsakingas NH₂ galas, kuris nekonseratyvus. Nustatyta, kad Tyr342 λ Int baltyme (40 kDa) yra vieta, kuria reakcijos metu baltymas prisijungia prie DNR molekulės 3' galo. Šis baltymas turi katalizinį domeną, vadinamą c170 (aminorūgščių liekanos nuo 170 iki 356). Nepaisant sekų panašumo, tirozino šeimos baltymai yra dviejų tipų. Vieno jų subvieneto Tyr yra nukleofilas ir skaldo DNR, esančią greta kito subvieneto (trans kirpimas, nepavaizduota). Kitais atvejais Tyr atakuoja seką toje DNR grandinėje, prie kurios prisitvirtinęs jį nešantis subvienetas (76 pav.). Beveik prieš keturis dešimtmečius (1971) enzimologai pastebėjo, kad tirozino rekombinazės vykdo mainus, nesukeldamos tikrų dvigrandžių trūkių. Iš pradžių mainai vyksta tarp „viršutinių“ skirtingų dupleksų grandinių, po to tarp „apatinių“ šių DNR molekulių grandinių. Tai galbūt leidžia išvengti galimų šalutinių šios reakcijos produktų susidarymo.



76 pav. Tirozino rekombinazių vykdomi grandinių mainai (pagal Watson ir kt., 2004). Rekombinacija prasideda, kai kiekvieno DNR duplekso viena iš grandinių nukleofiliškai atakuojama prie jos prisitvirtinusio rekombinazės subvieneto tirozino (neparodyta): A – viršutinės DNR grandinės yra skaldomos, tarp jų 3' galo ir baltymo susidaro kovalentinė fosfotirozino jungtis ir sukuriama laisvi 5'-OH galai. Vykstant šiai reakcijai, DNR fosfodiesterinės jungties energija perduodama fosfotirozinui. Kitas etapas – viršutinių grandinių mainai. Jie vyksta, kai laisvi 5'-OH galai atakuoja kito mainuose dalyvaujančio DNR duplekso 3' fosfotirozino jungtis; B – susidaro Hollidėjaus jungtis. Komplexas gali izomerizuotis, neaktyvūs subvienetai virsti aktyviais, ir atvirkščiai. Tai leidžia visą vyksmą pakartoti jau dalyvaujant apatinėms DNR dupleksų grandinėms ir prie jų prisijungusiems rekombinazės subvienetams, kurių tirozino OH grupės vykdo fosfodiesterinių jungčių nukleofilinę ataką; C – susidaro naujos fosfotirozino jungtys ir laisvi apatinių grandinių 5'-OH galai, kurie nukleofiliškai atakuoja *trans* padėtyje esančias fosfotirozino jungtis; D – tai atlaisvina rekombinazės nuo DNR ir užbaigia sait-specifinę mainų reakciją

Serino rekombinazių šeima. Ši šeima gana nevienalytė, nes jai priklausantys baltymai labai skiriasi savo dydžiu (nuo 180 iki 800 aminorūgščių liekanų). Daugiausia informacijos apie šių baltymų savybes gauta tiriant $\gamma\delta$ rezolvazę. Šis baltymas sudarytas iš 183 aminorūgščių, o jo katalizinis domenas (apie 100 aminorūgščių) yra N gale. Serino nukleofilas yra 10-oje padėtyje nuo N galo. Determinantai, atsakingi už DNR sekų atpažinimą, yra karboksiliniame baltymo gale. $\gamma\delta$ rezolvazė tirpale yra dimerinis baltymas. Nors gerai iširtos Gin ir Hin rekombinazės yra panašaus dydžio, tačiau kiti šios šeimos baltymai daug didesni. Kai kurie jų turi sekų atpažinimo domeną N gale. Vis dėlto serino rekombinazės turi nesunkiai atpažįtamą katalizinį domeną, kuriame yra serino nukleofilas, sudarantis rekombinazės aktyvųjį saitą. Dažniausiai mainų mechanizmai tiriami panaudojant Tn3 ir $\gamma\delta$ rezolvazes bei Hin

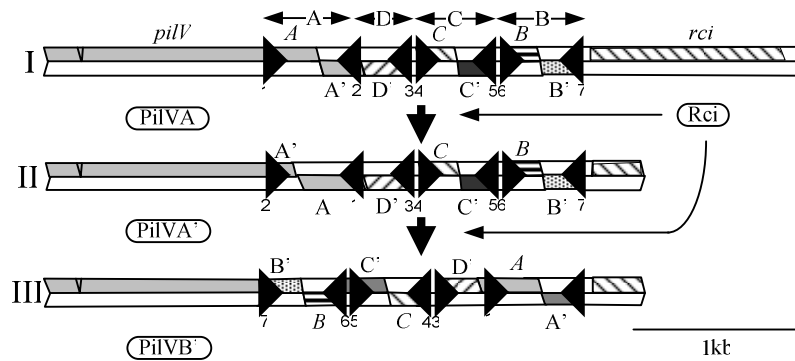
ir Gin invertazes. Grandinių mainai vyksta sinapsiniame komplekse, kurį sudaro keturi rekombinazės subvienetai ir du krosingoverio rajonai (77 pav.). Susidariusi sinapsė aktyvuoja rekombinazės subvienetus skaldyti krosingoverio rajonus ir sudaryti dvigrandžius DNR trūkius. Ši reakcija kovalentiškai sujungia keturis rekombinazės subvienetus per fosfoserino jungtis su DNR grandinių 5' galais ir sukuria laisvus 3'-OH galus. Skaldymas vyksta labai darniai, jį atlieka rekombinazės, esančios *cis* padėtyje. Kai krosingoverio vietoje DNR molekulės suskaldomos, laisvi DNR galai pergrupuojami į rekombinantinę konfigūraciją. DNR topologijos tyrimai parodė, kad vyksta vienos sinapsinio komplekso pusės pasisukimas kitos atžvilgiu 180°. Įvykus subvienetų mainams, laisvi 3'-OH galai atakuoja 5' fosfoserino jungtis ir susidaro rekombinantinės DNR molekulės.



77 pav. Serino rekombinazių vykdomi DNR grandinių mainai (pagal Watson ir kt., 2004)

3.1.5. Šaflonai

Šaflonai (angl. *shufflons*) pirmiausia buvo atrasti konjugatyvioje plazmidėje R64 (str^r , tet^f). Tai daugiasaitės inversijos sistemos, kuriose yra keletas invertuojamų genomo rajonų (78 pav.).



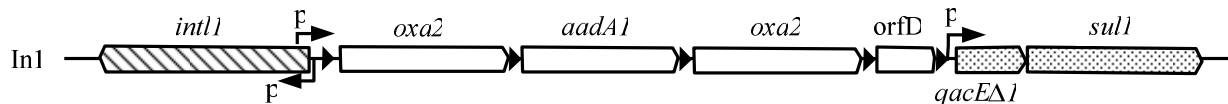
78 pav. Septynių *pilV* genų persitvarkymai R64 šaflone. Plačiomis rodyklėmis pažymėti 19 bp rekombinacijos saitai. *Rci* – sait-specifinė rekombinazė, vykdanči plazmidės rajonų A, B, C, D inversiją. *PilVA*, *PilVA'*, *PilVB'* – įvairūs *PilV* baltymo variantai (pagal Komano, 1999)

R64 plazmidė nulemia dviejų tipų pilių susidarymą: storo standaus ir plono lankstaus. Storas pilius reikalingas konjugacijai ant kieto paviršiaus ir skystojoje terpėje, o plonas – tik skystojoje terpėje. Šaflonai sudaryti iš šešių-septynių rekombinacijos saitų ir greta esančio *rci* geno, koduojančio integracijos šeimos rekombinazę. Rekombinacijai nereikalingi IHF ir Fis baltymai, nes ji normaliai vyksta ir *ihfA*, *ihb*, ir *fis* mutantuose. Tačiau reikalingi kiti pagalbiniai baltymai: HU-1 ir HU-2. Šaflono DNR inversija labai sulėtėja *hupA*/*hupB* mutantuose. Dėl inversijos kinta *PilV* baltymo C galas, N galas yra pastovus (78 pav.). Invertuojami rajonai apsupti septynių 19 bp dydžio rekombinacijos saitų. A, B, C, D invertuojami rajonai skiriasi savo dydžiu ir DNR sekomis. Atsitiktinė rekombinacija tarp rekombinacijos saitų lemia įvairių plazmidės izomerų susidarymą. *PilV* baltymo struktūros pokyčiai lemia recipientą, į kurį konjugacijos būdu skystojoje terpėje bus perduota R64 plazmidė. Recipientais gali būti *E. coli* K12, *E. coli* B, *E. coli* C, *S. typhimurium*, *Shigella flexneri* kamienai.

Po šaflonų atradimo buvo nustatytos dar kelios daugiasaitės inversijos sistemos, pavyzdžiui, Min sistema atrasta bakteriofagui P1 giminiškoje *E. coli* 15T plazmidėje. 3,5 kbp inversijos rajone yra šeši rekombinacijos saitai (*mix*). Rekombinaciją tarp bet kurių dviejų *mix* saitų vykdo Min rekombinazė. Manoma, kad rekombinacijos sukelti genomo persitvarkymai sąlygoja bakteriofago šeimininkų įvairovę. Kitos panašios sistemos buvo aptiktos kai kuriuose patogeniškuose mikroorganizmuose. Šios sistemos padeda jiems apsaugoti nuo šeimininko imuninio atsako, nes lemia antigenų įvairovę.

3.1.6. Integronai

Paprastos integracijos-ekscizijos sistemos (pavyzdžiui, fago λ) įterpia į jiems specifiskus *att* saitus tik vieną savo genomo kopiją. O DNR molekulės, vadinamos integronais, turi rekombinacijos saitą (*attI*), į kurį gali įsiterpti daug skirtingų arba tokių pačių genetinių elementų, vadinamų genų kasetėmis. Genų kasetės – tai nedideli genetiniai elementai, dažniausiai sudaryti iš atsparumo antibiotikui geno ir 59 bazių elemento (*attC* saito). Todėl integronai – tai sait-specifinės rekombinacijos sistemos, skirtos genų kasetių sugavimui, mobilizacijai ir jose esančių genų raiškos užtikrinimui. Svarbiausios integrono dalys – sait-specifinės rekombinazės genas (*intI*) ir rekombinacijos saitas *attI*. Į šį saitą būna įsiterpusios genų kasetės (79 pav.).

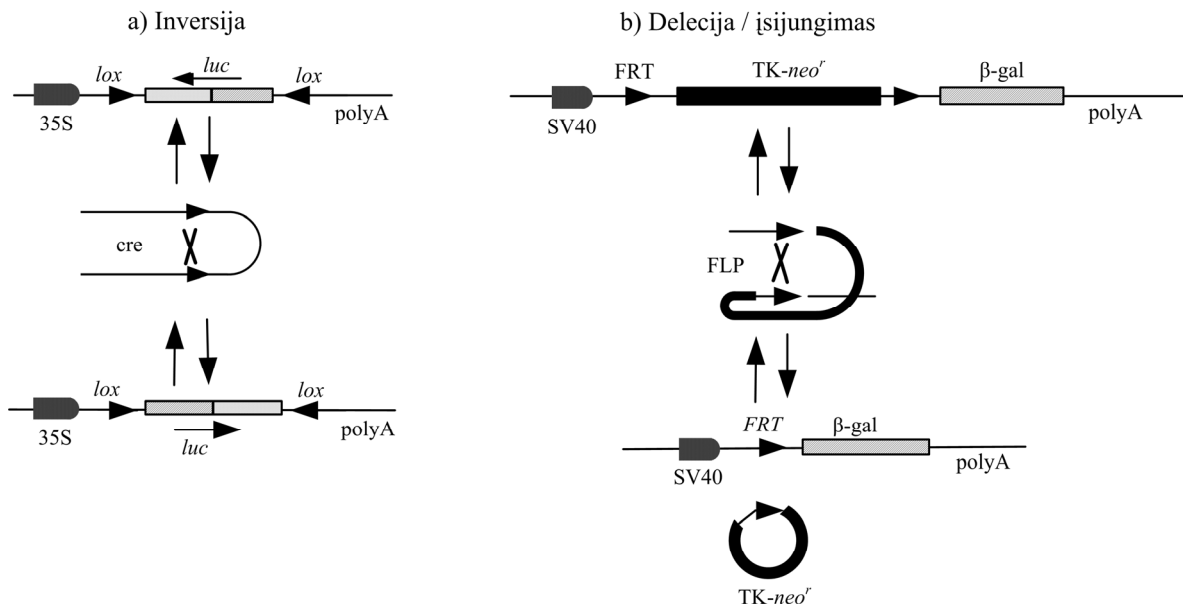


79 pav. Integrono In1 struktūra. *intI1* – integrazės genas. Neužtamsintas trikampis – *attI* saitai, užtamsinti trikampiai – *attC* saitai (59-bazių elementai). Sulenktos rodyklės – promotorius. Stačiakampio pavidalo rodyklės – genai (pagal Komano, 1999)

Integrono koduojama rekombinazė vykdo rekombinaciją tarp arčiausiai esančio rekombinacijos saito *attI* ir genų kasetčių saito *attC*. Daugelis *attC* sekų skiriasi. Jų dydis gali įvairuoti nuo 57 bp iki 141 bp. Panašumas yra tik saitų pakraščiuose: kairėje pusėje yra RYYYAAC, dešinėje – G↓TTRRRY sekos. R – purinai, Y – pirimidinai, ↓ – vieta, kurioje vyksta grandinių skaldymas. *attI* saite yra dvi viena kryptimi orientuotos šios sekos motyvo kopijos. Nedideliu dažniu genų kasetės gali išsikirti iš integrono ir egzistuoti kurį laiką savarankiškai. Genų kasetėse randama per 60 atsparumo antibiotikams genų. Integronai, turintys daug kasetių, lemia bakterijų atsparumą daugeliui antibiotikų. Pavyzdžiui, choleros sukėlėjo *Vibrio cholerae* genome nustatytas milžiniškas integronas (126 kbp) turi 179 genų kasetes. Integronai nėra judrieji genomo elementai – tai KSSR sistemos, kurių koduojama rekombinazė priklauso integrazių šeimai ir konservatyviuose domenuose turi labai svarbias Arg, His, Arg ir Tyr liekanas. Integronai labai svarbūs horizontaliam genų pernešimui – tai savotiškos natūraliai egzistuojančios genų klonavimo ir raiškos sistemos. Jų dėka bakterijose plinta atsparumo genai. Kartais juose aptinkami ir kai kurie kiti genai (metabolizmo, restrikcijos-modifikacijos). Integronų egzistavimas svarus argumentas, palaikantis teoriją, kad bakterijų genomai sudaryti iš atskirų modulių.

3.1.7. Konservatyviosios sait-specifinės rekombinacijos panaudojimas genų inžinerijoje

Trys KSSR rekombinazės plačiausiai naudojamos genetiniams pertvarkymams atlikti heterologinėse sistemose – tai 38 kDa Cre rekombinazė, atpažįstanti 34 bp *lox* sekas, 43 kDa FLP rekombinazė, atpažįstanti 24 bp *FRT* rekombinacijos saitus, ir R rekombinazė, koduojama mielių *Zygosaccharomyces rouxii* plazmidės pSR1, bei atpažįstanti *RS* sekas. Visi šie baltymai priklauso tirozino rekombinazių šeimai ir gali sąveikauti su rekombinacijos saitais, esančiais įvairiose būsenose (toje pačioje DNR, skirtingose DNR, žiedinėje ar linijinėje DNR, orientuotais ta pačia arba priešinga kryptimis). Rekombinacija tarp dviejų invertuotų rekombinacijos saitų sukels tarp jų esančios DNR inversiją. Jeigu saitai orientuoti ta pačia kryptimi, tai tarp jų esanti DNR bus pašalinta ir sudarys žiedo pavidalo molekulę. Atvirkščias šiam procesui būtų žiedinės DNR, turinčios KSSR rekombinazės saitą, įsijungimas į linijinę DNR (80 pav.). Tai galima panaudoti specifiniams lokusams chromosomoje žymėti ir pertvarkyti. Jeigu rekombinacijos saitai bus dviejose skirtingose DNR chromosomose, tai vyks reciprokinė rekombinacija ir chromosomos pečių translokacijos. Todėl šios sistemos panaudojamos chromosomoms pertvarkyti.



80 pav. KSSR panaudojimas kryptingiems DNR persitvarkymams sukelti. Cre ir FLP – rekombinazės; *lox* ir *FRT* – jų atpažįstami rekombinacijos saitai; *luc* ir β -gal reporteriniai luciferazės ir β -galaktozidazės genai. *TK-neo^r* – timidino kinazės ir neomicino fosfotransferazės genai

Šie rekombinacijos procesai vyksta nukleotido tikslumu, po reakcijos išlieka aktyvūs saitai. Todėl kiekvienas toks procesas yra grįžtamas ir reakcijos produktai yra pusiausvyroje. Siekiant užkirsti kelią grįžtamajai reakcijai, rekombinazės geno raiška perduodama indukuojamam promotoriui. Sukurta ir daugiau būdų šiai problemai spręst, pavyzdžiui, vienas iš rekombinacijos saitų įterpiamas tarp rekombinazės geno ir jo promotoriaus. Šiuo atveju pageidaujama rekombinacija atskiria rekombinazės geną nuo jo raišką skatinančių sekų.

Taigi aptartos rekombinacijos sistemos, priklausomai nuo rekombinacijos sekų padėties, eksperimentiškai leidžia sukelti pageidaujamas inversijas, delecijas, įterpti ar perkelti į norimą vietą DNR fragmentus.

3.2. Transpozicija

Transpozicijos reiškiny, anksčiau priskirtas sait-specifinei rekombinacijai, dabar vertinamas kaip savitas rekombinacijos procesas, besiskiriantis nuo konservatyviosios sait-specifinės rekombinacijos. Transpoziciją vykdo judrieji genomo elementai (JGE), kurie koduoja rekombinazę, vadinamą transpozaze (arba integraze). Kai kurie JGE neturi šio baltymo geno arba dėl mutacijų jį yra praradę. Jeigu tokių elementų galinės sekos nepažeistos, tai jie gali pasinaudoti svetima transpozaze (integraze), kurią koduoja giminiški JGE, esantys *trans* padėtyje. Vykstant transpozicijai, nesusidaro kovalentinė jungtis tarp rekombinazės ir suskaldytos DNR galų, rekombinacija čia nėra reciprokinė, tarp judraus genomo elemento ir sekos taikinio nėra jokios homologijos, transpozicijos metu vyksta didesnė ar mažesnė DNR sintezė.

JGE – apibrėžtos struktūros DNR molekulės, galinčios šokinėti iš vieno lokuso į kitą tiek tame pačiame genome, tiek tarp skirtingų genomų. Transpozonų atradimas glaudžiai susijęs su nestabilių mu-

tacijų, sukeliančių margumą augaluose, tyrimais. Jomis domėjosi H. De Vries (1905) ir padarė išvadą, kad jų perdavimas palikuonims nepavaldus Mendelio dėsniams. Daug nuodugniau šių požymių paveldėjimą tyrė kukurūzų genetikas R. A. Emerson'as (Fedorof, 2000). Pigmentacijos pokyčius jis aiškino inhibitoriaus, slopinančio pigmentacijos geną, veikimu bei šio inhibitoriaus praradimu. Tačiau patį reiškinį ištyrė ir transpozonus atrado 1946–1950 m. B. McClintock kukurūzuose (McClintock, 1950; Fedorof, 2000). Ketvirtojo dešimtmečio pradžioje ji pradėjo tyrinėti chromosomų trūkius ir susidomėjo kukurūzų lokusu, esančiu netoli 9 chromosomos centromeros, ir kurį pavadino *Dissociation (Ds)*. Tokį keistą pavadinimą lokusui suteikė todėl, kad jis galėdavo atskirti chromosomos trumpąją petį, t.y. sukeldavo savotišką chromosomos „disociaciją“. Tačiau ji greitai įsitikino, kad chromosomos disociacijai reikalingas dar vienas lokusas, kurį pavadino *Activator (Ac)*. 1948 m. ji galutinai įsitikino, kad *Ds* keičia savo padėtį chromosomoje. Ryšys tarp *Ds* transpozicijos ir grūdų margumo paaiškėjo, kai McClintock pradėjo tirti *C* lokuso, atsakingo už grūdų pigmentaciją, paveldėjimą palikuonių kartose. Naudodama citologinius ir genetinius metodus, ji nustatė, kad nestabilaus *c-m1* alelio atsiradimas sutampa su *Ds* transpozicija iš ankstesnės jo vietos į naują vietą *C* lokuse. Reversija atsiradavo, kai *Ds* išnykdavo iš lokuso. Ji padarė išvadą, kad margumas atsiranda dėl dažnos *Ds* transpozicijos augalo raidos metu. Atradus transpozicijos reiškinį, patvirtinti ir Emerson'o bei Rhoades stebėjimai. 1983 m. už šiuos darbus B. McClintock gavo Nobelio premiją. Prokariotuose JGE buvo atrasti 1963 m., kai L. Taylor aprašė prokariotų elementą, galintį sukelti mutacijas, todėl pavadintą *Mu (Mutator)*. Kaip ir λ , *Mu* lizogenizuoja *E. coli* ląsteles, tačiau skirtingai nuo λ neturi *att* saito bakterijos chromosomoje. Dėl šios priežasties *Mu* įsiterpia į šeimininko genomą beveik atsitiktinai ir sukelia mutacijas. Nustatyta, kad apie 1–2 proc. *Mu* lizogenizuotų ląstelių turėjo auksotrofines mutacijas. 1970 m. pradžioje atrasti transpozonai. Taip jie buvo pavadinti dėl gebėjimo pernešti (lot. *transpositio* – pernešimas) požymį (pavyzdžiui, atsparumą antibiotikams) iš vieno lokuso į kitą. JGE labai skiriasi savo struktūra, sudaryti iš DNR ir RNR. Dažnai naudojamas transpozonų skirstymas į dvi klases: pirmosios klasės transpozonai plinta dėl savo genomo RNR kopijų, kurios atvirkštinės transkripcijos metu paverčiamos cDNR. Šiuos elementus dar galima grupuoti į:

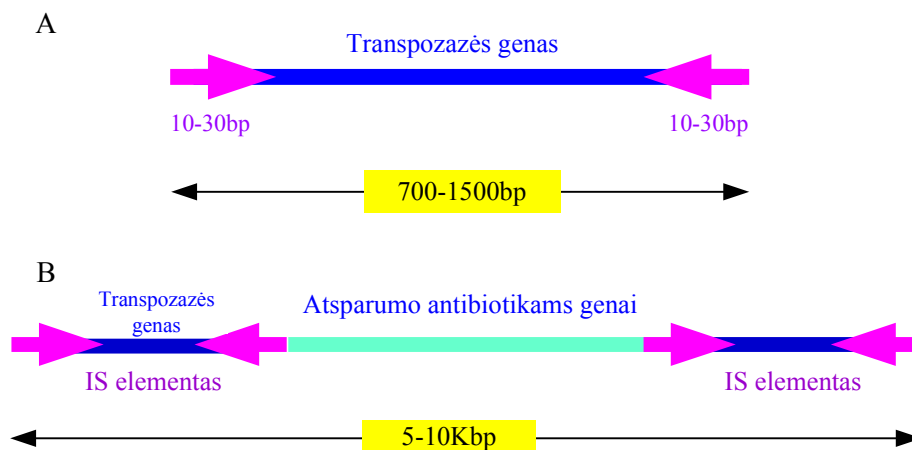
1. Retrovirusus.
2. Retrotranspozonus.
3. Retropozonus (LINEs ir SINEs).

Antrosios klasės transpozonai neturi RNR stadijos. Jie vadinami paprasčiausiai – transpozonais.

Pastarasis JGE skirstymas yra patogus, tačiau toli gražu neatspindi egzistuojančios įvairovės. Dėl to dar naudinga susipažinti su N. Kleckner pasiūlyta klasifikacija, kuria remiantis prokariotų ir eukariotų elementai skirstomi į keturias grupes.

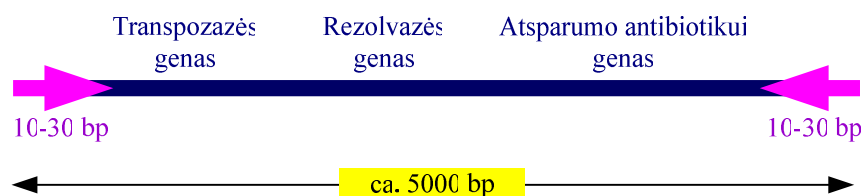
3.2.1. Prokariotų JGE klasifikacija ir struktūra

Pirma klasė. Priklauso įterptinės sekos (IS) ir iš jų sudaryti sudėtiniai transpozonai. Įterptinės sekos yra ~ 700 – 1500 bp. Savo galuose turi invertuotas sekas ir bent vieną geną, koduojantį transpozicijai reikalingą baltymą transpozazę. IS elementų žinoma daugiau nei 17 šeimų, kuriose yra per 500 JGE. Sudėtiniai transpozonai sudaryti iš dviejų IS ir tarp jų esančių genų, todėl jie yra didesni – 5 – 10 kbp. Aktyvią transpozazę koduoja vienas iš IS (81 pav.).



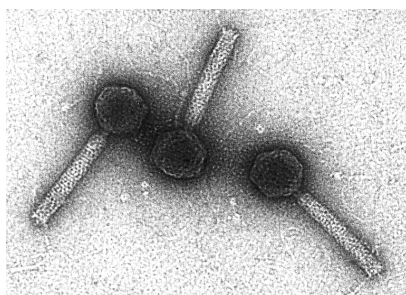
81 pav. A – IS elemento sandaros schema; B – sudėtinio transpozono sandaros schema

Antra klasė. Jai priklauso Tn3 ir jam giminiški transpozonai. Skirtingai nuo sudėtinių transpozonų šie patys koduoja savo transpozazę ir kitas savybes (82 pav.). Savo galuose šie JGE turi invertuotas pasikartojančias sekas. Tn3 turi tris genus: transpozazės, rezolvazės ir β-laktamazės.



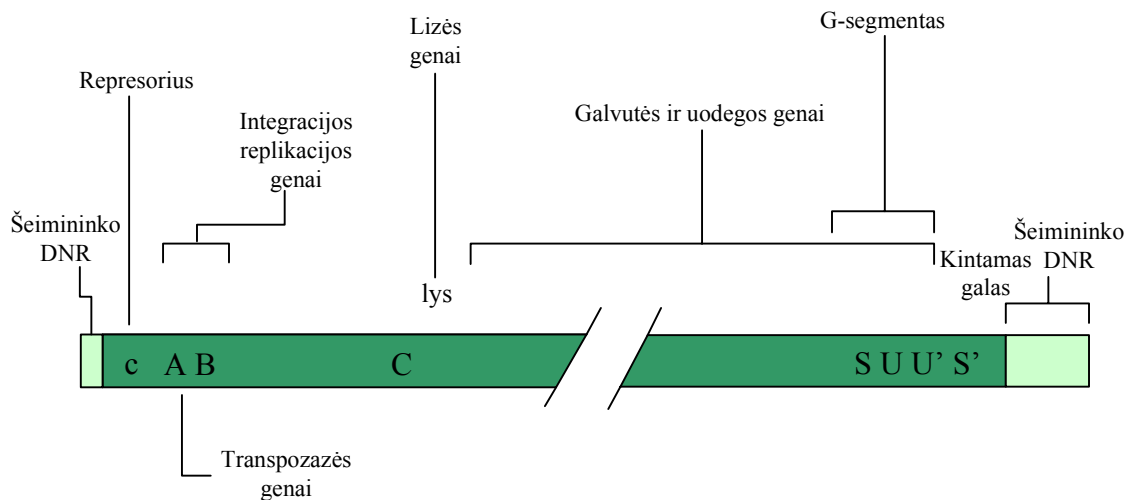
82 pav. Tn3 giminiškų transpozonų struktūros schema

Trečia klasė. Šiai JGE grupei priskiriami „šokinėjantys“ bakteriofagai (Mu, D108). Mu yra didelis, DNR turintis virusas, sudarytas iš briaunainio pavidalo galvutės, spiralinės struktūros uodegos ir šešių uodegos fibrilių (83 pav.). Lizogeninėje būsenoje fagas atsitiktinai įsiterpia į bakterijos genomą konservatyviosios transpozicijos būdu (žr. toliau). Lizės metu jis vykdo replikacinę transpoziciją.



83 pav. Bakteriofagas Mu www.biochem.wisc.edu/.../inman/empics/virus.htm

JGE paplitę visose gyvose būtybėse ir nuo jų didele dalimi priklauso šių organizmų genomo plastiškumas. Mu struktūra gana sudėtinga, nes jis, be transpozazės geno, turi daug kitų genų, užtikrinančių jo, kaip bakteriofago, egzistavimą (84 pav.).



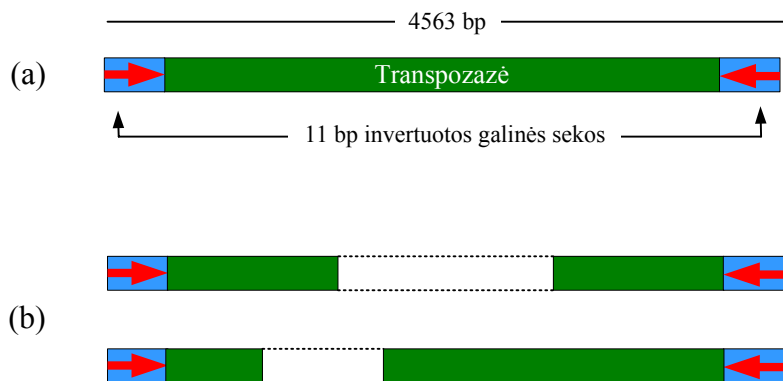
84 pav. Bakteriofago Mu genetinės organizacijos schema. G segmentas, priklausomai nuo savo orientacijos, lemia bakteriofago uodegos fibrilių sandarą ir šeimininkų įvairovę

Ketvirta klasė. Jai priskiriami JGE, nepatenkantys į anksčiau išvardytas klases. Jie labai skiriasi tarpusavyje ir todėl jiems reikalinga atskira klasifikacija. Gerai ištirtas Tn7 transpozonas. Jis koduoja penkis transpozicijai reikalingus baltymus: TnsA, TnsB, TnsC, TnsD, TnsE – dėl šių baltymų transpozicija vyksta dvejopai, skiriasi transpozono įsiterpimo vietos. Esant TnsD, Tn7 įsiterpia į chromosomoje esantį *attTn7* saitą, o esant TnsE – į tam tikrų plazmidžių replikonus. TnsC baltymas yra transpozicijos reguliatorius: jis, sąveikaudamas su TnsA ir TnsB, aktyvuoja transpozazę ir labai svarbus įsiterpimo vietai parinkti. TnsA ir TnsB tiesiogiai dalyvauja skaldant ir sujungiant DNR. TnsB turi panašumo su retrovirusų integravimais, o TnsA yra giminiškas restrikcijos endonukleazėms.

3.2.2. Eukariotų judrieji genomo elementai

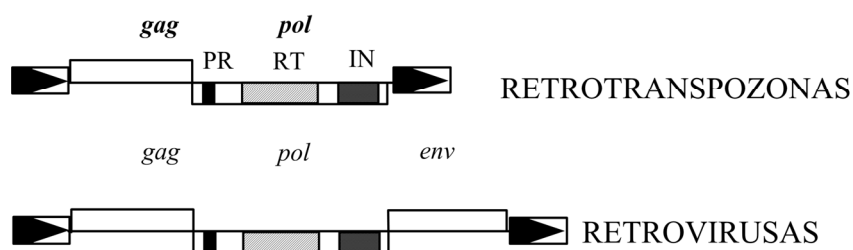
Juos taip pat siūloma skirstyti į keturias klases. Be to, šie elementai gali būti autonominiai ir neautonominiai. Pastarieji gali keisti savo vietą tik tada, kai yra autonominis (aktyvus) elementas *in trans*. Autonominio elemento koduojama transpozazė atpažįsta neautonominio elemento galus ir inicijuoja transpoziciją.

Pirmai klasei priklauso transpozonai, pavyzdžiui, kukurūzų Ac ir jo defektyvus darinys Ds (85 pav.), vaisinės muselės P elementas ir kt. Jų struktūra ir transpozicijos mechanizmas panašus į prokariotų transpozonų. Šiai klasei priklauso gausi Tc1/Mariner šeima: Tc1 ir Tc3 yra *C. elegans*, o Mariner *D. melanogaster* transpozonai.



85 pav. A – autonominio Ac elemento schema; B – neautonominio (defektyvaus) elemento Ds schema

Antrai klasei priskiriami retrotranspozonai. Šie elementai savo genetinė struktūra, transpozicijos mechanizmu labai panašūs į retrovirusus (86 pav.). Gerai ištirti mielių *Ty*, vaisinės muselės *Copia* retrotranspozonai.

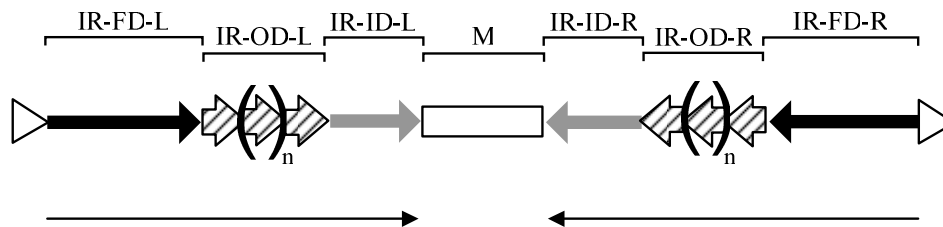


86 pav. Retrotranspozonų ir retrovirusų struktūros palyginimas. Rodyklėmis stačiakampyje pažymėtos ilgos galinės pasikartojančios sekos (angl. *long terminal repeats*, LTR). *Gag* koduoja kapsidės baltymą; *PR* – proteazės genas; *IN* – integrazės genas; *RT* – koduoja atvirkštinę transkriptazę ir RNazę H

Retrovirusai nuo kitų retroelementų skiriasi tuo, kad savo genome turi *env* geną (86 pav.). Šio geno koduojamas baltymas leidžia užkrėsti retrovirusais šeiminingo ląsteles.

Trečiai klasei priklauso LTR neturintys retrotranspozonai, dar vadinami retropozonais. Kaip ir retrotranspozonai jie turi RNR fazę, tačiau nepanašūs į retrovirusus. Šiai JGE grupei priklauso žinduolių LINE ir SINE elementai, vaisinės muselės I faktorius.

Ketvirtai klasei priskiriami FB (angl. *foldback*) elementai. Šiuose labai savitos struktūros dariniuose yra daug ilgų invertuotų pasikartojančių sekų (87 pav.). Pirmiausia jie buvo atrasti vaisinėje muselėje (Potter ir kt., 1980). Tai iš atskirų modulių sudarytų transpozonų grupė. FB elementai (FBE) linkę gausiai sudaryti antrines struktūras. Galinių invertuotų sekų ilgis labai įvairus: nuo kelių šimtų bazių porų iki kelių kilobazių. Kai kurie FBE sudaryti tik iš ilgų invertuotų sekų. Tačiau kituose FBE tarp šių sekų yra vidurinis rajonas, kuriame įsiterpę ASR (Daskalova ir kt., 2005). Pavyzdžiui, *Arabidopsis* FBE *FARE2* koduoja tris baltymus, vienas iš kurių giminiškas kukurūzų transpozono MuDR transpozazei. Vis dėlto daugelio FBE transpozicija priklauso nuo kitų JGE transpozazių. FBE plačiai paplitę eukariotų genomuose. Transpozicijos mechanizmas nepakankamai ištirtas, bet RNR stadijos tikriausiai neturi.

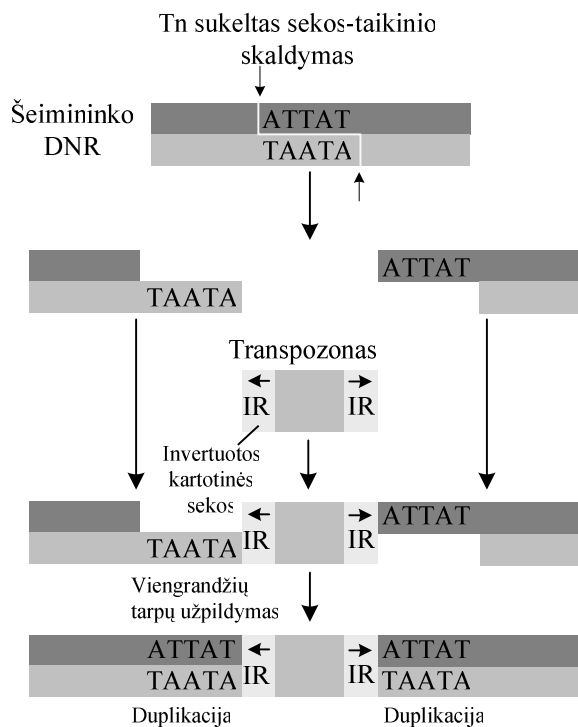


87 pav. FB elementų struktūra: M – vidurinis rajonas; IR – ilgos invertuotos galinės sekos, sudarytos iš modulių: labiausiai nutolusio krašto domeno (IR-FD); išorinio domeno (IR-OD); vidinio domeno (IR-ID). Balti trikampiai – sekos-taikinio duplikacijos, atsiradusios FB elemento įsiterpimo metu (pagal Casals ir kt., 2005)

3.2.3. JGE sekos-taikinio ypatybės

Transpozonai įsiterpia į nehomologiškas jiems sekas. Specifiškumas sekos-taikinio atžvilgiu labai skiriasi. Kai kurie JGE dažniausiai įsiterpia tik į tam tikrus saitus, kiti nėra tokie išrankūs. Dabar manoma, kad įsijungimas nėra visiškai atsitiktinis (Craig, 1997). Yra du pagrindiniai integracijos vietų pasirinkimo būdai. Vienas iš jų priklauso nuo tiesioginės rekombinazės (transpozazės ar integrazės) sąveikos su seka-taikiniu. Antras – nuo rekombinazės ir papildomų baltymų, kuriuos gali koduoti tiek JGE, tiek šeimininkas, sąveikos. Abiem atvejais svarbi ir DNR įtaka. Pavyzdžiui, fagas Mu linkęs integruotis į mažo specifiškumo seką N-Y-G/C-R-N. Bakterijų transpozonas Tn5 beveik nepasižymi specifiškumu, kuris priklauso nuo rekombinacijos saito, todėl patogus naudoti inercinėje mutagenezėje. Kai kurie JGE nesiintegruoja į transkribuojamus genomo rajonus. Kai kurie transpozonai turi „karštus“ rekombinacijos saitus. Pavyzdžiui, IS10/Tn10 linkę „šokinėti“ į vietas, kurių tokia seka: 5'-NGCTNGACN-3'. Rekombinacijos saito pasirinkimas laiko atžvilgiu priklauso nuo transpozicijos sistemos ir gali vykti įvairiose rekombinacijos stadijose. Pavyzdžiui, Tn7 nepalieka savo buvimo vietos iki neidentifikuoja *attTn7* saito, į kurį dažniausiai integruojasi. Šio saito atpažinimui reikia nukleoproteininio komplekso, į kurį įeina rekombinacijos baltymai ir substratinė DNR (transpozono galai ir seka-taikinys). IS10/Tn10 sistemoje rekombinacijos saito atpažinimas nevyksta tol, kol elementas nepalieka savo buvimo vietos. JGE atpažįsta arba tam tikras sekas, arba specifinę DNR erdvinę struktūrą, dažniausiai išlenktą DNR. *S. cerevisiae* Ty3 elementas integruojasi į RNR polimerazės III transkribuojamų genų promotorius, o jam giminiškas Ty5 – į heterochromatino sritis.

Tiriant JGE rekombinaciją su šeimininko DNR, nustatyta, kad seka, į kurią įsiterpia JGE, yra padvigubėjusi ir supa integruotą elementą iš abiejų pusių (Grindley, 1978). Padvigubėjimą sukelia tai, kad, JGE įsiterpdamas į šeimininko DNR, skaldo ją ne tiksliai toje pačioje vietoje, o su keletu nukleotidų poslinkiu (88 pav.). Ištyrus nemažai transpozonų įsiterpimo vietų, nustatyta, kad dažniausiai duplikacija būna 5 ar 9 bp dydžio. Vis dėlto yra tam tikrų išimčių. Pavyzdžiui, Tc1/Mariner šeimos elementai atpažįsta TA dinukleotidus ir, įsiterpdami į ją, sukelia 2bp TA duplikaciją.



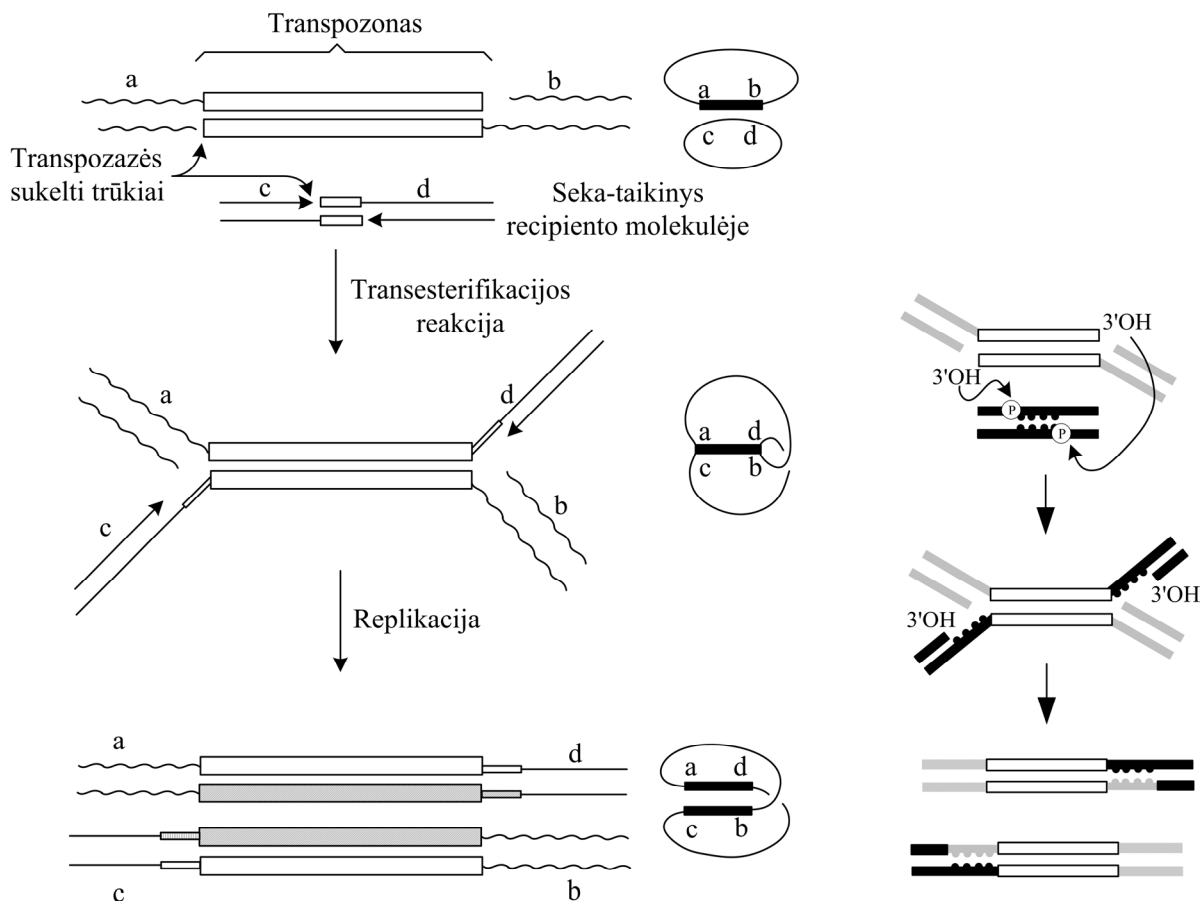
88 pav. Sekos-taikinio duplikacija transpozicinės rekombinacijos metu

Prieš kai kurių bakterijų transpozonus (Tn3 šeimos, bakteriofago Mu, Tn7) pasireiškia savitas imunitetas, nes šie JGE negeba įsijungti į DNR rajonus, kurie jau turi vieną transpozono kopiją. Tačiau *in cis* potencialiam transpozicijos saitui, jau turinčiam transpozoną, toks imunitetas ribotas. Tiriant Tn7 transpozicijos imunitetą *E. coli* chromosomoje, nustatyta, kad atsparumas prieš naujos transpozono kopijos įsijungimą siekia apie 190 kbp. Mu atveju šis poveikis išlieka 20 kbp atstumu. Šio reiškinio molekulinė prigimtis geriausiai ištirta Mu sistemoje. Mu transpozicijoje dalyvauja du baltymai: MuA transpozazė – atpažįsta elemento galus ir prie jų jungiasi, vykdo DNR skaldymą ir sujungimą su recipiento DNR ir MuB baltymas, priklausomas nuo ATP, sąveikauja su DNR ir aktyvuoja transpozazę. DNR saitas, prie kurio prisijungęs MuB, yra vieta, prie kurios pirmiausiai jungiasi MuA. Imunitetas transpozicijai pasireiškia tuo, kad MuB pašalinamas nuo potencialių sekų-taikinių, greta kurių jau yra įsiterpęs fagas Mu. Šiuo atveju MuA, prisijungęs prie Mu galų atspariame transpozicijai saite, veikia kaip savotiška „šluota“, kuri pašalina iš tos vietos MuB. Taigi didesnis kiekis MuA, prisijungusių prie DNR, mažina tose vietose prisijungusių MuB koncentraciją ir tokios sekos tampa netinkamomis naujo JGE įsiterpimui.

3.2.4. Transpozicijos mechanizmai

Transpozicija vyksta transpozazei endonukleolitiškai skaldant fosfodiesterines jungtis JGE galuose ir prijungiant šiuos galus prie taikinio DNR. Šiai rekombinacijos reakcijai reikalingas sudėtingas nukleoproteininis kompleksas. Jis dar vadinamas transpozosoma, kuri paprasčiausiu atveju sudaryta iš rekombinazės, transpozono galų ir taikinio DNR. Sudėtingesniais atvejais dalyvauja ir papildomi baltymai. Pagal transpozicijos mechanizmą ir galutinį rezultatą ją būtų galima skirstyti į replikatyviąją ir nereplikatyviąją. Replikatyviosios transpozicijos metu viena transpozono kopija lieka senoje vietoje, o

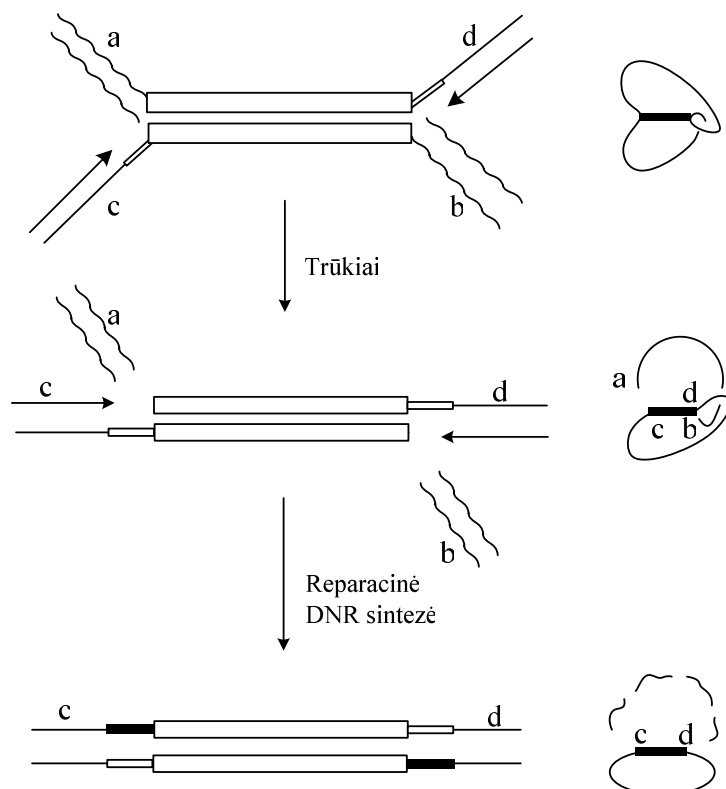
kita peršoka į naują. Šiuo atveju skaldoma tik viena DNR grandinė iš abiejų transpozono galų. Todėl transpozonas nepalieka donorinio saito (89 pav.). Jo laisvi 3'-OH galai, susidarę dėl transpozazės sukeltų viengrandžių trūkių, pernešami ant sekos-taikinio, kur sukelia viengrandžius trūkius ir vykdo transesterifikacijos reakciją. Taip susidaro replikacijos šakutės, nukreiptos viena prieš kitą. Replikacijos metu padauginamas JGE. Jeigu transpozicija vyksta tarp skirtingų molekulių, tai susidaro jų bendras darinys, vadinamas kointegratu (89 pav.). Kointegratas yra laikinas DNR darinys, kuris suskaldomas atskiriant vieną nuo kito replikonus, turinčius po JGE kopiją. Kointegratas gali būti suskaldytas homologinės arba konservatyviosios sait-specifinės rekombinacijos būdu. Pavyzdžiui, transpozonas Tn3 turi *res* saitus, kuriuose jo koduojamas TnpR baltymas, vykdo sait-specifinę rekombinaciją ir atskiria vieną nuo kito kointegratą sudariusius replikonus. Kointegrato susidarymo reakcija buvo iširta panaudojant fagą Mu. Šio tipo transpozicija vienos molekulės viduje sukelia inversijas ir delecijas. Replikatyvioji transpozicija būdinga Tn3, Tn1000 ($\gamma\delta$), Mu (lizės metu), IS6 ir kt.



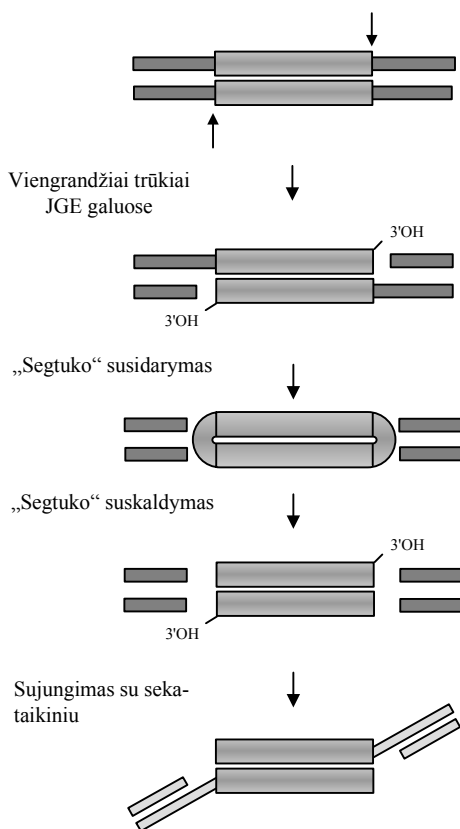
89 pav. Replikatyviosios transpozicijos modelis (angl. *copy and paste*) ir kointegrato susidarymas (paaškinimas tekste) (pagal Haren ir kt., 1999)

Nereplikatyviosios transpozicijos metu JGE iškerpamas iš donoro molekulės ir įsiterpia į naują vietą, transpozicijos metu elementas nereplikuojamas. Pavyzdžiui, taip vyksta fago Mu nerekliatyvioji transpozicija (90 pav.). Ši transpozicija gali vykti ir kitaip. JGE galuose sukeliama dvigrandžiai trūkių, o sekoje-taikinyje – viengrandžiai, transpozonas visiškai atskiriamas nuo donoro saito. Toks mechanizmas dažnai vadinamas angliškai „cut and paste“, transpozono išsikirpimas donoro molekulėje

sukelia dvigrandį trūkį, kuris gali būti letalus, jeigu jo neištaysys reparacinės sistemos. Tn10 ir Tn5, išsikirpdami iš donoro saito, savo galuose sudaro segtukų pavidalo struktūras (91 pav.). Nereplikatyvioji transpozicija gali vykti dalyvaujant ir P elementui, Tn7, IS10, Ac ir kt.



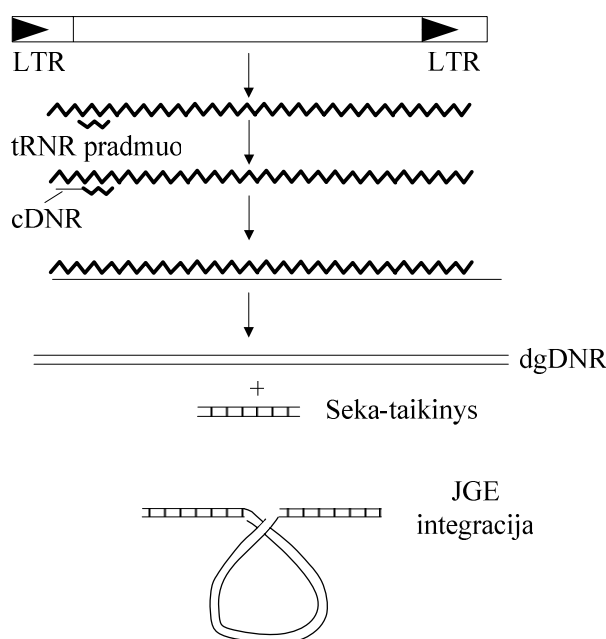
90 pav. Fago Mu nereplikatyviosios transpozicijos schema



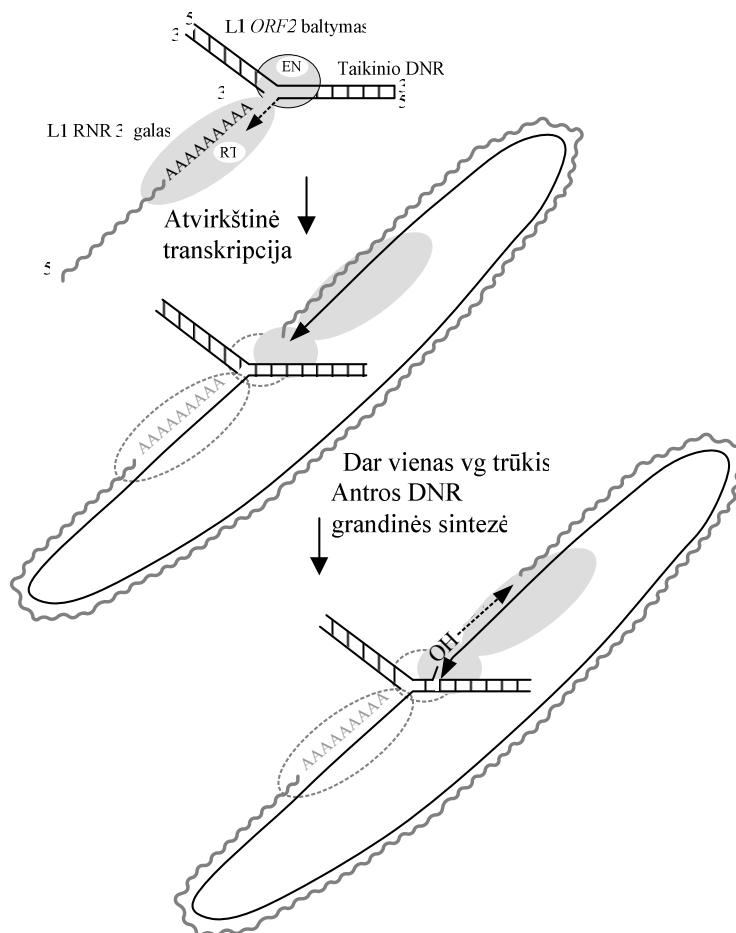
91 pav. JGE (Tn10, IS10, Tn5 ir kt.), sudarančių laikiną „segtuką“ struktūrą, transpozicijos modelis

3.2.5. Alternatyvūs transpozicijos būdai

Transkripcijos panaudojimas. LTR elementai (retrotranspozonai, retrovirusai) tiesiogiai nedalyvauja transpozicijoje. Dėl to panaudojama jų RNR kopija, kuri susidaro nuo genome esančios elemento DNR, transkripcijos metu (92 pav.). Atvirkštinė transkriptazė susintetina cDNR nuo RNR. Dažniausiai cDNR yra 2 bp ilgesnė už integruotą į genomą LTR elemento kopiją. Rekombinacijos metu integrazė pašalina šiuos papildomus nukleotidus, o likusi cDNR įsiterpia į seka-taikinį. Retropozonai, LTR neturintys retroelementai, šokinėja dar kitaip. Jie tiesiogiai dalyvauja transpozicijos procese. Šių JGE mRNR translacija vyksta citoplazmoje ir susidaro vienas arba du baltymai. Vienas iš jų yra daugiafunkcinis, atlieka nukleazės ir atvirkštinės transkriptazės funkcijas. Manoma, kad šis baltymas jungiasi prie RNR ir susidaro ribonukleoproteininis (RNP) kompleksas, kuris patenka į branduolį. Ten RNP sąveikauja su seka-taikiniu, kuriame endonukleazė sukelia viengrandį trūkį (93 pav.). Po to vyksta atvirkštinė transkripcija, kurioje pradmuo yra taikinio sekos 3'-OH galas, kuris komplementariai prisijungia prie elemento 3' gale esančios poly(A) sekos (Boeke, 2003). Neišsiaiškinta, kas sukelia antrąjį trūkį kitoje grandinėje. Kaip kitas galas įsiterpia į naują vietą, irgi tiksliai nežinoma.



92 pav. LTR elementų transpozicija. Vingiuota linija pavaizduota RNR, tiesia – DNR molekulės (pagal Boeke, 2003)



93 pav. Retropozonų transpozicija. Vingiuota linija – RNR, tiesi – DNR molekulės (pagal Boeke, 2003)

3.2.6. Transpozicijos reakcija

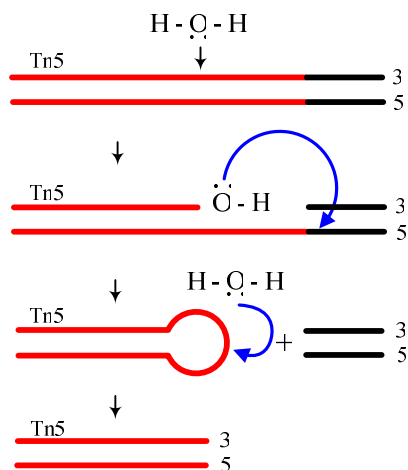
Transpozicijos sistemų (Mu, Tn3, HIV, P, IS šeima, IS4 šeima, Tc/Mariner) *in vitro* sukūrimas padėjo nustatyti svarbiausius šios rekombinacijos etapus (Haren ir kt., 1999). Paaiškėjo, kad visais atvejais transpozicijos metu vykstančių DNR grandinių skaldymo ir sujungimo reakcijos labai panašios – tai transpozazės arba integrazės katalizuojama DNR fosfodiesterinės jungties hidrolizė ir po to vykstanti transesterifikacijos reakcija. Nė vienai iš jų nereikia išorinių energijos šaltinių. Transpozicijos reakciją galima suskirstyti į tris stadijas: 1) transpozono atskyrimas nuo donoro DNR dėl viengrandžių ar dvigrandžių trūkių jo galuose; 2) transpozono galų pernešimas ant sekos-taikinio; 3) rekombinaciją patyrusių sekų subrandinimas.

3.2.6.1. Transpozono atskyrimas nuo donoro DNR

Kai kurių JGE (Mu, retrovirusų, IS3 šeimos elementų) transpozazės katalizuoja viengrandžius trūkius abiejuose galuose, dėl to susidaro laisvi 3'-OH galai. Retrovirusuose šios reakcijos metu atskeliami du nukleotidai nuo 3'galo dvigrandėje cDNR ir todėl joje susidaro 5' viengrandžiai galai. Jei transpozicijos metu JGE iš karto visiškai atsiskiria nuo donoro DNR, tai turi būti skaldoma ir komplementari DNR grandinė. Jeigu 3'-OH galai susidaro visuose JGE, tai komplementari grandinė skaldoma gana retai ir gana įvairiai, pavyzdžiui, Tc/Mariner šeimos ar P elemento transpozicijos metu komple-

mentarios grandinės skaldymas vyksta transpozone keletu nukleotidų nuo galo atstumu (2 nt - Tc1/3; 3 nt – Mariner; 17 nt P elemente). Taip susidaro laisvas elementas, kuris turi atitinkamo ilgio viengrandžius 3'-OH galus.

Kai kuriuose elementuose (IS10, Tn10, Tn5) šie trūkiai nėra analogiški. 5'galo juose skaldymas įvyksta tik susidarius laisvam 3'galui. Šioje padėtyje esanti OH grupė kaip nukleofilas, atakuoja antrąją grandinę. Todėl transpozono galuose susidaro „segtuko“ pavidalo struktūros (94 pav.), kurios hidrolizuojamos ir susidaro laisvi 3'-OH ir 5' fosfato galai.



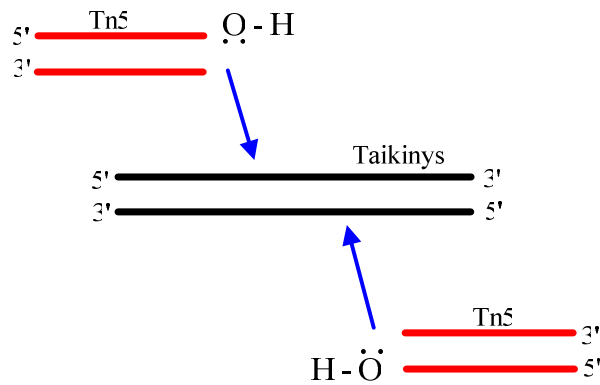
94 pav. DNR molekulės antrosios grandinės skaldymas ir „segtuko“ susidarymas transpozicijos metu. DNR pirmosios grandinės skaldymas ir 3'-OH galo susidarymas bei vėliau „segtuko“ skaldymas vyksta dalyvaujant vandens molekulei ir transpozazei

Tai panašu į V(D)J rekombinacijos mechanizmą (žr. 4.4. skirsnį). Panašiai šokinėja Ac, Tam3, hobo, Ascot-1.

Yra ir daugiau antrosios grandinės skaldymo variantų. Tn7 transpozazė sudaryta iš dviejų polipeptidų – TnsA ir TnsB, kurių kiekvienas skirtas skirtingoms DNR spiralės grandinėms skaldyti.

3.2.6.2. Grandinės pernešimo reakcija

Transpozono 3'galai, susidarę po trūkio, pernešami ant taikinio DNR. Kaip ir hidrolizę šią reakciją vykdo transpozazė arba integrazė. Šie baltymai katalizuoja nukleofilinę sekos-taikinio ataką, kurioje kaip nukleofilas veikia 3'-OH grupės, esančios transpozono galuose (95 pav.). Kadangi šiam procesui vykti nereikalingas išorinis energijos šaltinis, manoma, kad panaudojama sekos-taikinio fosfodiesterinės jungties energija.



95 pav. Transpozono galuose esančios 3'-OH grupės nukleofiliškai sąveikauja su taikinio DNR seka.

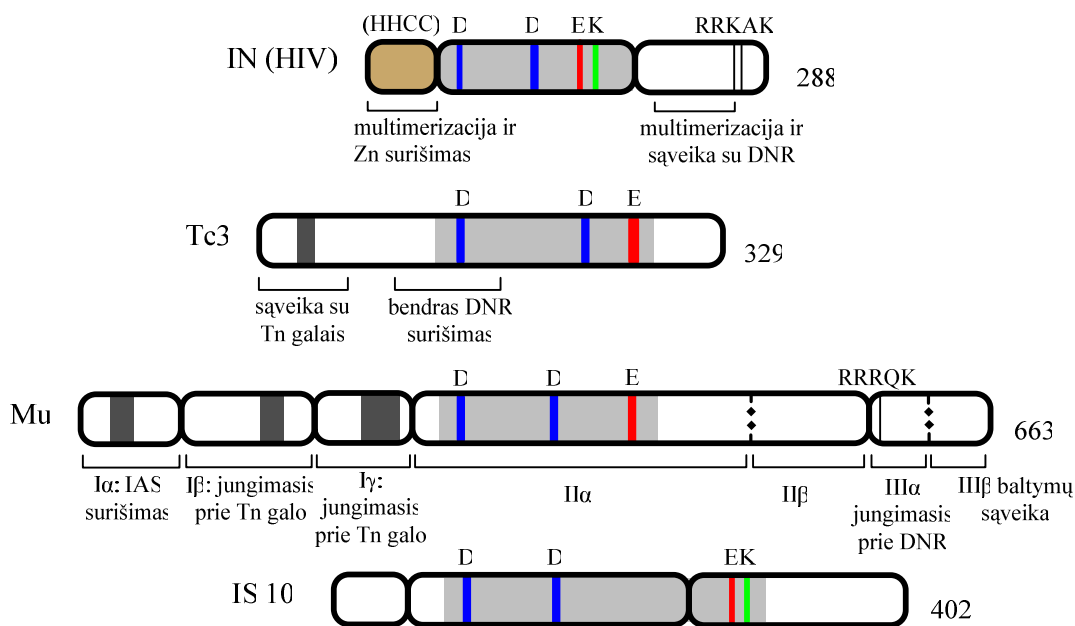
Kaip minėta, dėl transpozicijos sukeliama DNR molekulių skaldymo ir sujungimo pobūdžio įsiterpusį elementą iš abiejų pusių supa sekos-taikinio duplikacijos. Šio vyksmo metu atsiradusius tarpus DNR molekulėje pašalina šeimininko reparacijos/replikacijos baltymai. Kadangi JGE transpozazių ir integrazių vykdomos reakcijos panašios, tai ir šių baltymų struktūra turi būti labai panaši.

3.2.7. Transpozicijos baltymų savybės

Transpozazės ir integrazės – daug funkcijų atliekantys baltymai. Jie turi atpažinti JGE galus, juos suartinti sineptoneminiame komplekse, atpažinti skaldomas fosfodiesterines jungtis, vykdyti grandinės pernešimą, po to atlaisvinti vietą šeimininko baltymams, kurie ištaiso DNR pažaidas rekombinacijos vietoje. Svarbus šių baltymų bruožas tas, kad sekos atpažinimo ir katalizinis domenai lokalizuoti skirtingose to paties polipeptido vietose arba net skirtinguose daugiakomponenčio komplekso polipeptiduose. Vis dėlto bendras funkcinis organizacijos principas yra aiškus: specifiskas DNR sekų atpažinimo domenai dažniausiai lokalizuotas transpozazių N galuose, o katalizinis domenai su svarbių DDE aminorūgščių liekanomis – dažniausiai arčiau C galo. DNR atpažįstama tada, kai identifikuojami elemento galai, esantys greta donoro DNR, kai susidaro transpozosoma, kai atitinka transpozono DNR ir transpozazės katalizinė “kišenė”. Šiame procese labai svarbi transpozono galų struktūra. Daugelio transpozonų galai sudaryti iš dviejų funkcinių rajonų. Toliau nuo galo esantis vidinis rajonas užtikrina specifinį sekoms transpozazės prisitvirtinimą. Kitas rajonas atitinka 2–4 galines bp, kurios būtinos skaldyti DNR ir grandinei pernešti. Šis rajonas giminiškuose transpozonuose gana konservatyvus. Labai dažnai transpozonų galuose randamas CA-3' dinukleotidas. Jis randamas Mu, Tn7, IS30, Tn552, IS3 šeimos elementų, retrovirusų genomuose. Šeimininko baltymai taip pat jungiasi prie transpozono galų. Šie baltymai daro įtaką transpozosomos susidarymui, nes veikia transpozazės geno raišką ir transpozicijos aktyvumą.

Transpozazių atpažinimo ir katalizinis domenai yra skirtingose baltymo vietose, tai, galbūt padeda baltymui išlikti lanksčiam. Ši savybė reikalinga transpozazei N galu sąveikaujant su vidiniu transpozono galo atpažinimo rajonu ir kataliziniu domenu su išoriniu atpažinimo rajonu. Atpažinimo domene transpozazės turi spiralė-posūkis-spiralė (angl. *helix-turn-helix*, *HTH*) motyvą, kuriuo jungiasi prie DNR (96 pav.). Šis domenai labai paprastas vienuose JGE, pavyzdžiui, IS transpozazių, o kituose su-

darytas iš dviejų dalių, pavyzdžiui, Mu, Ac, Tc transpozazių ir gali atpažinti skirtingas DNR sekas. Pavyzdžiui, MuA baltyme už tai atsakingi du greta esantys subdomenai I β ir I γ . Mutacijos fago Mu rajone, kuris koduoja šiuos subdomenus, panaikina arba susilpnina MuA gebėjimą atpažinti elemento galus. Abu subdomenai turi HTH motyvą ir kiekvienas atpažįsta pusę sekos, prie kurios jungiasi.



96 pav. Įvairių transpozonų transpozazių struktūra. Tikri arba galimi spiralė-posūkis-spiralė (HTH) motyvai (pavaizduoti tamsiai pilka spalva). Katalizinio domeno konservatyvioji dalis, turinti DDE motyvą, nuspalvinta šviesiai pilkai. Skaičiai rodo baltymą sudarančių aminorūgščių skaičių (pagal Haren ir kt., 1999)

Integrazių sąveika su DNR šiek tiek skiriasi nuo transpozazių sąveikos su DNR. Integrazės neturi specifinio prisijungimo prie DNR. Jų N gale esantis HLH motyvas, atrodo, dalyvauja ne atpažinimo, o baltymų multimerizacijos procese. Šis skirtumas galbūt atspindi transpozonų ir retroelementų biologijos skirtumus. DNR sekos, su kuriomis sąveikauja integrazės, yra nukleoproteininėje dalelėje greta paties fermento, o transpozazės turi atpažinti transpozono galus ir jungtis prie jų, kai JGE jau įsiterpęs į šeimininko DNR. Be to, virusių DNR galų atpažinimą gali palengvinti ir tai, kad jie yra fiziniai DNR molekulės galai.

Transpozazių ir integrazių struktūros tyrimai atskleidė konservatyvius šių baltymų rajonus, kurių centre yra DDE motyvas ir keletas papildomų gana konservatyvių aminorūgščių (ypač K ir R) liekanų (97 pav.). Šie konservatyvūs rajonai buvo pavadinti N2, N3 ir C1. Pagrindinis šios triados vaidmuo – sujungti divalentiškus katijonus, reikalingus katalizės reakcijai. DDE motyvo svarba buvo įrodyta mutagenezės eksperimentais. Mutacijos, kurios pažeisdavo integrazių genus, kliudė cDNR galų subrandinimui ir sujungimui. Tai rodo, kad DDE įeina į katalizinį centrą. Nors mutagenezės eksperimentų su transpozazėmis atlikta mažiau nei su integrazėmis, jie taip pat patvirtino DDE motyvo svarbą transpozicijos katalizėje. Svarbus vaidmuo transpozicijos reakcijoje tenka ir divalentių metalų (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+}) jonams. Jie veikia kaip kofaktoriai ir dalyvauja susidarant transpozosomai. Ypač svarbūs Mg^{2+} jonai, su kuriais sąveikauja DDE motyvas (Mitsuuchi, 1992).

HIV-1 (IN)	wql	64 D	cth (51)	wht	116 D	ngsnf (35)	ynpqsQgvi	152 E	snNKel	K
Mu (MuA)	ing	269 D	gyl (66)	iti	336 D	ntrga (55)	kgwggaKpv	392 E	rafvgv	
Tn7 (TnsA)	(hgk	28 D	yip) (85)	mst	114 D	flvdc (34)	ertleKlel	149 E	rrywqq	K
Tn7 (TnsB)	yey	273 D	ati (87)	lla	361 D	rgelm (34)	rrfdaKgiv	396 E	stfRtl	
Tn3	asa	689 D	gmr (75)	imt	765 D	tagas (129)	riltqlNrg	895 E	srHava	R
Tc1	iws	86 D	esk (90)	fqq	177 D	ndpkh (108)	sqspdlNpi	286 E	hmweele	R
	⏟			⏟			⏟			
	N2			N3			C1			

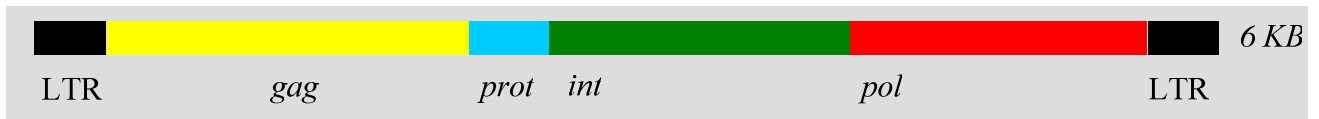
97 pav. Transpozazių ir integrazių DDE motyvai. N2, N3 ir C1 - konservatyvūs rajonai (pagal Harren ir kt., 1999)

Dar viena svarbi eukariotų ir prokariotų JGE transpozazių savybė – jungimasis į kompleksus (multimerizacija). Tai svarbu sinapsiniam kompleksui susidaryti, protomerams katalizės metu sąveikauti, transpozazės aktyvumą valdyti. Susidarant transpozosomai, dalyvauja nevienodas rekombinazės subvienetų skaičius. Pavyzdžiui, Tn5 transpozicijos metu į šį kompleksą įeina du transpozazės subvienetai, o Mu transpozazė ir retrovirusų integrazės sąveikauja su DNR kaip tetramerai.

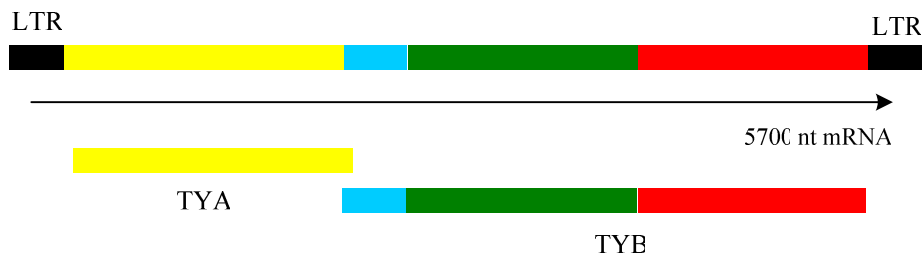
3.2.8. Retrotranspozonai ir retropozonai

3.2.8.1. Mielių Ty retrotranspozonai

Ty (angl. *transposon yeast*) elementai – tai pasikartojančios DNR sekos, paplitusios mielių genome. Jų transpozicijos dažnis mažesnis nei daugelio bakterijų transpozonų: $\sim 10^{-7}$ - 10^{-8} . Nors atskirų Ty elementų sandara gana skirtinga, juos galima grupuoti į dvi klases: Ty1 ir Ty917. Ty elemento dydis yra apie 6,3 kbp. Retrotranspozonas, įsiterpęs į mielių genomą, sukelia 5 bp dydžio sekos taikinio duplikacijas. Elementas savo galuose turi vienakryptes pasikartojančias sekas δ (*delta*), kurios yra 330 bp ilgio (98 pav.). Pavieniai Ty elementai skiriasi nuo bendrų vienos ar kitos klasės požymių, nes turi delecijų, intarpų ir kitų mutacijų. Mielių genome yra apie 30 Ty1 kopijų ir maždaug šešios Ty917 kopijos. Be to, δ elementai gali egzistuoti ir pavieniui. Tada jie vadinami *solo*, δ s. Šių sekų mielių genome yra apie 100. Ty elementas transkribuojamas dvejopai, dėl to susidaro dviejų rūšių poli(A)⁺RNR, kurių labai gausu mielių ląstelėse (apie 5 proc. visos mRNR). Šių Ty mRNR transkripcija prasideda nuo promotoriaus, esančio kairiajame δ elemente. Vienos rūšies transkripto ilgis yra 5 kbp, antros – 5,7 kbp (99 pav.). Abiem atvejais transkripcija prasideda nuo retrotranspozono kairėje pusėje esančio δ elemento, o ilgesniojo pasibaigia dešiniajame δ elemente.



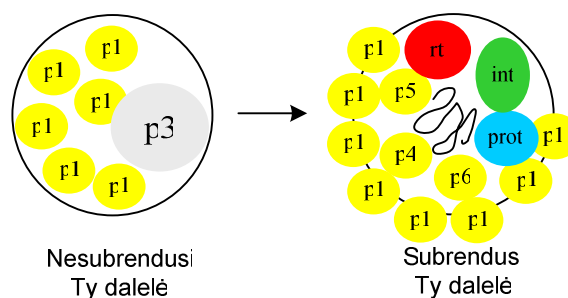
98 pav. Mielių *S. cerevisiae* Ty retrotranspozono sandara. LTR – δ elementas. http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast_Biol/11_proc.20Yeast_proc.20Retrotransposons.pdf



99 pav. Ty transkripcija. 5,7 kbp transkripto susidarymas

Ty yra du ASR, kurie nuskaitomi ta pačia kryptimi ir nežymiai persidengia. *TyA* koduoja DNR surišantį baltymą. *TyB* seka turi sritis, homologiškas retrovirusų atvirkštinei transkriptazei, proteazei ir integrazei. Šie ASR savo sandara ir savybėmis analogiški retrovirusų *gag* ir *pol* genams. Rekombinacija vyksta ir tarp Ty elementų jų aktyvios transpozicijos metu. Mielių genome tarp viena kryptimi orientuotų Ty elementų gali vykti geno konversija, kurios metu vieno elemento seka paverčiama kito seka. Ty retrotranspozonai gali išsikirti iš genomo dėl rekombinacijos tarp galinių δ sekų. Todėl gana daug δ s pavienių kopijų genome galbūt ir yra šios homologinės rekombinacijos rezultatas.

Ty kaip ir retrovirusai šokinėja per RNR kopiją. Nors jie nesuformuoja infekcinių dalelių, tačiau ląstelėse, kuriose buvo aktyvuota transpozicija, kaupiasi į virusus panašios dalelės (VPD) (100 pav.). Jose yra visa Ty RNR kopija, proteazė, atvirkštinės transkriptazės aktyvumą turintis baltymas ir integrazė.



100 pav. VPD, kurią sudaro Ty retrotranspozonas, sandara: Ty RNR (juoda kreivė) naudojama kaip matrica dgDNR sintezei. http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast_Biol/11_proc.20Yeast_proc.20Retrotransposons.pdf

TyA koduoja polipeptidą, kuris skaldomas ir suformuoja į virusą panašios dalelės apvaskalą. Galima teigti, kad Ty retrotranspozonai veikia kaip retrovirusai, kurie prarado *env* geną, todėl negali taisyklingai savo genomo patalpinti dalelėje. Mielių genome daugelis Ty neaktyvūs, nes prarado gebėjimą keisti savo vietą.

3.2.8.2. Vaisinės muselės (*D. melanogaster*) *copia* retrotranspozonai

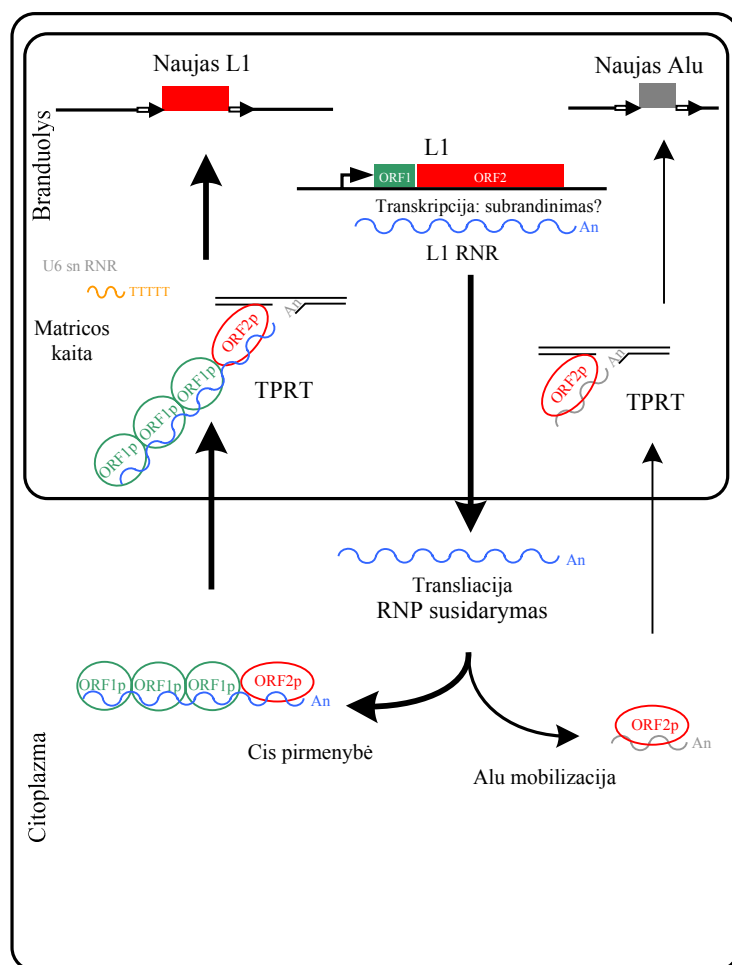
Vaisinėje muselėje labiausiai paplitę JGE – *copia* retrotranspozonai, FB šeimos ir P elementai. *Copia* šeima taip pavadinti dėl didelio skaičiaus labai panašių sekų, nuo kurių nuskaitoma mRNR. Šių elementų kopijų skaičius (20–60) priklauso nuo muselės kamieno. Sekos išbarstytos po genomą. *Copia* retrotranspozono dydis maždaug yra 5000 bp. Jo galuose esančių vienakrypčių pasikartojančių sekų ilgis 276 bp. Kiekviena tokia seka turi invertuotas sekas galuose. *Copia* turi vieną ASR, nuo kurio susidaro 4227 bp ilgio transkriptas. ASR seka panaši į retrovirusų *gag* ir *pol* sekas. Tačiau šie elementai negali suformuoti į virusus panašių dalelių.

3.2.8.3. Žmogaus retrotranspozonai

Daugiau kaip 45 proc. žmogaus genomo sudaro JGE (Batzer ir Deininger, 2002), iš kurių 32 proc. genome sudaro LTR neturintys retrotranspozonai, dar vadinami retropozonais – tai pasikartojančios sekos, kurios plinta atvirkštinės transkripcijos būdu ir skirtingai nei retrotranspozonai ar retrovirusai neturi ilgų galinių sekų (LTR). Jų dalis kai kurių eukariotų genomuose sudaro net 50 proc. Retropozonai skirstomi į dvi grupes: ilgus – LINE (angl. *long interspersed elements*) ir trumpus – SINE (angl. *short interspersed elements*). LINE elementams priskiriamos sekos, didesnės nei 500 bp, SINE – mažesnės nei 500 bp. LINE elementai skirtingai nei SINE, gali turėti ASR, kurie koduoja baltymus, reikalingus transpozicijai.

Žinduolių genomuose dažniausiai aptinkami LINE retropozonai – L1. Jie sudaro apie 17 proc. žmogaus DNR (Ostertag ir Kazazian, 2001). Viso L1 elemento dydis – apie 6500 bp. Tačiau žinduoliuose daugelis šių elementų yra neaktyvūs, nes gali būti praradę 5' galą arba patyrę kitas mutacijas. Iš žmogaus genome esančių 520 000 L1 retropozonų tik 3000–5000 turi visą seką. Šių elementų genome yra 5' netransliuojamas rajonas (UTR), kuriame yra vidinis promotorius, du ASR ir 3' UTR galas, užsibaigiantis AATAAA poliadenilinio signalu bei poliA uodega. Retrotranspozicija, kurios metu elemento kopija įsiterpia į naują genomo vietą, vyksta keliais etapais: transkripcijos, RNR subrandinimo (procesingo), mRNR eksporto į citoplazmą, transliacijos, potransliacinės modifikacijos ir RNP susidarymo, sugrįžimo į branduolį, jame vykstančios atvirkštinės transkripcijos ir įsijungimo į genomą (101 pav.). L1 transkripciją, matyt, vykdo RNR polimerazė II. Jos susintetinti transkriptai tradiciškai yra modifikuojami: pašalinami intronai, prijungiama poliA ir 7-metilgvanozino „kepurė“. L1 turi poliadenilinio signalą, dėl kurio tikriausiai ši modifikacija vykdoma. Tačiau L1 ASR neturi intronų, prie transkriptų neprijungiama metilgvanozino kepurė. L1 mRNR yra nebūdinga žinduolių ląstelėms, nes yra bicistroninė. Jų transliacijos mechanizmo detalės dar nelabai aiškios. ASR1 koduoja baltymą, kuris sąveikauja su RNR ir turi šaperono savybių. ASR2 koduoja apie 150 kDa baltymą, turintį tris konservatyvius domenus: N gale endonukleazės, centre – atvirkštinės transkriptazės ir daug cisteino turtintą domeną. L1 nukleazė skaldo DNR, kurios apytikslė seka – AA/TTTT. Skaldymo vietos pasirinkimą veikia ir saito chromatino struktūra. Atvirkštinė transkripcija pradmeniu naudoja taikinio sekos galą

(angl. *target primes reverse transcription, TPRT*). Pirmiausia ji buvo aprašyta nariuotakojų retropozono R2. Jis turi tik vieną ASR, kuris koduoja baltymą, pasižymintį II tipo restrikcijos endonukleazės ir AT savybėmis. Manoma, kad panašų mechanizmą turi ir L1 elementas.

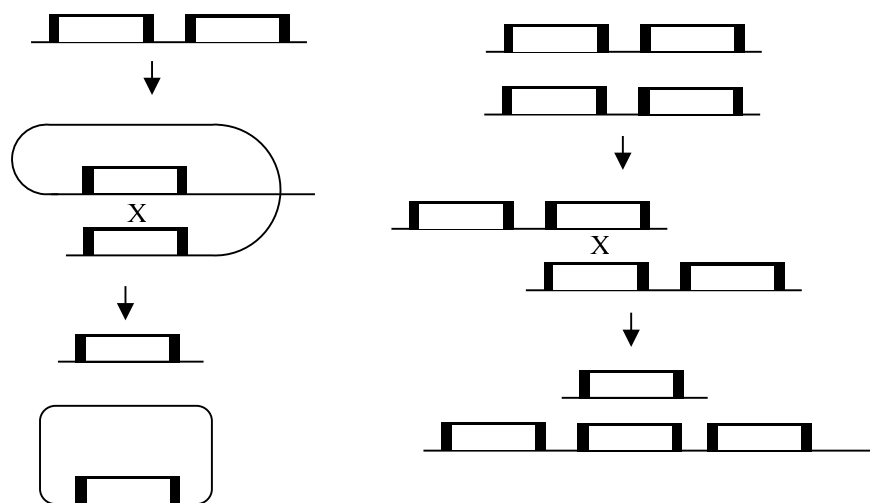


101 pav. Aktyvaus L1 elemento transkripcija ir transpozicija: RNP – ribonukeoproteininis kompleksas. TPRT – atvirkštinė transkripcija nuo taikinio sekos galo kaip pradmens. www.igh.cnrs.fr/.../workbucheton.html

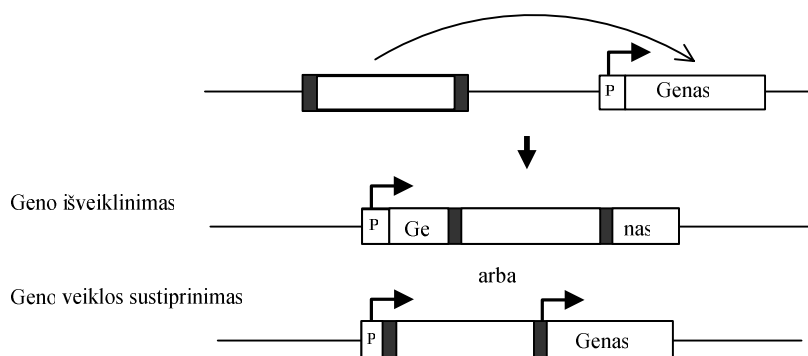
Nustatyta, kad L1 koduojami baltymai veikia dažniausiai *in cis* (vadinamoji *cis* pirmumo taisyklė). Šiuo atveju tam tikro elemento koduojami baltymai sąveikauja su juo pačiu. Išimtis yra Alu, SVA elementai ir kai kurie pseudogenai (101 pav.). Jų transpozicijai gali būti panaudota L1 endonukleazė ir atvirkštinė transkriptazė (Ostertag ir Kazazian, 2001; Chen ir kt., 2007).

L1 retrotranspozonai, dalyvaudami įvairiuose rekombinacijos įvykiuose, gali sukelti žmogaus ligas. Tarp genome esančių L1 sekų gali vykti homologinė rekombinacija (102 pav.), jos gali įsiterpti į genus ir sutrikdyti jų veiklą (103 pav.). Žinoma ne mažiau 13 žmogaus ligų, kurias sukėlė L1 intarpai (Ostertag ir Kazazian, 2001). Daugiausia jų nustatyta X chromosomoje. L1 elementai gali sukelti ir šalia esančios genetinės medžiagos transdukciją. Pirmiausia tai buvo nustatyta 1994 m. žmogaus distrofinio gene, į kurį įsiterpė L1 retropozonas, kuris savo 3' gale turėjo daugiau kaip 500 papildomų nukleotidų (Holmes ir kt., 1994). L1 elementai gali pernešti žemiau esančių genų egzonus, ir įsiterpę naujose vietose sukurti hibridinius genus. Žmogaus genomo duomenų bazių analizė parodė, kad apie 20

proc. L1 intarpų 3' gale turi transdukuotas svetimias sekas. Kadangi retrotranspozonai gali būti nuskaitomi ir nuo aukščiau jų esančių promotorių, tai gali būti pernešamos ir tos sekos, kurios yra aukščiau elemento 5' galo.



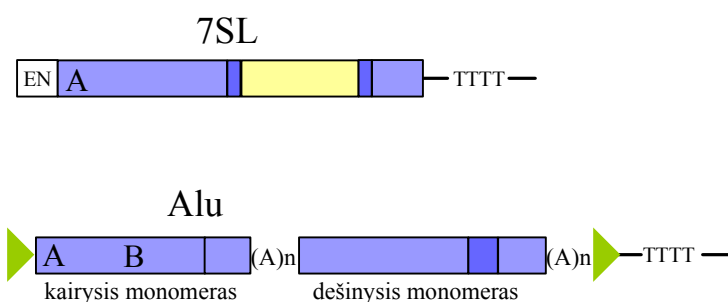
102 pav. Homologinė rekombinacija tarp L1 ar kitų JGE gali sukelti delecijas vienoje iš sąveikaujančių DNR molekulių



103 pav. Retrotranspozono įsiterpimas į geną gali sukelti geno inaktyvavimą arba sustiprinti jo raišką. <http://newfish.mbl.edu/Course/Lectures01/PDF/voytaslecture.pdf>

Iš SINE elementų žmogaus genome labiausiai paplitusios Alu sekos. Šie retropozonai gavo pavadinimą nuo restrikcijos endonukleazės AluI, kuri skaldė šią pasikartojančių sekų frakciją (Houck ir kt., 1979). Alu sekos yra apie 300 bp dydžio ir dažniausiai aptinkamos genų intronuose ir 3' netransliuojamose srityse, taip pat tarpuose tarp genų. Žmogaus genome šių retropozonų yra daugiau kaip 1 000 000 kopijų (apie 10 proc. genomo). Beveik neabejojama, kad Alu sekos kilo iš 7SL RNR geno (Batzer ir Deininger, 2002) (104 pav.). Pirmiausia, matyt, įvyko šio geno duplikacija, po to – naujos struktūros plitimas genomuose. Alu sekas, kaip ir 7SL RNR genus, transkribuoja RNR polimerazė III. Alu transpozicijos mechanizmas panašus į LINE L1 ir kitų LINE elementų. Kadangi Alu neturi genų, tai savo transpozicijai reikalingus baltymus „pasiskolina“ iš L1. Tik keletas Alu sekų, vadinamų „pagrindinėmis“ arba „genais pradininkais“, gali vykdyti retropoziciją, t.y. gaminti savo kopijas, kurios įsiterpia į kitas genomo vietas. Nors yra dar neatsakytų klausimų, manoma, kad pagrindinės priežastys, lemiančios Alu gebėjimą daugintis, yra šios: transkripcinis aktyvumas, specifinių transkriptų gebėjimas są-

veikauti su retropozicijos sistemos komponentais ir galbūt poliA uodegos homogeniškumas ir ilgis, nuo kurio priklauso atvirkštinės transkripcijos pradmens susidarymas. Nors daugelis Alu sekų turi vidinį RNR polimerazės III promotorių, tačiau vien jo nepakanka transkripcijai *in vivo*. Dar reikalingos tam tikros sekos, esančios už elemento ribų. Taigi šis reiškinys labai priklauso nuo Alu genetinės apsuptyies, nuo genomo vietos, kurioje jis yra. Netgi aktyvios Alu sekos gali greitai būti nuslopintos, nes jose yra 24 ar daugiau CpG dinukleotidų, kuriuose dažnai įvyksta mutacijos dėl 5-metilcitozino liekanų deaminavimo. Alu sekos, įsiterpusios į naują vietą genome, metilinamas dažniausiai vyksta pagal tos vietos situaciją. Po to vyksta visiškas elemento nuslopinimas dėl mutacijų, kurių metu 5-metilcitozinas virsta timinu. Be to, Alu sekos gali prarasti aktyvumą ir dėl mutacijos oligo(dA) uodegoje, kuri taip pat svarbi retropozicijai. Dėl šių priežasčių daugelis Alu sekų turi mažas galimybes daugintis.

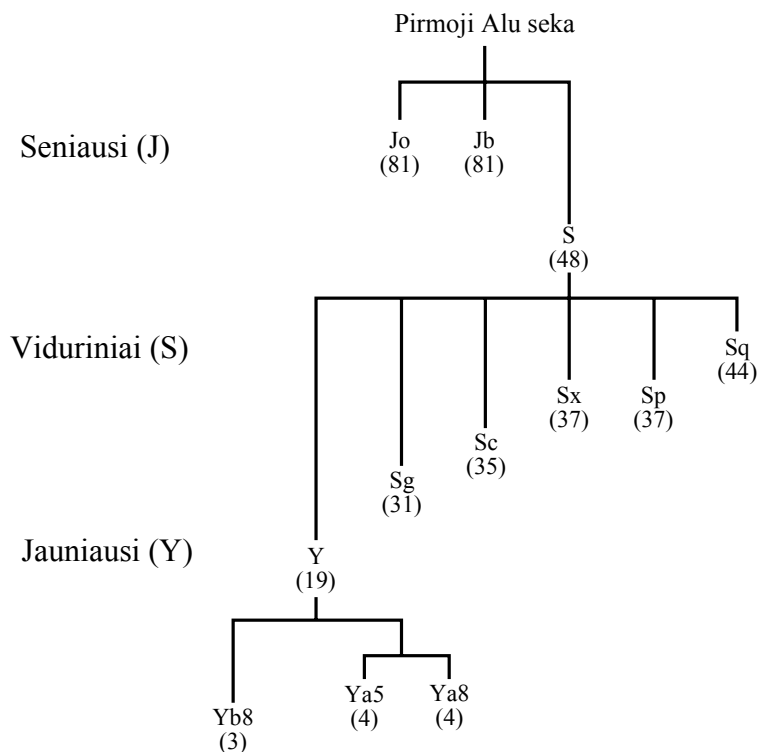


104 pav. 7SL RNR geno ir Alu retropozono sandara. 7SL RNR geno transkripcija vyksta nuo vidinio RNR polimerazės III promotoriaus (A) ir enhancerio (EN). Alu seka turi sudėtingesnį RNR polimerazės III promotorių (A + B). RNR polimerazės III vykdomos transkripcijos nutraukimas įvyksta TTTT sekoje. Alu retropozonas sudarytas iš dviejų dalių, kurios šiek tiek skiriasi. 3' segmente yra 31 bp intarpas. Pilna Alu seka dar turi 3' oligo(dA) uodegą. Alu centre yra A turtinga sritis. Įsiterpusį elementą iš abiejų pusių supa trumpos vienakryptės pasikartojančios sekos (žali trikampiai), kurios susidaro elemento įsiterpimo metu dėl sekos taikinio padvigubėjimo. biol.lfl.cuni.cz/ucebnice/en/repetitive_dna.htm

Mutacijos, kurios įvyksta „genuose pradininkuose“, perduodamos jų kopijoms. Todėl taip atsiranda Alu sekų pošeimiai (105 pav.). Pagal jų pobūdį ir pokyčių skaičių galima nustatyti, kada susidarė vienas ar kitas toks pošemis. Evoliuciškai senesnėse Alu sekų grupėse tokių svarbių sistematinio požiūriu mutacijų yra mažiau, tačiau jose daugiau atsitiktinių mutacijų.

Žmogaus genome Alu sekų pagausėjimas vyko evoliucijos eigoje nevienodu greičiu. Didysis šių sekų plitimas vyko maždaug prieš 40 mln. metų. Nuo to laiko jų retropozicijos dažnis sumažėjo bent dviem eilėmis. Šio reiškinio priežastys aiškinamos tik hipotezėmis. Manoma, kad galbūt žmogaus genomas surado priemones apriboti šių elementų transpozicijos dažnį, arba tuo, kad genome visos tinkamos įsiterpimo vietos jau yra užimtos. Tik žmogui būdingi Alu pošeimiai sudaro labai nedidelę (0,5 proc.) mūsų genome esančių Alu sekų populiacijos dalį. Įsiterpusios kai kurios Alu sekos sukelia genų mutacijas, tačiau beveik visos mutacijos, kurios lieka, yra neutralios. Kai kurios Alu sekos įsiterpė į tam tikras genomo vietas visai neseniai, todėl žmonių genomai Alu sekomis skiriasi. Tai vadinama Alu intarpų polimorfizmu. Tokios polimorfiškos sekos aptinkamos tik kai kuriose žmonių populiacijose

arba tik kai kuriose šeimose. Tokių Alu sekų yra apie 1200. Jos lemia žmonių genetinį polimorfizmą ir tiriamos aiškinantis žmonijos kilmės ir demografijos klausimus. Individai, kurių Alu sekų polimorfizmas vienodas, yra bendros kilmės. Žinant Alu biologijos ypatybes, tikimybė, kad žmonių populiacijoje į tą pačią genomo vietą įsiterpė nepriklausomai dvi Alu sekos, lygi 0. Dėl šių priežasčių Alu polimorfizmo tyrimai labai populiarūs ir žmonių populiacijų genetikoje.



105 pav. Alu sekų pošeimiai. Jie skirstomi pagal 16 diagnostinių požymių

Alu sekų intarpai gali sukelti genų raiškos pokyčius, kurie gali pakeisti promotorių metilinimo statusą, suardyti promotorius arba įnešti papildomas reguliacines sekas, pavyzdžiui, kai kuriuose Alu pošeimiuose aptinkamus steroidinių hormonų jungimosi saitus. Lygiagrečiai Alu gali tiesiogiai įsiterpti į koduojančią geno dalį, suardyti ASR, sukelti *nonsens* ar rėmelio poslinkio mutacijas arba sutrikdyti geno splaisingą. Alu sekų intarpai atsakingi už ~0,1 proc. žmogaus ligų (neurofibromatozę, hemofiliją, kai kurias vėžio formas, Aperto sindromą ir kt.).

Alu sekų genome labai daug, todėl tarp jų gali vykti homologinė rekombinacija, kuri gali sukelti delecijas, duplikacijas ir translokacijas. Vienuose genomo lokusuose jos dažnis didesnis nei kituose. Tai, matyt, priklauso ne nuo šių sekų kiekio, bet nuo jų panašumo. Kadangi senesnės Alu sekos yra labiau divergavusios (~20 proc.) viena nuo kitos, tai rekombinacijos tikimybė tarp jų yra mažesnė nei tarp jaunesnių Alu sekų, kurių divergencija sudaro mažiau nei 1 proc. Šiuo požiūriu CpG dinukleotidų motyvų metilinimas ir jų mutacijos yra savotiškas apsauginis mechanizmas nuo homologinės rekombinacijos tarp Alu sekų. Manoma, kad apie 0,3 proc. žmogaus ligų sukelia homologinė rekombinacija tarp Alu retroponų (Batzer ir Deininger, 2002). Homologinės rekombinacijos tarp šių sekų dažnis priklauso ir nuo individo genotipo. Nustatyta, kad individuose, kuriuose pažeistas *TP53* genas, homo-

loginė rekombinacija vyksta dažniau. Alu sekų įsiterpimas į naują vietą gali sukelti skirtumus tarp homologinių chromosomų lokusų, dėl to gali sumažėti krosingoverio dažnis tarp jų. Dėl šios priežasties gali susidaryti genetinis barjeras tarp individų ar populiacijų rūšies viduje. Manoma, kad tai galėjo nulėmti ir naujų rūšių atsiradimą.

3.2.9. JGE panaudojimas

JGE – tai ne tik įdomus genetinis reiškinys, bet ir nepakeičiama priemonė tiriant ir pertvarkant biologinius procesus įvairiuose organizmuose. Transpozonų praktinis panaudojimas įvairiausių gyvų būtybių molekuliniėje genetikoje toks įspūdingas, kad jo neįmanoma pervertinti. Galima teigti, kad JGE naudojami trimis pagrindiniams tikslams: 1) genams įterpti į generatyvines ląsteles; 2) somatinių ląstelių transgenezėje/genų terapijoje; 3) mutagenezėje (Largaespada, 2003).

3.2.9.1. Genų įterpimas į generatyvines ląsteles

Stuburinių gyvūnų generatyvinių ląstelių transgenezė buvo atlikta varliagyvio *Xenopus tropicalis*, zebražuvės (*Dana rario*), pelės (*Mus musculus*) ląstelių kultūrose. Buvo panaudoti transpozonai, aktyvūs stuburiniuose gyvūnuose. Vėliau pritaikytos ir heterologinės sistemos. Pavyzdžiui, į viščiuko generatyvines ląsteles buvo įterptas aktyvus *D. melanogaster* elementas *Mariner*. Transpozonai patogūs tuo, kad į juos įterpti transgenai patenka į recipiento genomą nepatyrę pokyčių. Tai patogu lyginant su linijinės DNR įterpimu mikroinjekcijų metu į pronukleusą. Pastaruoju atveju tokia DNR sudaro konkatamerus ir, įsiterpdama į genomą, patiria įvairius pokyčius. Transpozonų transgenezės trūkumas, kad neįmanoma į vieną lokusą įterpti daug transgeno kopijų. Didesnis kopijų skaičius vertinamas kaip būdas išvengti visiško geno nutildymo. Norint išvengti endogeninių transpozonų mobilizacijos, rekomenduojama stuburinių gyvūnų genų inžinerijoje naudoti evoliuciškai tolimų rūšių JGE.

3.2.9.2. Transpozonų panaudojimas somatinių ląstelių genų inžinerijoje

Transpozonai kaip vektoriai užtikrina stabilų transgeno įsiterpimą į chromosomą. Daugiausia šia linkme dirbama kuriant žmogaus genų terapijos metodus. Transpozonų pagrindu sukurti vektoriai yra mažiau imunogeniški nei virusiniai, todėl labiau tinkami pakartotiniam gydymui. Transpozonų sistemos plačiai naudojamos kuriant pelių linijas, kuriose stipri įvairių onkogenų raiška. Transpozonai vis plačiau naudojami biotechnologijoje. Nors manoma, kad, kuriant transgeninius gyvūnus, kurie gamina svetimus baltymus, geriau naudoti generatyvinių ląstelių transgenezę, tačiau greičiau ir pigiau svetimus genus (monokloninių antikūnų, augimo ir krešėjimo faktorių ir kt.) įterpti į tam tikras didelių gyvūnų somatines ląsteles.

3.2.9.3. Svarbesni stuburinių gyvūnų JGE naudojami genų inžinerijoje

Iš stuburinių retroelementų bene geriausiai ištirti ir, genetiškai modifikavus, genų pernašai pritaikyti yra LINE elementai (Ostertag ir Kazazian, 2001). Žmogaus L1 elemento promotorius aktyvus tik gemalinėse ląstelėse, tačiau L1 transkriptus galima gauti naudojant ir heterologinį promotorių. L1 ret-

ropozonas klonuotas iš hemofilija A sergančio paciento geno, koduojančio faktorių VIII. Elementas buvo pertvarkytas, į jo 3'UTR sritį įterpus atsparumo neomicinui (*Neo*) geną. Toks L1 pagrindu sukurtas vektorius buvo aktyvus žmogaus ir pelės ląstelių kultūrose (Moran ir kt., 1996). Dar viename L1 variante *Neo* genas buvo pakeistas žalio fluorescuojančio baltymo genu (angl. *green fluorescent protein, GFP*). Šiuo atveju transpoziciją galima nustatyti pagal fluorescuojančių ląstelių atsiradimą. L1 sistemos privalumas yra tai, kad naudojant šią sistemą, galima sukelti mutacijas atsitiktine tvarka viename genome. Pagrindinis trūkumas – nedidelis vienai gametai tenkančių intarpų skaičius, kurį lemia tai, kad L1 vektorius netoleruoja didesnio dydžio svetimos DNR. Dažniausiai L1 vektoriai į žmogaus ląsteles, auginamas kultūroje, įterpiami naudojant adenovirusus. Po to vyksta L1 retrotranspozicija į ląstelės genomą.

Dar vienas perspektyvus stuburinių JGE yra transpozonas Tol2, atrastas žuvų genome ir vertinamas kaip labai perspektyvus žuvų genų inžinerijoje. Tol2 – pirmasis stuburinių gyvūnų „cut and paste“ tipo transpozonas. Jo transpozazės geną gali valdyti svetimas promotorius. Pats elementas buvo modifikuotas įterpus į jį genų kasetę (Kawakami ir kt., 2000). Tokia dviejų komponentų sistema gali būti naudojama įvairių genų pernašai. Ji efektyviai panaudota zebražuvės generatyvinių ląstelių transgenezėje. Kol kas nepavyko Tol2 elemento pritaikyti žinduolių ląstelėms.

Tc1/Mariner elementai aptikti visų ligi šiol tirtų stuburinių genomuose, tačiau neaktyvūs dėl mutacijų transpozazės gene. Mariner ir Tc1 transpozazės buvo išgrynintos ir gali būti panaudojamos transpozicijos reakcijoje *in vitro*. Svarbu tai, kad jokio kito baltymo šiai reakcijai vyksti *in vitro* nereikia. Labai nuodugniai ištirti du šios grupės elementai – Mos1 ir Himar1 paplitę vabzdžiuose. Jie veikia ir heterologinėse sistemose. Pavyzdžiui, Mos1 gautas iš *D. mauritania*, tačiau veikia ir geltonąją karštinę platinančiame moskite *Aedes aegypti* (Coates ir kt., 1998). Todėl daug vilčių dedama į šių Tc1/Mariner tipo transpozonų panaudojimą stuburinių gyvūnų genų inžinerijoje. Mos1 jau pavyko įterpti į viščiuko, o Mariner ir Tc3 – į zebražuvės generatyvines ląsteles. Kitas tos pačios grupės elementas – Minos iš *D. hydei* veiklus ir žmogaus ląstelių kultūrose. Šis transpozonas kaip genų gaudyklė panaudotas HeLa ląstelių kultūrose. Jį bandoma pritaikyti ir insercinei mutagenezei žinduolių ląstelėse. Dar vienas įdomus ir perspektyvus Tc1/Mariner šeimos atstovas – *Sleeping Beauty* (SB). Tai dirbtiniu būdu, panaudojant neveiklius laišinių žuvų genomo elementus, sukurtas transpozonas. Tai pirmasis stuburinių transpozonas, kurį pavyko atkurti iš neveiklių endogeninių elementų. Ši atkūrimo procedūra buvo labai sudėtinga, ją sudarė 10 žingsnių, todėl gautas elementas pavadintas SB10. Neblogų rezultatų gauta naudojant šiuos transpozonus somatinių ląstelių genų inžinerijoje. Į SB transpozoną klonuotas faktoriaus IX genas buvo įterptas į hemofilija B sergančių pelių liniją. Kad efektas būtų ilgalaikis, nuolat reikia įterpti transpozoną su minėtu genu ir plazmidę, turinčią aktyvų transpozazės geną. Panašus reikšmingas laimėjimas gautas įterpus *FAH* geną į pelių, sergančių tirozinemija, kepenų ląsteles bei *LAMB3* geną į žmogaus odos ląstelių kultūrą, paimtą iš paciento, sergančio *epidermolysis bulbosa* sin-

dromu. Taip pat sukurti binariniai vektoriai, kuriais adenovirusai įneša į žmogaus hepatocitų ląsteles tiek SB transpozoną, tiek SB10 transpozazę ir užtikrina laikiną transgeno raišką (Yant ir kt., 2002).

3.2.9.4. Transpozonų panaudojimas mutagenezėje

Transpozonai plačiai naudojami *D. melanogaster* ir augalų mutagenezėje. Pavyzdžiui, jau nuo 1982 m. šiam tikslui jie naudojami vaisinėje muselėje (Spradling ir Rubin, 1982; Walbot 2000). Transpozonai mutagenezėje patogūs tuo, kad jie kartu pažymi ir įsiterpimo vietą. O cheminiai ar fiziniai mutagenai sukeltų pažeidimų vietose nepalieka lengvai aptinkamų pėdsakų. Vis dėlto, ypač eukariotuose, transpozono įsiterpimas į geną ne visada sąlygoja akivaizdų fenotipo pokytį. Tai lemia eukariotams būdingas genų funkcijų perteklius (angl. *functional redundancy*) arba ankstyvas letalus fenotipas. Siekiant įveikti šiuos sunkumus, buvo sukurti modifikuoti transpozonai, kurie turi geną reporterį ir (ar) tam tikras reguliacines sekas. Jiems įsiterpus į genus arba šalia jų, indukuojama geno reporterio raiška. Tokie JGE pagrindu sukurti vektoriai vadinami genų gaudyklėmis, kurios būna trijų rūšių: 1) enhancerių (angl. *enhance* – didinti, stiprinti); 2) promotorių ar 5' geno dalies; 3) poliadenilimo signalo ar 3' geno dalies.

Enhancerių gaudyklės turi reporterinį geną su labai silpnu promotoriumi. Įsiterpus tokiam vektoriui greta recipiento geno, gaudyklėje esantį geną-reporterį veiks originalaus geno enhanceriai. Tai sukels geno-reporterio raišką ir leis atrinkti klonus, kuriuose transpozono vektorius įsiterpė greta genų. Pirmiausiai tokie modifikuoti JGE buvo panaudoti vaisinėje muselėje ir pelėje (Furth ir kt., 1994; Duffy 2002). Promotorių ar 5' geno dalių gaudyklės buvo sukurtos retrovirusų pagrindu ir išbandytos pelių embrioninėse kamieninėse ląstelėse. Vektoriai turėjo splaisingo akseptorių, už kurio buvo įterptas atsparumo antibiotikui (puromicinui, G418) genas. Šiuo atveju įsiterpimą į recipiento geną galima nustatyti pagal sulieto baltymo atsiradimą. Poliadenilimo sekų ar geno 3' galų gaudyklės turi vidinį promotorių, kuris valdo geną-reporterį arba atsparumo antibiotikui geną, už kurio įstatytas splaisingo donoras, bet nėra splaisingo akseptoriaus ar poli(A) sekos. Jeigu vektorius įsiterpia į DNR sritį be genų, geno reporterio koduojamas baltymas nesusidaro, nes transkriptas nėra nei karpomas, nei poliadenilinamas. Dėl to RNR transkriptas yra nestabilus ir neeksportuojamas iš branduolio. Jeigu vektorius įsiterpia į geną ir dar ta pačia geno orientacijai kryptimi, tai įvyksta žemiau esančių egzonų splaisingas ir susidaro stabilus sulietas poliadenilintas transkriptas. Taigi šiuo atveju yra reporterinio geno raiška. Taip galima atrinkti ląstelių klonus, kurie turi transpozono tarpus genuose, net jeigu nėra genų raiškos embrioninėse kamieninėse ląstelėse įprastomis sąlygomis.

Transpozonai plačiai panaudojami augalų funkcinėje genomikoje. Kukurūzuose buvo atrasti šie JGE: Ac, Supressor-Mutator/Enhancer (Spm/En) ir Mutator (Mu). Jiems giminiški elementai aptikti ir kitose augalų rūšyse: pavyzdžiui, Tam3 aptiktas *Antirrhinum majus*; Tag1 – *A. thaliana*; Slide1 – *Nicotiana tabacum*. Visi šie elementai giminiški Ac. Endogeniniai transpozonai buvo panaudoti klonuojant kukurūzų, žioveinio, petunijos genus. Kai kurių šių transpozonų šeimininko genome yra nemažas

kopijų skaičius. Pavyzdžiui, kukurūzų genome yra per 100 Mu kopijų. Tai panaudojama didelės apimties mutagenezei vykdyti. Tačiau kartais tai sukelia ir nepatogumų, nes tame pačiame genotipe yra daug naujų transpozono intarpų, kurie sunkina rezultatų analizę. Mu šeima – viena sėkmingiausiai panaudotų šio pobūdžio darbuose. Ją sudaro autonominis elementas MuDR bei neautonominiai elementai Mu1 ir Mu8. Panaudojus šiuos elementus, klonuota keletas kukurūzų genų. Šios šeimos elementai šokinėja į naują vietą 20–50 proc. dažniau nei Ac ir Spm. Be to, naujai atsiradę aleliai gana stabilūs. Tačiau iki šiol nepavyko panaudoti šios šeimos JGE kitose augalų rūšyse. 1986 m. pirmąkart augalų transpozoni panaudoti heterologinėje sistemoje. Įrodyta, kad kukurūzų Ac/Ds elementas gali būti aktyvus *N. tabacum*. Vėliau jis pritaikytas mutagenezei ir kitose augalų rūšyse: vairyne, ryžiuose, pomidoruose, petunijoje, linuose, morkose, liucernoje, bulvėse ir kt. Kitose rūšyse gali veikti ir Spm/En bei Tag1 elementai.

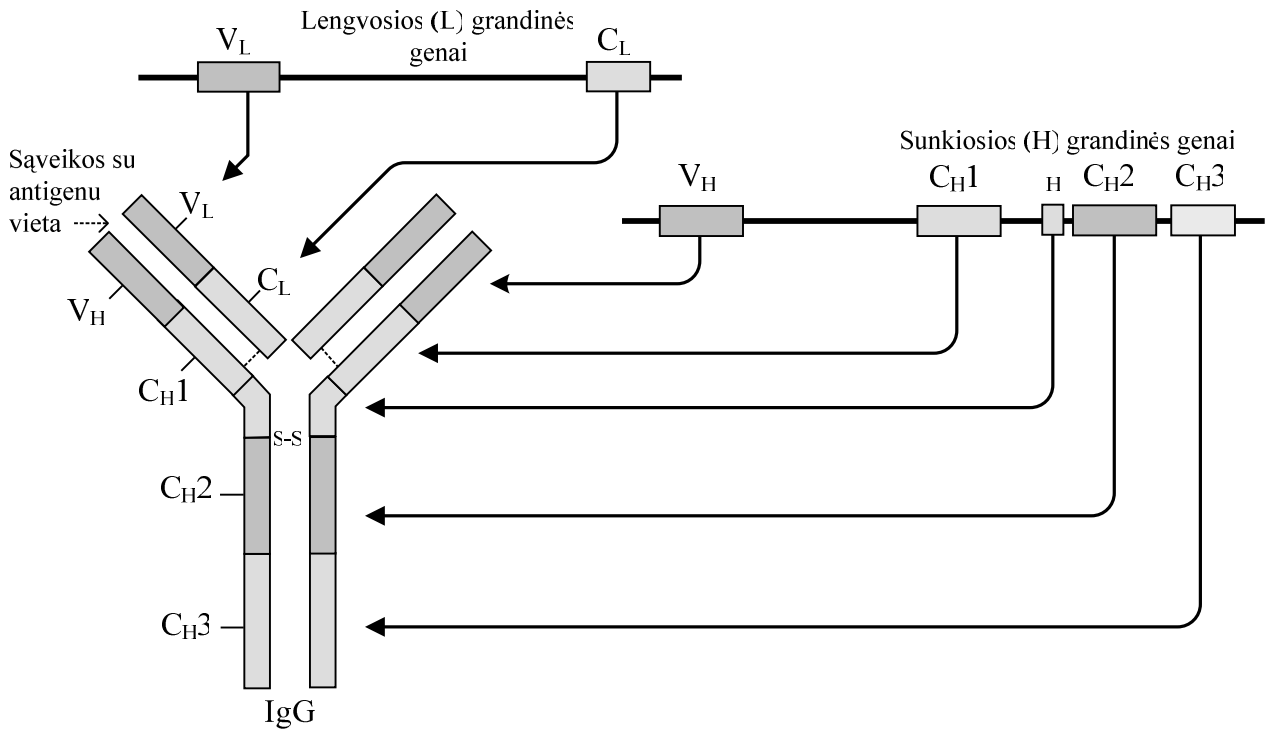
Augalų retrotranspozoni taip pat sukelia savaimines mutacijas ir išlieka labai stabilūs naujoje vietoje. Be to, skirtingai nuo DNR transpozoni jie peršoka į labai tolimas genomo sritis. Tačiau jų transpozicijos dažnis augaluose labai mažas. Vienas perspektyviausių yra ryžių retrotranspozoni Tos17. Jis aktyvuojasi audinių kultūrose gana dideliu dažniu ir sukelia stabilius interpus.

Pateikti kai kurie JGE praktinio pritaikymo pavyzdžiai. Šių molekulių išskirtinės savybės rodo, kad šie elementai bus labai svarbūs gyvūnų ir augalų genų inžinerijoje bei genų terapijoje.

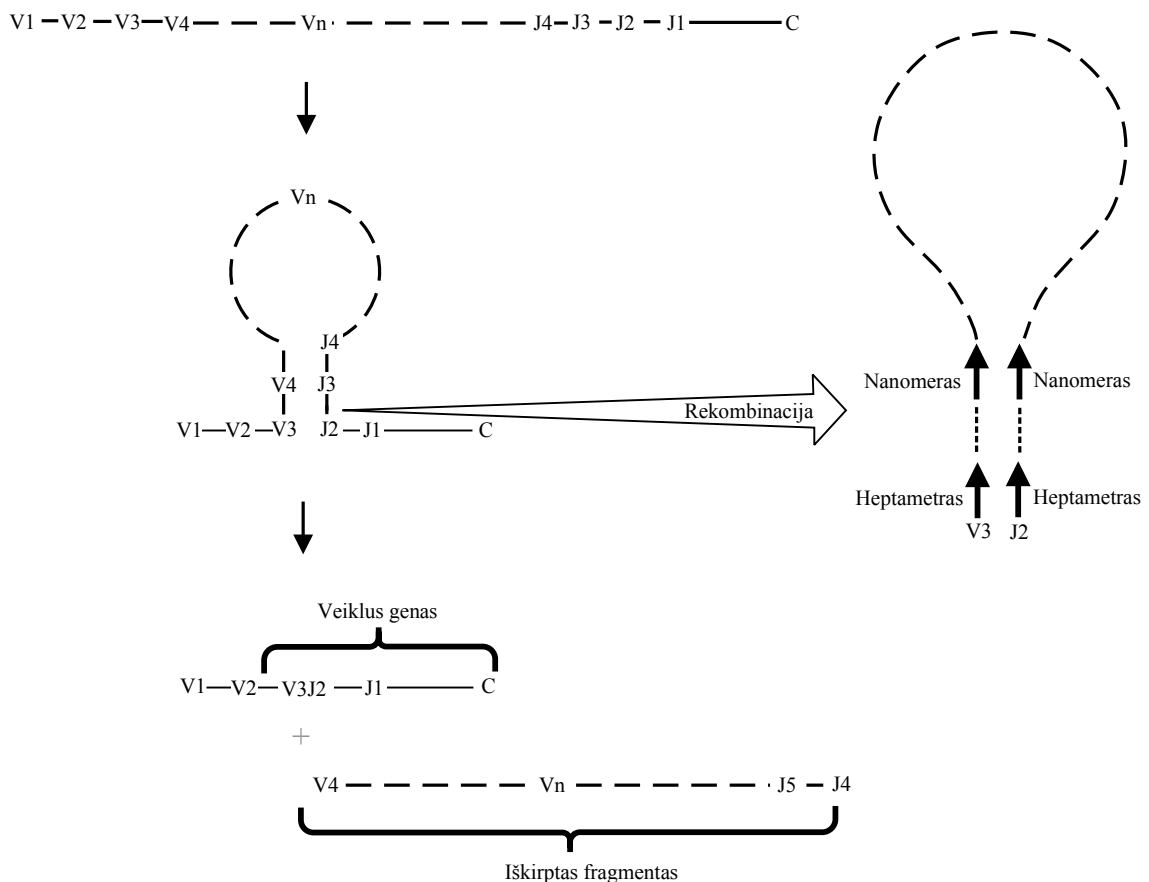
4. V(D)J rekombinacija

4.1. Pagrindinės V(D)J rekombinacijos savybės

V(D)J rekombinacija – tai rekombinacija tarp *variable* (liet. – kintamas), *diversity* (liet. – įvairovė) ir *joining* (liet. – jungtis) genų segmentų, ypač svarbi stuburinių gyvūnų imunitetui. Ji nulemia T ir B limfocitų receptorių bei sekretuojamų imunoglobulinų (Ig) įvairovės susidarymą (Brandt ir Roth, 2002). Šios molekulės svarbios atpažįstant svetimus baltymus, patekusius į žmogaus ir kitų stuburinių gyvūnų organizmą. Ši somatinė rekombinacija vyksta T ir B limfocitų raidos metu. Antigeno atpažinimą nulemia variabilusis imunoglobulino ar receptoriaus molekulės rajonas, kurio koduojamosios sekos susidaro dėl V(D)J rekombinacijos (106 pav.). Kiekviename T ir B limfocitų ląstelėje susidaro vis kitokia imunoglobulino geno variabilioji dalis. Žinomi septyni lokusai, dėl kurių rekombinacijos susidaro T ir B limfocitų antigenų receptorių įvairovė (Jung ir kt., 2006). Jiems priklauso Ig sunkiosios grandinės lokusas (*IgH*) ir du lengvosios grandinės lokusai (*Igκ* ir *Igλ*), kurie koduoja B limfocitų antigenų receptorių bei sekretuojamus antikūnus, taip pat keturi T ląstelių receptorių lokusai β , δ , α , γ . Geriausiai Ig genetika ištirta pelėje. Šis organizmas turi tris Ig lokusus. Vienas koduoja sunkiąją Ig grandinę, o du – lengvąją. Kiekviename lokuse yra pastovioji ir variabilioji dalis. Pastarojoje yra įvairūs skaičius V, D, J segmentų. Kad susidarytų veiklus genas, konkretūs vieno ar kito tipo segmentai turi būti sujungti betarpiškai (107 pav.). Pelės *IgH* lokusas yra maždaug 3 Mbp dydžio ir aptinkamas netoli 12-os chromosomos galo. Jame yra per 150 V_H geno segmentų, 12-13 D_H ir 4 J_H . Panaši ir žmogaus *IgH* lokuso variabiliosios dalies struktūra. Vykstant sunkiosios grandinės lokuso persitvarkymui, vienas iš D_H segmentų sujungiamas su koku nors J_H segmentu. Po to vienas iš daugelio V_H segmentų prijungiamas prie D_HJ_H . Kiekvienas toks segmentas apsuptas trumpų sekų, vadinamų rekombinacijos signalinėmis sekomis (angl. *recombination signal sequence*, *RSS*). Šias sekas atpažįsta baltymai, vadinami RAG1 ir RAG2 (angl. *recombination activating gene*). Veikdami kartu jie sukelia dvigrandžius trūkius. Ši rekombinacija ypatinga tuo, kad jos metu vyksta specifinių sekų atpažinimas ir netikslus DNR galų susidariusių proceso metu, sujungimas.

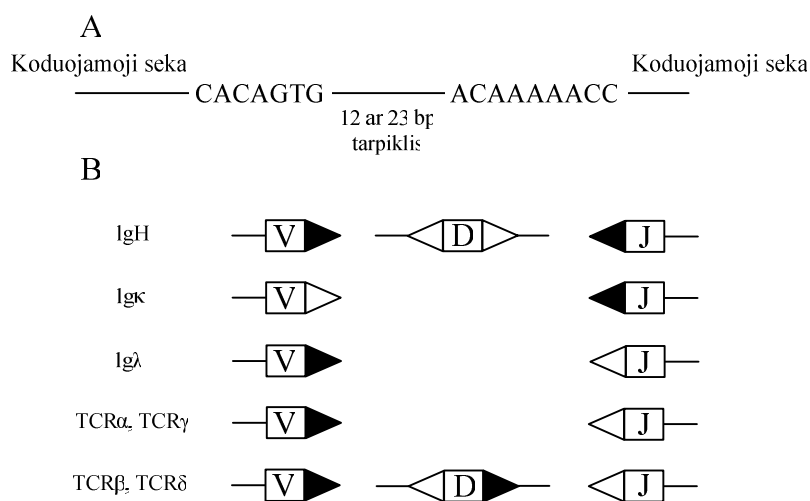


106 pav. Imunoglobulino (Ig) molekūlės sandara ir genai. Ig arba antikūnai sudaryti iš dviejų sunkiųjų (50–70 kDa) ir dviejų lengvųjų (22 kDa) grandinių. Sunkiosios ir lengvosios grandinių NH₂ galas yra variabilus. Jam būdinga unikali aminorūgščių seka. Šis baltymo rajonas specifiskai sąveikauja su antigenu (pagal Passarge, 1995)



107 pav. V(D)J rekombinacija lemia dalies genetinės medžiagos praradimą. Rekombinacijoje dalyvauja specifinės RSS sekos, supančios kiekvieną geno V, (D), J segmentą

RSS yra dviejų tipų. Kiekvieną jų sudaro vidutinio konservatyvumo sekos iš septynių (heptameras) ir devynių (nanomeras) nukleotidų, atskirtos viena nuo kitos mažiau konservatyviu tarpikliu iš 12 arba 23 bp (Gellert, 2002). DNR molekulės skaldymas ir rekombinacija vyksta riboje tarp heptamero ir koduojamosios sekos. Dėl rekombinacijos dalis genetinės medžiagos yra prarandama, o po DNR galų subrandinimo nehomologinės rekombinacijos būdu tarpusavyje sujungiamos koduojamosios skirtingų genų segmentų sekos (susidaro vadinamoji koduojamoji jungtis) ir heptameras prie heptamero (signalinė jungtis). Ląstelėje rekombinacija vyksta tarp signalinės sekos, turinčios 12 bp tarpiklį, ir kitos, turinčios 23 bp tarpiklį. Šis reiškinys vadinamas 12/23 taisykle. V_H ir J_H genų segmentus supa 23 bp *RSS*, o D_H iš abiejų pusių – 12 bp *RSS*. Todėl 12/23 taisyklė lemia, kad didžiausia dalis *IgH* lokuso persitvarkymų, kuriuose dalyvauja V_H geno segmentai, turės D_H geno segmentą, įterptą tarp V_H ir J_H genų segmentų (108 pav.). Panaši tvarka galioja ir kituose lokusuose. Pavyzdžiui, *IgK* lokuse visi V segmentai sujungti su 12bp *RSS*, o J segmentai su *RSS*, turinčiomis 23 bp tarpiklį. Todėl V ir J sujungimas vyksta daug efektyviau nei V ir V , ar J ir J sujungimai, kuriems įvykus nesusidaro ASR. Signalinių sekų atpažinimas, minėtos taisyklės įgyvendinimas ir DNR molekulių skaldymas priklauso nuo RAG baltymų. *RSS* stuburiniuose gyvūnuose labai konservatyvios. Tie patys motyvai aptinkami įvairiose rūšyse – nuo ryklio iki žmogaus.

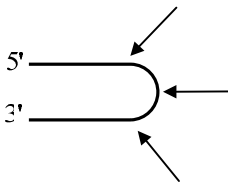


108 pav. A – rekombinacijos signalinės sekos (*RSS*); B – jų išdėstymo tvarka antigenų receptorių lokusuose; (pagal Gellert, 2002)

Kaip parodė mutagenezės eksperimentai, tam tikri pokyčiai šiose sekose visgi toleruojami. Svarbiausi yra trys nukleotidai, esantys heptamere prie rekombinacijos saito. Mutacijos kitose heptamero vietose leidžia vyksti rekombinacijai. Nanomeras labiau variabilus nei heptameras (Gellert, 2002). Rekombinacija tarp toje pačioje molekulėje esančių *RSS* yra 1000 kartų efektyvesnė nei tarp esančių skirtingose molekulėse. Ląstelėse tokių tarpchromosominės rekombinacijos atvejų nustatyta limfoidinio audinio augliuose, tačiau jie yra reti.

Koduojamosios ir signalinės jungčių sandaros tyrimai atskleidė tiek jų susidarymo skirtumus, tiek paties rekombinacijos proceso kai kurias ypatybes. Signalinės jungtys dažniausiai yra tikslios ir susida-

ro susijungus heptamerams galais. Nedidelis šių jungčių skaičius gali turėti keleto nukleotidų tarpus tarp heptamerų galų. Koduojamosios jungtys – labai įvairios. Dažnai jos būna praradusios keletą nukleotidų nuo vienos ar abiejų koduojamųjų sekų galų arba turi papildomų nukleotidų, kurių nebuvo pradinėje DNR, tarpus. Visi šie pokyčiai labai svarbūs antigenų receptorių įvairovei susidaryti, nes koduojamoji jungtis lemia Ig ir TCR jungimosi su antigenu saito struktūrą. Kadangi ši jungtis yra atsitiktinės sandaros, tai apie 2/3 tokių jungčių yra netinkamos, kadangi sukelia rėmelio poslinkius arba priešlaikinį baltymo sintezės nutraukimą. Jeigu pirmasis persitvarkymas nesėkmingas, galimi ir vėlesni. Koduojamosios jungties susidarymo metu papildomi nukleotidai gali būti įterpti dvejopai: 1) terminalinė deoksinukleotidiltransferazė (TdT) gali prijungti 15 visiškai naujų (nematricinių) nukleotidų. Nukleotidų prijungimui prie DNR galų dalyvaujant šiam fermentui, nereikia DNR matricos. Nematricinių tarpų koduojamosiose jungtyse neaptinkama pelėse, kurių TdT genas išjungtas. 2) nukleotidai įjungiami į koduojamąsias jungtis pagal matricą. Rekombinacijoje šis būdas svarbesnis. Vadinamieji P (palindrominiai) nukleotidų tarpai susidaro ant paskutiniųjų koduojamosios sekos bazių prie pat RSS. Jų susidarymo mechanizmą nulemia „segtuko“, esančio koduojamosios jungties gale, suskaldymo pobūdis. Jeigu RAG baltymai segtukus skaldo ne simetriškai centre, tai gaunami išsikišę viengranžiai DNR galai, kurie prieš sujungimą ar jo metu paverčiami dvigranžiais (109 pav.). Todėl koduojamojoje jungtyje gali susidaryti trumpi palindromai. Daug mažiau žinoma apie nukleotidų praradimą susidarant šio tipo jungtims. Manoma, kad čia dalyvauja viena ar kelios endonukleazės (Gellert, 2002).



109 pav. Galimos “segtukų”, susidarančių V(D)J rekombinacijos metu, skaldymo vietos

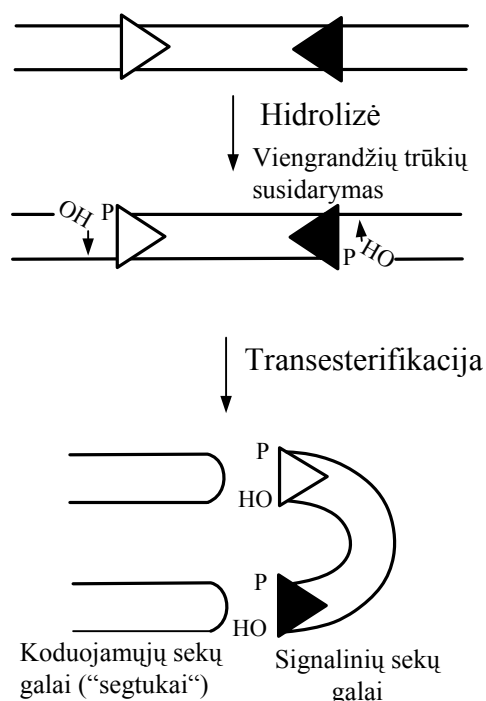
Ląstelėse, kuriose vyksta V(D)J rekombinacija, aptinkama daugiau nesujungtų signalinių galų nei koduojamųjų. Todėl galima manyti, kad pastarieji sujungiami greičiau. Pavyzdžiui, pelių timocituose *TCRδ* lokuse aptinkama 1000 kartų daugiau signalinių galų nei koduojamųjų. Tačiau pelės ląstelėse, turinčiose *scid* mutaciją, abiejų tipų galų randama maždaug vienodai. Tai rodo, kad veikiant šiai mutacijai sutrinka koduojamųjų jungčių susidarymas.

V(D)J rekombinacijos stadijos: 1) RAG1 ir RAG2 baltymai, veikdami kartu kaip rekombinazė, atpažįsta RSS, vykdo jų sugretinimą pagal 12/23 taisyklę bei skaldo DNR riboje tarp heptamero ir greta esančios koduojamosios sekos; 2) sujungiami DNR galai nehomologinės rekombinacijos būdu.

4.1.1. RAG rekombinazė ir jos genai

RAG1 ir RAG2 baltymai būdingi tik limfinėms ląstelėms. Visi kiti rekombinacijai reikalingi veiksniai nėra tokie specifiški ir būdingi visoms ląstelėms. Pelėse su išjungtais *Rag1* ar *Rag2* genais V(D)J rekombinacija visiškai nuslopinta. Tokiose pelėse nėra subrendusių B ar T ląstelių. Kadangi jo-

kių kitų sutrikimų tokiose pelėse nepastebėta, tai rodo, kad šie genai veikia tik imuninėje sistemoje. *RAG* lokuso struktūra labai savita. Visose tirtose rūšyse šie genai yra greta vienas kito, tačiau orientuoti priešpriešine kryptimi. Daugelyje genomų (*Xenopus*, viščiuko, pelės ir žmogaus) jie neturi intronų. Todėl spėjama, kad stuburiniuose gyvūnuose šie genai yra transpozoninės kilmės. Pradedant žuvimis, visų stuburinių *Rag1* ir *Rag2* genai labai panašūs. Žemesniuose eukariotuose V(D)J rekombinacija nevyksta, juose nėra ir panašių genų. Rekombinacijai vykti būtina abiejų baltymų kooperacija. Įdomu tai, kad, pašalinus didelius abiejų genų fragmentus, jų koduojami baltymai išlieka aktyvūs. Tačiau pastebėta, kad nors tokie sutrumpinti baltymai efektyviai vykdo rekombinacijos pradžią, baigiamajame etape atsiranda sutrikimų. Todėl manoma, kad pašalintos baltymų dalys svarbios rekombinacijai valdyti.



110 pav. RAG baltymų vykdomas DNR skaldymas. Pirmiausia baltymai katalizuoja viengrandžių trūkių susidarymą. Po to OH grupės, esančios trūkio 3' gale, atakuoja kitą DNR molekulės grandį, vyksta transesterifikacijos reakcija ir viengrandžiai trūkiai paverčiami dvigrandžiais. Dėl to susidaro du segtukai ir du buki DNR galai (Gellert, 2002)

Dažniausiai DNR skaldymo reakcija buvo tiriama naudojant sutrumpintus šių baltymų variantus, nes sveiki baltymai buvo netirpūs ir (ar) neaktyvūs. Šie baltymai skaldo RSS esant Mn^{2+} arba Mg^{2+} jonams. Tačiau Mg^{2+} jonai labiau tinka tada, kai yra RSS pora, o Mn^{2+} pakanka skaldyti pavienėms RSS jungtims. Pirmiausia, RAG1/RAG2 vykdomos reakcijos metu sukeliama viengrandis trūkis kiekvienos RSS signalinio heptamero 5' gale ir susidaro 5'-P RSS gale bei 3'-OH koduojamosios sekos gale. Po to 3'-OH grupė sąveikauja su antrąja tos pačios molekulės grandimi ir susidaro segtukas koduojamosios jungties gale bei bukas signalinės jungties galas (110 pav.). Reakciją, ypač 23-RSS skaldymą, skatina chromosomos HMG1 ir HMG2 baltymai. Tai nespecifiškai su DNR sąveikaujančios molekulės, kurios geba jungtis prie DNR ir ją išlenkti. Šie baltymai bei nespecifinė DNR taip pat skatina RAG1 ir RAG2 jungtis prie 12/23 RSS poros (palyginti, pavyzdžiui, su 12/12 RSS pora).

4.2. DNR galų susijungimas V(D)J rekombinacijos metu

DNR galų susijungimas V(D)J rekombinacijos metu turi daug panašumų, palyginti, su DGT šalinimu nehomologinės rekombinacijos būdu. Vis dėlto neaiškumų čia yra daugiau nei RAG baltymų katalizuojamoje trūkių susidarymo stadijoje. Svarbiausi veiksniai, dalyvaujantys susidarant koduojamajai ir signalinei jungtims, yra nuo DNR priklausoma proteinkinazė (DNR-PK), DNR ligazė IV, Xrcc4, Artemidė (Artemis), histonas H2AX ir Mre11/Rad50/Nbs1 baltymų kompleksas (Fugnann ir kt., 2000; Gellert, 2002).

DNR-PK – tai baltymų kompleksas, kurį sudaro katalizinis subvienetas (DNR-PK_{CS}) ir Ku baltymų heterodimeras (Ku70 ir Ku80). Šis baltymas priklauso serino/treonino proteinkinazių šeimai. Jo vaidmuo V(D)J rekombinacijoje paaiškėjo tiriant pelės *scid* mutaciją. Ši mutacija sukelia pelių imunodeficitą, jose sutrinka V(D)J rekombinacija, DGT reparacija ir padidėja jautrumas JS. Mutacija yra įvykusi pelės DNR-PK_{CS} gene. Tokių pelių ląstelėse labiausiai sutrinka koduojamųjų jungčių susidarymas. *Scid* ląstelėse kaupiasi segtukai, kartais koduojamosiose jungtyse aptinkamos didelės delecijos arba neįprastai ilgi palindromai. Tai rodo, kad DNR-PK_{CS} dalyvauja skaldant segtukus koduojamųjų sekų galuose.

Ku baltymų veiklos pažeidimai taip pat trukdo vykti V(D)J rekombinacijai. Ku baltymai, kaip heterodimerai, jungiasi prie DNR galų, DNR segtukų ir viengrandžių tarpų. Manoma, kad šie baltymai padeda ligazei IV/Xrcc4 sujungti bukus arba beveik bukus DNR molekulių galus.

Dar du veiksniai, dalyvaujantys V(D)J rekombinacijoje, DNR ligazė IV ir Xrcc4 buvo nustatyti genetiškai. Xrcc4 sudaro kompleksą su ligaze IV, stabilizuoja šį baltymą *in vivo* bei skatina jo aktyvumą *in vitro*. Ląstelių linijos, kuriose pažeistas vieno ar kito baltymo genas, išgyvena, tačiau yra jautrios JS, jose nesusidaro koduojamosios ir signalinės jungtys. Pelės, kuriose pašalintas kuris nors iš šių genų, nugaišta vėlyvoje embriono stadijoje dėl didelių nervų sistemos raidos sutrikimų.

Vieną iš žmogaus T-B-SCID (angl. *severe combined immune deficiency*) lemia mutacijos baltymo Artemis gene. Genui suteiktas graikų deivės Artemidės (vaikų ir gyvūnų globėjos) vardas, prasmingai atspindi jo kaip genomo „sargo“, funkciją (Brandt ir Roth, 2003). Šio baltymo kompleksas su DNR-PK_{CS} dalyvauja „segtukų“, kurie yra koduojamųjų sekų galuose, skaldyme. Artemis turi egzozonukleazės ir endozonukleazės aktyvumą, kurie rekombinacijos metu priklauso nuo fosforilinimo. Pastarąjį atlieka DNR-PK_{CS} (Drouet ir kt., 2006).

H2AX histonas yra vienas iš H2A histono variantų. Žinduolių ląstelėse jis sudaro nuo 2 iki 25 proc. H2A histono kiekio. Nustatyta, kad jis susidaro įvykus DNR trūkiams, atsirandantiems V(D)J rekombinacijos metu.

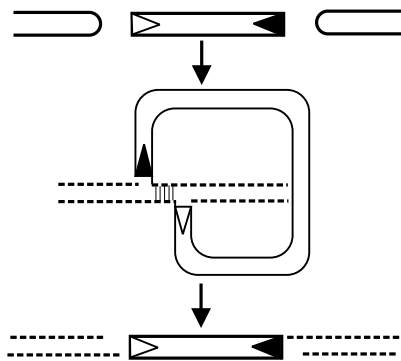
4.3. V(D)J rekombinacijos valdymas

V(D)J rekombinaciją valdo RAG1/2 baltymai bei rekombinacinio aparato sąveika su DNR. *Rag1* ir *Rag2* genai veikia tik limfinių ląstelių raidos pradžioje. Daugiausia RAG2 baltymo susintetinama ląstelės ciklo G1 stadijoje. Tokiais RAG2 susidarymo pokyčiais galima paaiškinti, kodėl V(D)J rekombinacija daugiausia vyksta šioje ciklo stadijoje. Netgi limfinėse ląstelėse, kuriose reiškiasi *Rag1* ir *Rag2* genai, tik nedidelė dalis RSS sekų yra prieinamos rekombinacijos aparatui. Tai priklauso ir nuo ląstelės tipo. Nors rekombinacijos procesas vyksta B ir T ląstelėse, tačiau Ig genai visiškai persitvarko tik B, o TCR genai – tik T ląstelėse. Be to, persitvarkymas vyksta tam tikra tvarka: *IgH* lokusas persitvarko anksčiau nei Ig lengvosios grandinės lokusai, o *TCRβ* – anksčiau nei *TCRα*. Rekombinacijos sekų prieinamumas priklauso nuo chromatinio struktūros, transkripcijos enhancerių ir kt. Yra nemažai eksperimentinių patvirtinimų, kad kai kurios transkripciją reguliuojančios sekos (transkripcijos enhanceriai) labai svarbios V(D)J rekombinacijai. Vienas geriausiai ištirtų šiuo požiūriu reguliatorių yra introne esantis μ enhanceris (*iE μ*), kuris aptinkamas tarp paskutiniojo *J_H* geno segmento ir *C μ* egzono. Dirbtinai sukelta su *iE μ* sąveikaujančių E2A ir EBF raiška aktyvuoja *D_H* ir *J_H* rekombinaciją nelimfoidinėse ląstelėse. Taip pat įrodyta, kad *iE μ* gali sukelti šių genų segmentų rekombinaciją transgeninėje DNR. Visiškai pašalinus *iE μ* , *D_H* ir *J_H*, rekombinacija sumažėja maždaug trečdaliu: apie 30 proc. periferinių B limfocitų turi nepakitęs *IgH* lokusą. Tai rodo, kad rekombinacijos aktyvacijai reikalingi ir kiti veiksniai.

V(D)J rekombinacijos saitų prieinamumą veikia ir įvairios chromatinio modifikacijos. Svarbūs ir chromatiną permodeliuojantys kompleksai, pavyzdžiui, SWI/SNF, kurie padaro genomine DNR, prieinamą RAG rekombinacijos aparatui (Jung ir kt., 2006).

4.4. RAG1/2 vykdoma DNR sekų transpozicija

RAG baltymų vykdomos cheminės reakcijos tyrimai rodo, kad šie baltymai veikia labai panašiai kaip DNR transpozazės. RAG1/2 katalizuojamas segtuko susidarymas yra tiesioginė transesterifikacijos reakcija, labai panaši į tą, kurią vykdo vaisinės muselės JGE *Hobo*, kukurūzų Ac/DS, žioveinio Tam3 ir kt. RAG katalizuojamai transpozicijai reikia 12 ir 23 RSS poros, kad jų apsuptas DNR fragmentas būtų perneštas į naują vietą (111 pav.). Tačiau ne visais atvejais į seką-taikinį įsiterpia abu tokios judrios DNR galai.



111 pav. RAG baltymų katalizuojama reakcija. Reakcijos metu susidaro du buki RSS galai, kurie sąveikauja su kita DNR. Reakcijai vykti reikalingos 12 ir 23 bp ilgio tarpiklius turinčios RSS (Gellert, 2002).

RAG baltymų transpozazės savybės leido geriau įsivaizduoti V(D)J rekombinacijos evoliuciją ir kilmę. Jau seniai (1979) japonų mokslininkai, remdamiesi RSS sekų sandaros ypatybėmis, iškėlė hipotezę, pagal kurią jos primena invertuotas sekas transpozonų galuose (Gellert, 2002). Šis požiūris dar labiau sustiprėjo, kai buvo nustatyta *RAG* lokuso struktūra. Jo kompaktiškumas, dviejų intronų neturinčių struktūrinių genų artumas priminė transpozonus. Paplitimas stuburiniuose gyvūnuose, pradedant kremzlinėmis žuvimis ir baigiant žinduoliais, taip pat rodo šių genų galimą transpozoninę kilmę. Kadangi žemesnieji eukariotai neturi nei panašių genų, nei jiems giminiškų sekų, manoma, kad *RAG* lokusas pateko į stuburinius iš nežinomo organizmo horizontalaus perdavimo būdu. Galbūt toks senovinis transpozonas, sudarytas iš *RAG* genų ir juos supančių sekų pateko į stuburinių gyvūnų protėvio genomą. Po to sekos ir genai buvo atskirti ir transpozicija tapo neįmanoma.

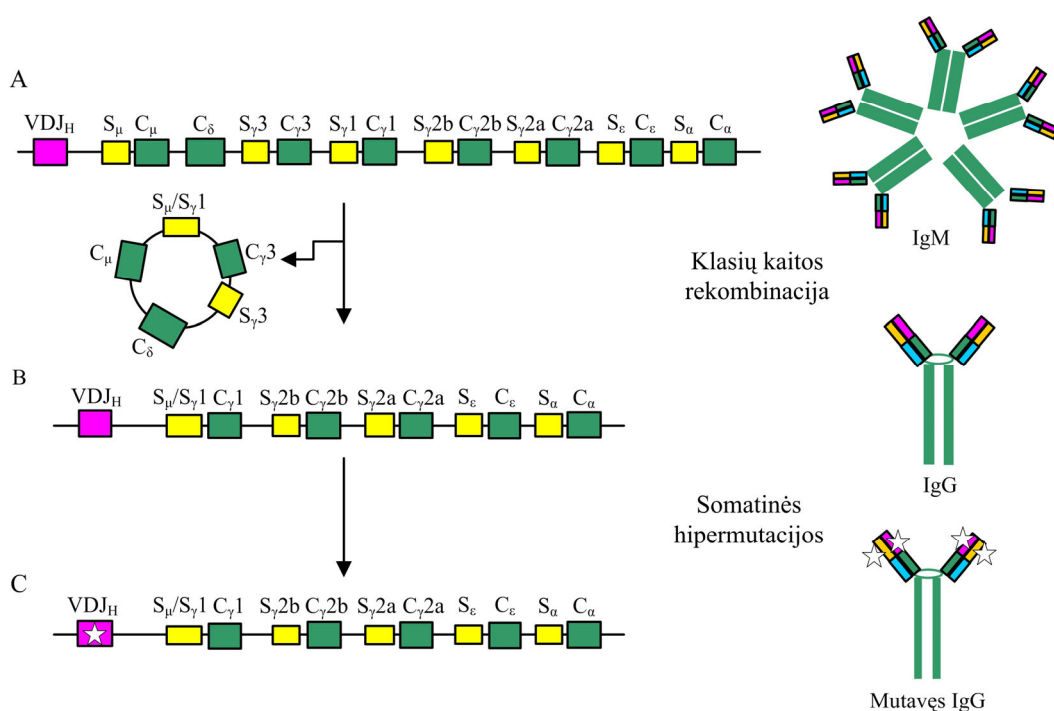
5. Antikūnų klasių kaitos rekombinacija

Antikūnų klasių kaitos rekombinacija (KKR) yra imunoglobulinų genų persitvarkymo procesas, kuriam įvykus, daugelis B limfocitų vietoje vienos klasės antikūnų pradeda gaminti kitos klasės antikūnus. Vieną ar kitą antikūnų klasę nulemia imunoglobulinų genų sunkiosios grandinės pastovusis rajonas (C), jame esantys genai (106 ir 112 pav.). Šios rekombinacijos metu imunoglobulinų sunkiosios grandinės variabilieji rajonai, susidarę dėl V(D)J rekombinacijos ir koduojantys sąveikos su antigenais vietas, prijungiami prie persitvarkiusio chromosomos rajono, kuris koduoja pastoviąją (C) imunoglobulino grandinės dalį. Visos B ląstelės antikūnų gamybą pradeda sintetindamos IgM molekules, kurios įsijungia į plazminę membraną ir veikia kaip antigenų receptoriai. Šiuo atveju variabiliosios dalies genų segmentai būna prisijungę prie pastoviosios dalies $C\mu$ geno segmento. Vykstant KKR, $C\mu$ segmentas pakeičiamas vienu iš žemiau esančių $C\gamma$, $C\epsilon$ ar $C\alpha$ segmentų, kurie koduoja atitinkamai IgG, IgE ir IgA antikūnus. Tokia rekombinacija reikalinga sukurti imunoglobulinų genus, kurių reikia geresnei apsaugai nuo įvairių rūšių patogenų. Didelio afiniškumo antikūnai IgG ir IgA yra svarbūs neutralizuojant virusus ir slopinant mikroorganizmų dauginimąsi. Individai, kurie negeba savo organizme gaminti šių antikūnų, suserga hiper-IgM (HIGM) sindromu. Jų organizmas neįveikia bakterijų ir virusų, pacientai anksti miršta.

Iki sąveikos su antigenu antikūnų įvairovę lemia jau minėta V(D)J rekombinacija. Po sąveikos su antigenu bei padedant ląstelės T helperiams, B limfocitai patenka į periferinių limfoidinių organų germinalinčius centrus ir virsta centroblastu B ląstele. Čia vyksta antroji antikūnų diversifikacijos banga, tik šį kartą somatinių hipermutacijų (SHM) ir (ar) genų konversijos būdu vėl tame pačiame V rajone (Li ir kt., 2004). Dėl šios genų pertvarkos susidaro didelio afiniškumo antigenų surišimo vietos imunoglobulinų molekulėse. Somatinės hipermutacijos dažniau aptinkamos žinduoliuose, o geno konversija – kai kuriuose paukščiuose. Toje pačioje centroblastu B ląstelėje vyksta ir antikūnų klasių kaitos rekombinacija. Tiek SHM, tiek KKR dažniausiai vyksta Ig genuose, tačiau retkarčiais šie persitvarkymai gali vykti ir kituose genuose – tai viena iš dažniausių B ląstelių limfomų priežasčių. Žmogaus ląstelėse SHM dažnis maždaug milijoną kartų viršija spontaninių mutacijų dažnį. Dažniausiai vyksta bazių pakaitos, nors retkarčiais pasitaiko insercijos bei delecijos.

KKR vyksta chromosomos viduje tarp $C\mu$ segmento S ($S\mu$) sekos ir žemiau esančių S sekų. Jos vadinamos atitinkamai donoro ir akceptoriaus sekomis. Jų dydis svyruoja nuo 1 kbp iki 12 kbp. Jų aptinkama prieš kiekvieną C rajoną, išskyrus $C\delta$ (112 pav.). Pelės genome akceptoriaus sekomis gali būti $S\gamma3$, $\gamma1$, $\gamma2b$, $\gamma2a$, ϵ ar α , esančios 12-oje chromosomoje, o žmogaus $S\gamma3$, $\gamma1$, $\alpha1$, $\gamma2$, γ , ϵ ar $\alpha2$, esančios 14-oje chromosomoje. T ląstelių-pagalbininkų sintetinami limfokinai, sąveikaudami su B ląstelėmis, aktyvuoja atskirų S sekų promotorius. Kadangi šios sekos nieko nekoduoja, susidaręs transkriptas vadinamas steriliu. Jis, manoma, sudaro RNR-DNR hibridą su matricine DNR seka ir taip atveria viengrandę nematricinės DNR sritį, kurios ilgis gali siekti apie 1 kbp (Shinkura ir kt., 2003). Toks darinys

vadinamas R kilpa. Ji, manoma, svarbi KKR ir linkusi mutuoti. KKR vyksta intronuose ir nepažeidžia translacijos skaitymo rėmelio. Rekombinacijos taškai dažniausiai aptinkami įvairiose *S* sekų vietose, labai retai – už jų ribų. *S* sekos sudarytos iš pratėgiui pasikartojančių pentamerų (dažnai GAGCT ir GGGGT) arba 49 bp sekos. *S* sekos pasižymi nevienodu homologijos laipsniu, tačiau KKR vyksta ne pagal homologinės rekombinacijos modelį. Rekombinacijos vietose homologijos saito dydis yra tik 1–4 nt. Homologijos nebuvimas ir *S* sekų polimorfizmas sunkina KKR mechanizmo tyrimą. Taigi pateikta įvairių aiškinimų. Paprasčiausias modelis teigė, kad vyksta DNR skaldymas ir sujungimas. *S* rajonuose sukeliama DGT arba vienas nuo kito netoli esantys VGT (Kataoka ir kt., 1980). Iš tikrųjų tokius trūkius pavyko aptikti B ląstelių *S* sekose KKR metu. 1988 m. pasiūlytas kilpos iškirpimo modelis: teigiama, kad KKR metu susidaro keturi laisvi DNR galai, kurie gali būti įvairiai sujungti. Rekombinacijos metu susidaro žiedinė ekstrachromosominė DNR. Tokių molekulių buvo aptikta limfocitų ląstelėse (Jessberger ir kt., 1996). Kadangi ilgą laiką nepavyko nustatyti, kokie baltymai sukelia trūkius šiose vietose, todėl pradėta *S* sekų atpažinimą aiškinti antrinių struktūrų susidarymu (Maizels 1999; Manis ir kt., 2002).

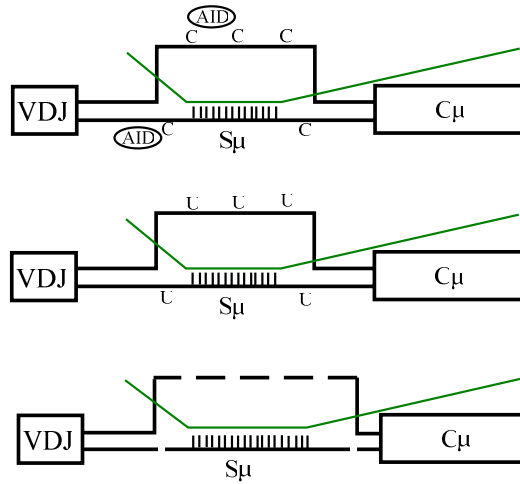


112 pav. Klasių kaitos rekombinacija (KKR) ir somatinė hipermutacija imunoglobulinų sunkiosios grandinės lokuse. A – pelės sunkiosios grandinės lokusas (kairėje) po V(D)J rekombinacijos koduoja μ sunkiąją grandinę. Jos determinuojami IgM antikūnai (dešinėje) yra penkianariai, sudaryti iš imunoglobulinų molekulių, turinčių dvi sunkiasias ir dvi lengvasias grandines. B – KKR sujungia naują pastovųjį rajoną su variabiliuoju V(D)J rajonu, ir pradedami sintetinti naujos klasės antikūnai (dešinėje). Parodyta klasių kaita iš $C\mu$ į $C\gamma 1$ ir dėl to susidarantys IgG1 antikūnai. C – somatinės hipermutacijos modifikuoja tiek sunkiosios, tiek lengvosios grandinės sekas. Hipermutavę antikūnai pasižymi didesniu giminiškumu antigenams. Žvaigždutės žymi mutacijas genuose ir pokyčius baltymuose. KKR ir SHM vyksta panašiu metu, nors paveiksle SHM ir parodyta vėliau <http://genomebiology.com/content/figures/gb-2000-1-4-reviews1025-1.jpg>

Žmogaus ir pelės *S* sekos turtingos GC, o viena DNR grandinė ypač turtinga G. Tai palanku sudaryti G4 DNR. Tačiau varliagyvių ląstelėse *S* rajonai, nors taip pat sudaryti iš nehomologiškų pasi-

kartojančių sekų, tačiau turtingi AT. Taigi šis modelis susiduria su rimtais prieštaravimais. Eksperimentais nustatyta, kad *S* sekos reikalingos klasių kaitos rekombinacijai. Pašalinus didžiąją dalį pelės *Sμ* rajono pasikartojančių sekų, KKR dažnis labai sumažėja. Šiuolaikinius KKR modelius galima suskirstyti į dvi grupes (Manis ir kt., 2002). Vienuose modeliuose pripažįstamas tiesioginis *S* sekų transkripcijos vaidmuo rekombinacijoje, kituose jos vaidmuo netiesioginis. Be to, rekombinazės ar kito baltymo, sukeliančio trūkius *S* sekose, klausimas visą laiką buvo aktualus. Tik 1999 m. buvo atrastas AID (angl. *activation-induced cytidine deaminase*) baltymas (Muramatsu ir kt., 1999). Šis baltymas reikalingas ne tik KKR, bet ir SHM bei geno konversijai imunoglobulinų genuose vykti. AID veikia tik centroblasto B ląstelėje. Pelių ląstelėse, neturinčiose šio baltymo geno, visiškai nevyko KKR ir SHM. Jose nustatytas padidėjęs IgM, kuri gamina aktyvuoti B limfocitai, kiekis. Panašūs sutrikimai aptinkami ir žmonėse. Tokie pacientai suserga HIGMII sindromu. O viščiuko DT-40 ląstelių linijoje, kurioje AID genas neveikia, negalėjo vykti geno konversija. Ektopinė AID geno raiška sukelia SHM neįprastoje pelės B limfocitų raidos stadijoje, ji vyksta ir kitose ląstelėse, netgi gali sukelti SHM *E. coli*. Tai rodo, kad AID yra vienintelis B ląstelėms būdingas baltymas, kuris reikalingas KKR ir SHM (Li ir kt., 2004). AID homologiškas apolipoproteino B mRNR redaguojančio fermento kataliziniam polipeptidui 1 (APOBEC-1). Pastarasis baltymas sait-specifiškai deaminina citidiną į uracilą *apoB* mRNR molekulėje ir sukuria priešlaikinį *stop* kodoną. Dėl to susidaro trumpesnis baltymas, kuris jungiasi prie kito receptoriaus nei pradinis jo variantas. AID sąveikauja su DNR ir deaminina citozino liekanas joje. Eksperimentais nustatyta, kad vgDNR molekulėje AID deaminina dC į dU. Tačiau panašaus aktyvumo neturi dgDNR ir DNR-RNR hibridinėse molekulėse. Deamininti citozinai, veikiant tam tikriems reparacijos mechanizms, *S* sekose taip subrandinami, kad susidaro DGT (113 pav). Taigi AID sukelia daug DGT *S* rajonuose. Kai susijungia du skirtingi *S* rajonai, įvyksta KKR. Kitais atvejais *S* sekose įvyksta delecijos ar translokacijos. DGT reparacijos baltymai (ATM, 53BP1, H2AX) reikalingi tokiems nutrauktiems DNR galams atpažinti. Jų sujungime svarbiausias vaidmuo tenka nehomologinių DNR galų sujungimo baltymams (DNR-PKcs, Ku70/80 ir kt.). Pelėse su neveikiančiais pavieniais *Ku70*, *Ku80*, *DNR-PKcs* ar *H2AX* genais aptinkami dideli KKR sutrikimai (Li ir kt., 2004). Chromatino struktūra ir jo modifikavimas taip pat svarbūs ankūnų klasių kaitos rekombinacijai.

KKR modelis dar nėra išbaigtas. Pagal jį susintetinta ir subrandinta centroblasto B ląstelių citoplazmoje AID deaminazė keliauja į branduolį, kur sąveikauja su V ir S rajonų vgDNR ir deaminina dC į dU. Taip susidaro nesuporuoti nukleotidai. Jie gali būti ištaisyti į pradinį variantą arba gali įvykti mutacija, pavyzdžiui, dU gali pašalinti uracilo N-glikozilazė (UNG) ir susidarys abazinis saitas, kuris svarbus KKR, nes konvertuojamas į viengrandį trūkį dalyvaujant AP-endonukleazei. Iš viengrandžių trūkių R kilpos vietoje, manoma, susidaro ir DGT, kurie jau šalinami NGS būdu (113 pav.). Transkripcijos vaidmuo KKR betarpiškai susiję su AID veikimu. Jos metu susidaro R kilpa ir vgDNR, kuri yra deaminazės substratas.



113 pav. AID baltymo vaidmuo susidarant DGT *S* sekose. Pavaizduota $C\mu$ geno *S* seka, kurioje susidariusi R-kilpa. Dėl AID veikimo viengrandės DNR molekulėse C deamininamas iki U, o pastarąjį pašalina UNG baltymas, sukurdamas abazinį (apirimidinį) saitą. Pastarąjį skaldo AP endonukleazė ir sukelia viengranį tūkį. Tokių VGT visuma nulemia DGT atsiradimą *S* sekoje. DGT ištaisomas NGS būdu, kas ir nulemia KKR (Yu ir Leeber, 2003)

Neseniai atlikti tyrimai rodo, kad KKR gali vykti mutantinėse ląstelių linijose, kuriose AID baltymas pakeistas mielių I-Sce endonukleaze, o *S* sekos prieš μ ir γI genus – endonukleazės atpažinimo saitais (Zarrin ir kt., 2007). Todėl šiai rekombinacijai ypač svarbu, kad tam tikrose vietose susidarytų DGT, kuriuos evoliuciškai nulėmė AID ir ląstelės reparacijos sistemos veikla. Daug sudėtingiau atsakyti į klausimą, kodėl pirmiausia sujungiami dideli ($C\mu$ ir $C\gamma I$ atveju 100 kbp) atstumu nutolę DNR fragmentai. Galbūt tai lemia B ląstelėms specifiška IgH lokuso struktūrinė organizacija, arba tai priklauso nuo DGT atpažįstančių ir jo subrandinime dalyvaujančių baltymų savybių.

6. Nedėsningoji (nehomologinė) rekombinacija

Nedėsningoji rekombinacija vyksta tarp DNR (RNR) sekų, turinčių labai mažą (keleto nukleotidų) homologiją arba neturinčių jokios. Nedėsningosios rekombinacijos dažnis įvairiuose organizmuose labai skiriasi. Bakterijose nedėsningosios rekombinacijos dažnis labai nedidelis – 10^{-7} – 10^{-8} , o žinduolių ir augalų ląstelėse ši rekombinacija yra daug efektyvesnė už homologinę. Mielių ląstelėse šis skirtumas mažesnis ir homologinės rekombinacijos dažnis apie 10 kartų viršija nedėsningosios dažnį. Kodėl egzistuoja tokie skirtumai, neaišku. Be to, homologinės ir nedėsningosios rekombinacijos „indėlis“ aukštesniųjų eukariotų ląstelėse labai priklauso nuo ląstelės būsenos, ląstelės ciklo stadijos ar net ląstelių tipo.

6.1. Nedėsningoji rekombinacija bakterijose

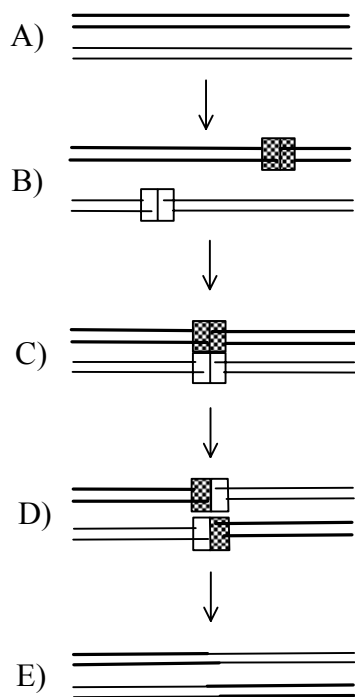
1967 m. N. Franklin pirmoji pradėjo tyrinėti šį reiškinį bakterijų ląstelėse. Ją sudomino tam tikrų delecijų susidarymas *E. coli* ląstelėse. Minėtų delecijų dažnis nepriklausė nuo ląstelės homologinės rekombinacijos (*rec*) sistemos genų. Patį vyksmą N. Franklin apibūdino kaip „retus, atsitiktinius rekombinacinius įvykius, nereikalaujančius homologijos“. Franklin (1971 m.) pasiūlė du aiškinimus, kaip gali atsirasti tos spontaniškos, nuo *recA* nepriklausančios, delecijos:

1. DNR replikacijos klaidos, kurias sukelia replikacinės šakutės „slystelėjimai“. Vykstant DNR replikacijai, tam tikrose DNR sekose gali susidaryti kilpos ar „segtukai“, kuriuos replikacinė šakutė gali praleisti, „prašokti“. Taip naujai susintetintoje DNR grandinėje gali susidaryti delecijos.
2. Baltymų, skaldančių ir vėl sujungiančių DNR, veiklos klaidos. Baltymai gali „suklysti“ ir skaldyti DNR neįprastose vietose arba gali netaisyklingai sujungti nutrauktas DNR molekules.

Nedėsningąją rekombinaciją tyrę mokslininkai eksperimentais patvirtino Franklin hipotezių teisingumą. Pavyzdžiui, Farabough ir kt. (1978 m.), tirdami delecijų susidarymo dėsninumus, nustatė, kad jos susijusios su trumpų (3 – 20 bp) vienakrypčių pasikartojančių sekų buvimo vietomis. Tokių sekų DNR retkarčiais prarandama ir po replikacijos bakterijos chromosomoje būdavo viena pasikartojančia seka mažiau.

Tarp baltymų, su kurių veikla siejama nedėsningoji rekombinacija, svarbausi – DNR topoizomerazės. Jų vaidmuo buvo intensyviai tirinėjamas ir įrodyta, kad topoizomerazės dalyvauja nedėsningoje rekombinacijoje. 1981 m. šiuos darbus pradėjo H. Ikeda ir kolegos (Ikeda ir kt., 1982). Jie sukūrė neląstelinę sistemą nedėsningajai rekombinacijai tarp nehomologiškų molekulių (λ ir pBR322) tirti panaudojant bakteriofago λ morfogenezę *in vitro* *E. coli* ekstraktuose. Į reakcijos mišinį įdėta plazmidė pBR322, kurios vienas iš genų lemia atsparumą ampicilinui. Aptikta, kad $1,3 \times 10^{-7}$ dažniu susidarydavo fago dalelės, turinčios atsparumo ampicilinui geną. Rekombinantinių fagų išėiga padidėdavo, jei-

gu į pakavimo mišinį būdavo įpilama oksolininės rūgšties. Atlikus tokių fagų DNR analizę, nustatyta, kad įvyko nedėsningoji rekombinacija tarp fago ir plazmidės DNR molekulių. Ištyrus šį reiškinį paaiškėjo, kad nedėsningosios rekombinacijos priežastis yra DNR girazės klaidos. Šis fermentas sukelia laikinus dvigrandžius DNR molekulių trūkius, po to vėl sujungia DNR molekulių galus. Sąveikoje su DNR dalyvauja du GyrA ir du GyrB subvienetai. Tačiau kartais sujungiami ne tie DNR molekulių galai. Taip gali susidaryti nehomologiškų fago ir plazmidės molekulių hibridai. Kadangi oksolininė rūgštis slopina girazės vykdomą DNR molekulių sujungimą, klaidų tikimybė šiuo etapu padidėja ir nedėsningosios rekombinacijos dažnis išauga. Ikeda ir kt. manė, kad nedėsningosios rekombinacijos mechanizmą galima paaiškinti reakcijoje dalyvaujančių girazės molekulių subvienetų mainais (114 pav.). DNR girazės dalyvavimas nedėsningojoje rekombinacijoje buvo nustatytas ir *Bacillus subtilis* ląstelėse. Panašius DNR persitvarkymus sukelia įvairios topoizomerazės (fago T4 topoizomerazė II, eukariotų topoizomerazė II, topoizomerazė I). Aprašyti atvejai, kai „klysta“ ir kiti baltymai (M13 geno II baltymas, fago λ integrazė, Tn3, Mu transpozazės ir kt.).



114 pav. Girazės dalyvavimo nedėsningojoje rekombinacijoje modelis, grindžiamas fermento subvienetų mainų hipoteze (Ikeda ir kt., 1982). A – DNR dupleksai be baltymų; B – stačiakampiai girazės subvienetai A ir B. Du suglausti vienspalviai stačiakampiai atitinka įprastą fermento struktūrą, sudarytą iš dviejų A ir dviejų B subvienetų (A_2B_2); C – girazės-DNR kompleksas sąveikauja su kitu tokiu pat baltymo ir DNR kompleksu ir sudaro tetramerinį darinį A_4B_4 ; D – tetramerinės formos disociacija į dimerinę gali vykti per apsikeitimą skirtingų fermentų subvienetais ir sukelti DNR grandinių mainus bei nedėsningą rekombinaciją; E – rekombinantinės DNR molekulės

6.2. Nehomologiškas DNR galų susijungimas (NGS) bakterijose

Tik 2002 m. atrastas šis savitas nedėsningosios rekombinacijos reiškinytis bakterijose (Weller ir kt., 2002). Iki tol manyta, kad toks DNR galų sujungimo būdas būdingas tik eukariotams. Tiesa, šiek tiek anksčiau buvo aptikti žinduolių Ku baltymų ir ligazės IV homologai kai kuriose bakterijose (Aravind ir Koonin, 2001; Doherty ir kt., 2001). Pirmiausia *B. subtilis* nustatytas YkoU baltymas, homologiškas žinduolių Ku70/Ku80 heterodimerui, taip pat YkoV, turintis nedidelį panašumą su žinduolių DNR ligaze IV. Kiek vėliau *Mycobacterium tuberculosis* aptikti baltymai, kurie dalyvauja šio tipo rekombinacijoje. Genetiniai ykoU ir ykoV mutantų tyrimai parodė, kad jie buvo jautresni JS, tačiau normaliai reagavo į UV spindulius ir alkilinančių medžiagų poveikį. Tai rodo, kad minėti batymai dalyvauja JS sukeltų DGT šalinime. Be to, nustatyta, kad šie baltymai nesusiję su homologine rekombinacija, nes *recA*⁻ykoU⁻dvigubi mutantai buvo jautresni JS nei pavieniai mutantai. Ku iš *M. tuberculosis* su DNR sąveikauja kaip homodimerai, kurie jungiasi prie linijinės DNR galų. Be to, jie tiesiogiai sąveikauja su DNR giraze ir skatina DNR galų susijungimą (Wilson ir kt., 2003).

Bakterijose kaip ir mielėse (žr. 6.3.4. skirsnį), neaptikta DNR-PKcs. Taigi šis nehomologiškų DNR galų susijungimo sistemos komponentas atsiranda vėlesniuose evoliucijos etapuose. Be to, ir kitų NGS baltymų aptinkama ne visose bakterijų rūšyse (10 lentelė).

10 lentelė. NGS komponentai įvairiose bakterijų taksonominėse grupėse (Wilson ir kt., 2003)

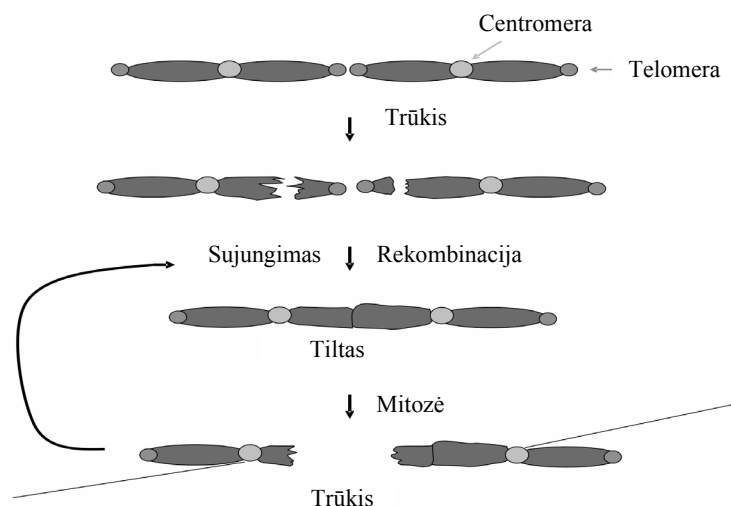
Sisteminė padėtis	Rūšis	K	L	P	N
Archaea					
Archaeoglobi	<i>Archaeoglobus fuldigus</i>	+	+	-	-
Methanococci	<i>Methanosarcina sp.</i>	-	+	-	+
Bacteria					
Actinomycetales	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	+	+	+	+
	<i>Mycobacterium leprae</i>	-	-	-	-
	<i>Streptomyces coelicolor</i>	+	+	+	+
Bacteroidetes	<i>Cytophaga hutchinsonii</i>	+	+	+	+
Firmicutes					
Bacillales	<i>Bacillus sp.</i>	+	+	+	-
	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	+		+	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Clostridia	<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	+	+	+	+
	<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-	-
Alphaproteobacteria					
Rhizobiales	Kelios rūšys	+	+	+	+
Sphingomonadales	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	+	+	+	+
Betaproteobacteria	<i>Burkholderia fungorum</i>	+	+	+	+
	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	-	-	-
Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas sp.</i>	+	+	+	+
	<i>Xanthomonas sp.</i>	+	+	+	+
	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-

K – Ku baltymai, L – DNR ligazė, P – praimazė, N – nukleazė.

6.3. Nedėsningoji rekombinacija eukariotuose

6.3.1. Nehomologiškas DNR galų susijungimas

Pagrindinis nedėsningosios rekombinacijos mechanizmas eukariotuose yra NGS (angl. *non-homologous end joining* – *NHEJ*). Šis mechanizmas labai efektyvus ir šalina bet kokius DGT, atsiradusius aukštesniųjų eukariotų ląstelėse. Pirmoji tai pastebėjo McClintock 1940 m. pradžioje, tirdama kukurūzų mitozę. Jeigu kukurūzų ląstelė paveldi DGT turinčią chromosomą, kuri po to dalyvauja DNR replikacijoje, tai trūkio galai (kurių po replikacijos bus du) labai veiksmingai sujungiami tarpusavyje ir susidaro dicentrinė chromosoma. Tokia chromosoma bus vėl nutraukta kitoje mitozėje, vėl regeneruos trūkusius galus ir vėl susidarys nauja dicentrinė chromosoma. Kitos mitozės metu vėl atsiras dvigrandis trūkis chromosomoje, nes dvi jos centromeros bus traukiamos į priešingus ląstelės polius (115 pav.). Toks trūkio-sujungimo-tilto (angl. *breakage-fusion-bridge*) ciklas kartosis daugybę kartų iki prie nutrūkusio chromosomos galo neprisijungs telomerinės sekos.



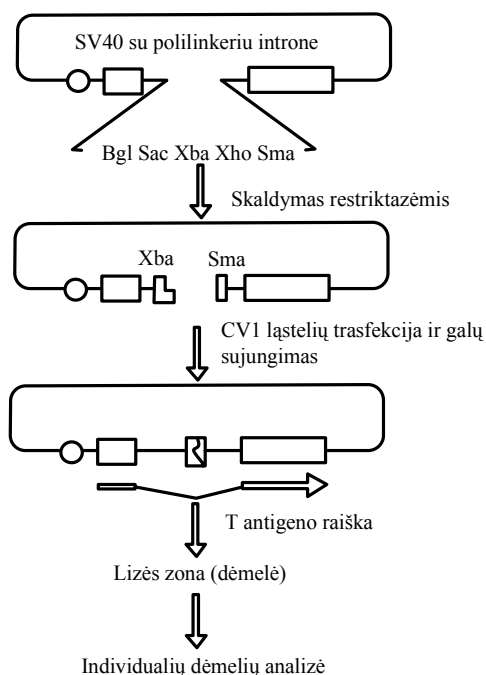
115 pav. Trūkio-sujungimo-tilto ciklas kukurūzų ląstelėse

D. Roth ir J. Wilson tyrė DNR galų susijungimą beždžionių ląstelėse. P. Pfeiffer panašius tyrimus atliko *Xenopus* kiaušinio ekstraktuose. Kaip parodė pirmieji tokio pobūdžio tyrimai, tarpusavyje gali būti sujungti įvairūs DNR molekulių galai (pavyzdžiui, bukas ir „lipnus“), kurie neturi jokios homologijos arba turi tik keletą nukleotidų (1 – 5 nt) homologiją. Tyrimais įrodyta, kad svetimų DNR įsiterpimas į žinduolių ląstelių genomą vyksta gana lengvai ir nepriklauso nuo sekų tarpusavio panašumo. Nemaža dalis šios krypties tyrimų buvo atlikta su SV40 transfekcija į auginamas beždžionių ląsteles. SV40, kurio genomą (5,2 kbp) yra dvigrandės DNR pavidalo, turi tam tikrų privalumų tokiems darbams atlikti:

1. Kai SV40 genomą yra linijinis, viruso gyvenimo ciklas negali prasidėti iki tol, kol galai nebus sujungti ir nesusidarys žiedinė DNR molekulė. Todėl, įterpus į ląstelę linijinę SV40 DNR, galima įvertinti jos gebėjimą sujungti šių DNR molekulių galus.

2. Kadangi SV40, būdamas aktyvus, sukelia lizės zonų susidarymą ant ląstelių gazono, tai vieno ar kito tipo DNR galų sujungimo efektyvumą galima įvertinti statistiškai. Kiekviena tokia lizės zona yra individualaus SV40 klonų, atsiradusio po galų sujungimo, šaltinis. SV40 DNR galų struktūrą galima keisti panaudojant restrikcijos endonukleazes. Todėl, padauginus atskirą kloną, galima iširti, kas įvyko DNR molekulėje jos galų sujungimo metu.
3. SV40 T antigeno intronas nesvarbus viruso dauginimuisi ir ląstelių lizei. Į šią 350 bp dydžio sritį galima įkelti polilinkerį ir restriktazių pagalba sukurti įvairius SV40 DNR galus.

Tyrimo strategija, naudojant SV40 modelį, pavaizduota 116 paveiksle. Kaip minėta anksčiau, šie tyrimai parodė, kad tarpusavyje gali susijungti labai įvairūs DNR molekulių galai.



116 pav. Įvairios sandaros DNR galų sujungimo tyrimas panaudojant SV40

6.3.2. Nehomologiško DNR galų sujungimo mechanizmai

DGT susidaro dėl fosfodiesterinių jungčių trūkių abiejose DNR molekulės grandinėse. Juos gali sukelti jonizuojamoji spinduliuotė, tam tikros cheminės medžiagos (pavyzdžiui, kai kurie priešvėžiniai vaistai). Dvigrandžių trūkių gali atsirasti ir spontaniškai DNR replikacijos metu. Ląstelėje susidarantys laisvieji radikalai taip pat gali sukelti DGT. Dvigrandžiai trūkiai susidaro mejozės profazėje, taip pat limfinių ląstelių raidos metu – vykstant V(D)J rekombinacijai. Judrieji genomo elementai taip pat gali sukelti DGT. Pasak kai kurių mokslininkų, žinduolių ląstelėje per dieną susidaro bent 10 DGT (Harber, 2000). Nors DGT sukurti DNR galai topologiškai primena natūraliai egzistuojančius linijinių chromosomų galus (eukariotų telomerus), ląstelė juos vertina nevienodai. DGT – labai pavojingos pažeidos, nes laiku nepašalintos ar neteisingai ištaisytos gali sukelti ląstelės žūtį arba ją paversti vėžine. Kad apsisaugotų nuo šių pavojų, ląstelėse atsirado įvairiausių DGT šalinimo mechanizmų. Trys pagrindiniai DGT šalinimo mechanizmai yra jau mūsų aptarta homologinė rekombinacija, viengrandžių

galų susijungimo būdas bei NGS. Nors evoliuciniu požiūriu tai labai konservatyvūs mechanizmai, tačiau jų vaidmuo šalinant DGT labai skiriasi žemesniuosiuose ir aukštesniuosiuose eukariotuose. Žinduolių ląstelėse DGT ištaisomi NGS ir HR būdu, mielėse dominuoja HR. Kokių būdu bus ištaisyti DGT, priklauso ir nuo organizmo raidos stadijos bei ląstelės ciklo stadijos. Pavyzdžiui, raidos pradžioje ir ląstelės ciklo G2 stadijoje šalinant DGT svarbesnė yra HR (Postawa ir Blasiak, 2003).

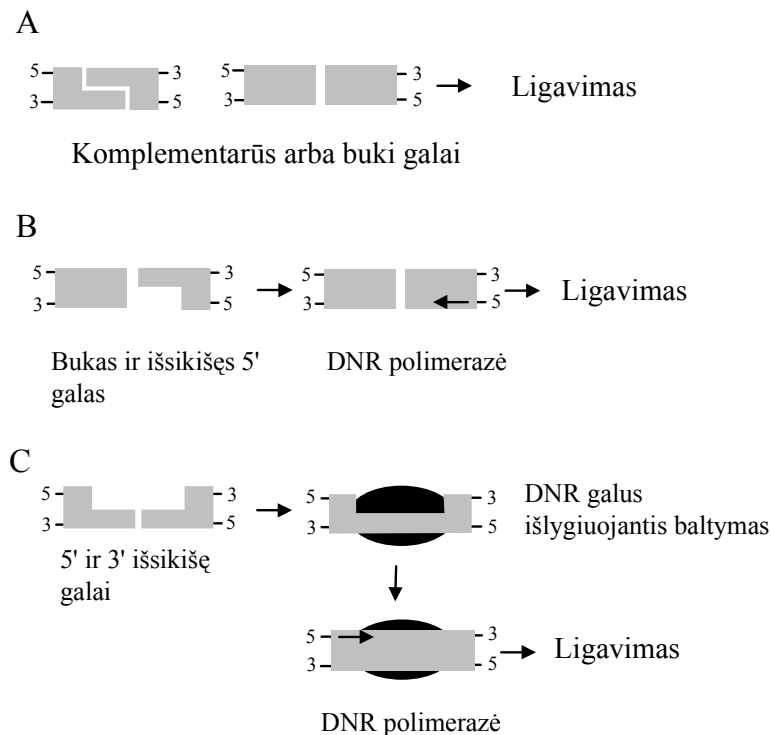
Ilgą laiką NGS buvo vertinamas kaip pagrindinis DGT šalinimo būdas žinduolių ląstelėse. Dabar tapo aišku, kad HR čia taip pat labai svarbi. Ypač šalinant DGT, atsiradusius DNR replikacijos metu. Paskaičiuota, kad apie 30–50 proc. trūkių, sukeltų sait-specifinės nukleazės I-SceI žinduolių ląstelėse, gali būti ištaisoma HR, o likusieji – NGS būdu.

Mutagenų sukelti DGT dažniausiai negali būti sujungti tiesiogiai, todėl dažnai jų vietose stebimas DNR subbrandinimas ir sintezė. Dėl to NGS dažnai sąlygoja klaidas pradinėje nukleotidų sekoje. Tiek mielių, tiek žinduolių ląstelėse NGS vykti reikia tų pačių pagrindinių komponentų: prie DNR galų prisijungiančių baltymų Ku70 ir Ku80, DNR ligazės IV bei XRCC4. Stuburinių ląstelėse dar reikalingas DNR-PK_{cs}, kurio homologų mielėse iki šiol nesurasta. Šio proceso metu kepimo mielėse dar dalyvauja Rad50, Mre11 ir Xrs2, trys baltymai, kurie turi endonukleazinį ir egzonukleazinį aktyvumą. Mielių kamienai, kuriuose nėra veiklaus šių trijų baltymų komplekso, nevykdo nehomologiškų DNR galų susijungimo. Stuburiniuose MRE11-RAD50-NBS1 komplekso tyrimą šiame procese labai sunkina tai, kad jis būtinas ląstelių gyvybinei veiklai. Ląstelės mutantės, paprasčiausiai neišgyvena (Jackson, 2002). Jeigu mielėse susidarę laisvi dvigrandžiai DNR galai nekomplementarūs, tai NGS pumpuruojančiose mielėse nėra efektyvus ir šią pažaidą pašalina tik dviejose ląstelėse iš 1000. O žinduolių ląstelėse gali būti sujungiami šiuo būdu bet kokie DNR galai. DGT šalinimo sutrikimai susiję su kai kuriais žmogaus paveldimomis ligomis: Nijmegen ir Bloom'o sindromais, ataksija telangiektazija, krūties vėžiu.

6.3.3. NGS žinduolių ląstelėse

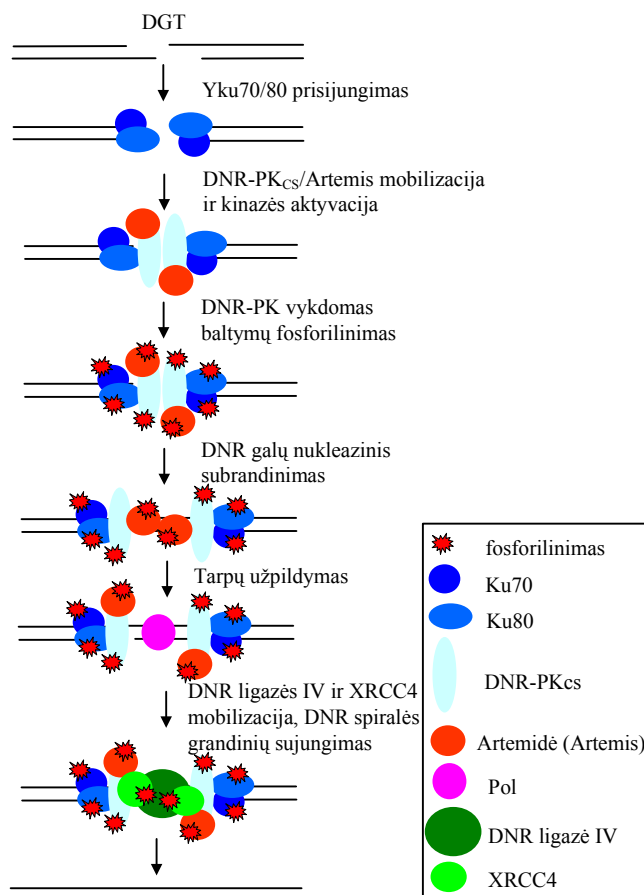
Manoma, kad šis būdas svarbiausias trūkiams žinduolių ląstelėse šalinanti. Priešingai nei HR nehomologiškų DNR galų susijungimui nereikalinga homologija ir tarpusavyje gali būti sujungti labai įvairūs DNR galai (117 pav.). Žinduolių ląstelių linijų, jautrių JS, genetiniams tyrimams nustatyti baltymai, kurie dalyvauja NGS. Tokioms ląstelių linijoms būdingas pažeistas DGT ištaisymas NGS būdu, todėl po jų apšvitos JS kaupiasi nereparuoti DGT ir ląstelės žūva. Pasinaudojus genetinės komplementacijos reiškiniu šiose ląstelėse, nustatyti genai, kurie koduoja šiam vyksmui svarbius baltymus. Nustatyta, kad *XRCC5*, *XRCC6* ir *XRCC7* genai koduoja nuo DNR priklausomos proteinkinazės (DNR-PK) subvienetus. *XRCC5* ir *XRCC6* koduoja su DNR sąveikaujančio DNR-PK Ku70/80 heterodimero 80 ir 70 kDa subvienetus, o genas *XRCC7* – DNR PK katalizinį subvienetą (DNR-PK_{cs}). Žmogaus Ku70 baltymas yra apie 69 kDa, o Ku80 – apie 83 kDa (Critchlow ir Jackson, 1998; Smith ir Jackson, 1999). Šie baltymai, jų abiejų kompleksas bei jų kompleksas su DNR gauti kristalų pavidalo ir nustatyta jų

sandara (Walker ir kt., 2001). Baltymai yra žiedo, užmauto ant DNR galų, formos. DNR-PKcs yra ~ 465 kDa, prisijungęs prie DNR galų, turi serino/treonino kinazės aktyvumą (Hammarsten ir kt., 2000). Baltymas giminiškas PIK kinazėms. NGS reikalingas ir XRCC4/DNR ligazės heterodimeras. Šių ir pagalbinių baltymų atliekamas NGS vyksta trimis etapais: 1) prisijungimas prie DNR galų ir tilto tarp jų sudarymas; 2) DNR galų subrandinimas; 3) ligavimas (118 pav.).



117 pav. Nehomologiškas įvairių DNR galų sujungimas (Postawa ir Blasiak, 2003). A – komplementarius ar bukus DNR galus sujungia DNR ligazė; B – buko ir 5' išsikišusio galo papildomas subrandinimo etapas; C – 5' ir 3' išsikišusių galų susijungimas ir išlygiuojantys baltymai, kurie stabilizuoja sinapsę ir dėl kurių kiti baltymai, pavyzdžiui, polimerazė, paverčia galus tinkamais sujungti

Pirmiausia Ku baltymai jungiasi prie DNR galų. Galbūt jie ir aptinka pažeistas DNR vietas. Po to Ku mobilizuoja DNR-PK_{cs} į DGT vietą bei skatina pastarojo kinazinių aktyvumą. Nors pagrindiniai DNR-PK_{cs} vykdomo fosforilavimo taikiniai ląstelėje dar nenustatyti, tačiau manoma, kad šis baltymas gali: 1) fosforilinti XRCC4 ir pašalinti ligazės IV/XRCC4 kompleksą nuo DNR galų, prie kurių prisijungę Ku baltymai. Tai būtina DNR galų subrandinimo etape; 2) valdyti Ku baltymų atsijungimą nuo DNR galų; 3) fosforilinti Ku70 ir Ku80. Sudėtingesnių nekomplementarių galų sujungimas susijęs su prieš ligavimą vykstančiu jų subrandinimu ir polimerizacija. Šio proceso DNR galų subrandinimo stadijoje taip pat dalyvauja nukleazės ir DNR polimerazės. Pavyzdžiui, nukleazės pašalina išsikišusius viengrandžius galus, o polimerazės užpildo viengrandžius tarpus. Nukleazinis kompleksas Mre11/Rad50/Nbs1 gali dalyvauti tiek DNR galų subrandinimo valdyme, tiek jų apsaugoje nuo skaldymo, signalizuoti apie DGT susidarymą. Galų subrandinime dar gali dalyvauti egzonukleazė FEN-1 bei helikazės WRN ir BLM. Galiausiai trečiajame NGS etape susiformuoja patvarus DNR ligazės IV ir XRCC4 kompleksas, kurio reikia kovalentinėms jungtims tarp DNR galų susidaryti.



118 pav. DGT šalinimas nehomologinių DNR galų susijungimo būdu žinduolių ląstelėse (Dudásová ir kt., 2004)

Intensyvūs tyrimai išaiškina vis naujas šio proceso detales. Tiriant žmogaus SCID ląsteles aptikta mutacija naujame gene, koduojančiame baltymą Artemis. Baltymas svarbus limfinių ląstelių diferenciacijai kaulų čiulpuose. Jis turi 5' egzonukleazės aktyvumą, todėl galbūt dalyvauja DNR galų subrandinime. Artemis ir DNR-PKcs kompleksas skaldo išsikišusius 5' ir 3' vgDNR galus. Šis endonukleazės aktyvumą turintis baltymas, matyt visiškai pašalina 5' vgDNR galus, o 3' galai sutrumpinami iki keturių nukleotidų. Kitas baltymas – polinukleotidkinazė (PNK), tikriausiai dalyvauja NGS žmogaus ląstelėse. Kadangi pataloginiai DGT, susidarę dėl JS ar laisvųjų radikalų, sukuria netinkamus sujungimui DNR galus, tai PNK, prireikus, fosforilina 5' galus. Be to, nustatyta, kad nebaltyminis veiksnys, inozitolo fosfatas (IP₆), gali specifiskai sąveikauti su Ku70/80 ir skatinti DNR galų sujungimą *in vitro*. Manoma, kad bus atrasti ir nauji NGS dalyvaujantys veiksniai.

NGS genų išjungimas gyvūnuose arba jų ląstelių kultūrose nulemia jautrumą JS, tačiau beveik nepakeičia jautrumo tiems mutagenams, kurie nesukelia DGT. Mutantuose sutrinka V(D)J rekombinacija. Tai rodo, kad NGS baltymai dalyvauja šiame procese. Tokiuose organizmuose pasireiškia SCID. Iki šiol nenustatyta, kad žmogus turėtų pažeistus Ku ar DNR-PKcs genus. Tačiau žinomi SCID sergantys asmenys, kurių Artemidės genas mutavęs. DNR-PKcs *-/-* pelės išoriškai normalios, o Ku *-/-* pelės yra mažos, anksti sensta (Ferguson ir Alt, 2001). Tai rodo, kad Ku dalyvauja didesniame rekombinacijos/reparacijos įvykių skaičiuje nei DNR-PKcs. Netikėta buvo tai, kad mutacijos pelės DNR ligazės IV

ar XRCC4 genuose sukelia embrionų žūtį. Vienas iš pastebėtų sutrikimų tokiuose pelių embrionuose – naujai susidarančių neuronų apoptozė. Į natūraliai kylantį klausimą, kodėl šie du baltymai svarbesni už Ku, bandoma atsakyti remiantis žiniomis apie NGS mechanizmą. Ląstelėse, kurios neturi DNR ligazės IV ar XRCC4, Ku ir DNR-PKcs vis tiek jungiasi prie DNR galų DGT vietoje. Susidarę neveiklūs kompleksai slopina tolesnę DGT reparaciją. Ku -/- ląstelėse DGT ištaisymas gali vykti, kad ir silpniau, kitais būdais, kurie gali kompensuoti NGS nebuvimą. Tai patvirtina ir viščiuko ląstelių linijos DT40 tyrimai. *LIG4* -/- ląstelės jautresnės JS nei *Ku70* -/- ląstelės. Tačiau *LIG4*-/-/*Ku70* -/- dvigubą mutaciją turinčios ląstelės yra panašaus jautrumo kaip ir *Ku70* -/- (Adachi ir kt., 2001). Kai DNR-PKcs arba Ku neaktyvūs pelių ląstelėse, tai atsiranda polinkis susirgti limfoma. Kadangi žmonės, turintys pažaidas šių baltymų genuose, iki šiol neišaiškinti, tai manoma, kad šių genų išjungimas nesuderinamas su žmogaus išgyvenimu. Šį požiūrį patvirtina ir ląstelių linijų tyrimai. Žmogaus *Ku70* -/- ląstelės greitai žūva, nes jos beveik nesidalija ir patiria apoptozę. Tačiau ligazės IV neveikimas ląstelių nenužudo, o padidina jų jautrumą JS. Visa tai rodo, kad gyvūnų ląstelių mutantų pagal NGS genus išgyvenimas dar priklauso ir nuo jų tipo.

6.3.4. NGS mielėse

Mielėse tai ne pagrindinis DGT šalinimo būdas. Kaip minėta anksčiau, svarbiausias yra HR mechanizmas. Genų išjungimo eksperimentai atskleidė, kad svarbiausi NGS komponentai konservatyvūs tiek mielėse, tiek žinduoliuose (11 lentelė, 119 pav.) Yra ir tam tikrų skirtumų, susijusių ne tik su paties mechanizmo svarba ląstelėje, bet ir su jo enzimologija (Daley ir kt., 2005). Pirma, mielėse nėra žinduolių DNR-PK_{cs} homologo. Antra, šiuose organizmuose, sujungiant nehomologiškus DNR galus, svarbų vaidmenį atlieka Rad50/Mre11/Xrs2 kompleksas, kurio reikšmę HR analizavome anksčiau (žr. skirsnį 2.3.2.4.1). Šiuos baltymus koduojančių genų suardymas mielių ląstelėse sukelia tokius pačius sutrikimus kaip ir *YKU70*, *YKU80* ir *DNL4* išjungimas.

11 lentelė. Bakterijų, mielių ir žmogaus ląstelių svarbiausi baltymai, kurie dalyvauja NGS (Postawa ir Blasiak, 2003)

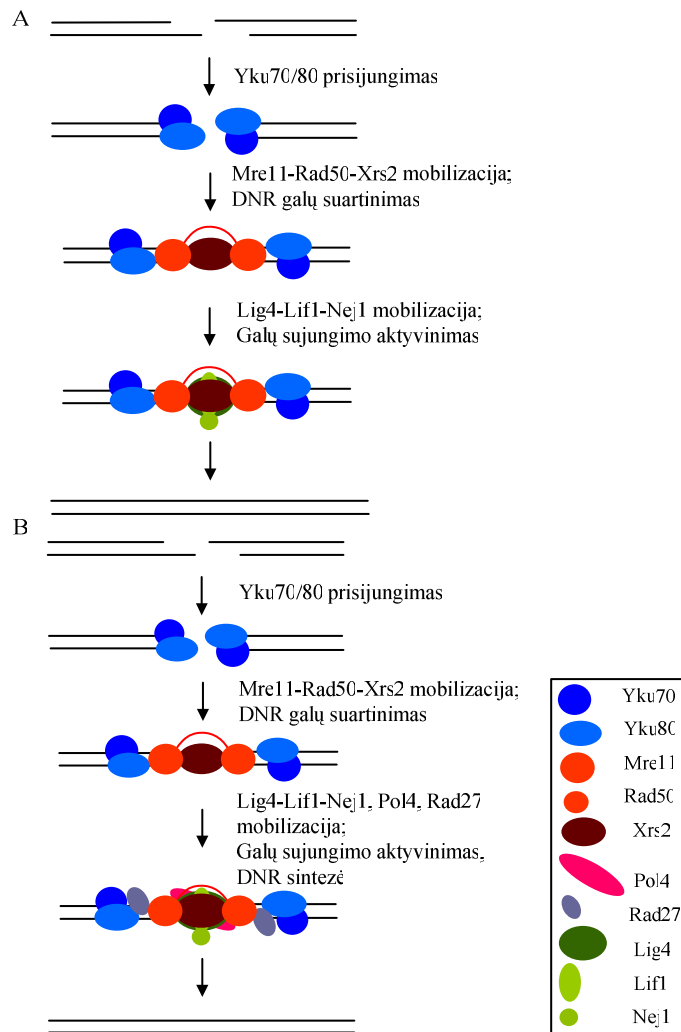
Bakterijos	Mielės	Žmogaus ląstelės
Yko U	Yko70/80	Ku70/80
—	—	DNR-PK _{cs}
SbcC/SbcD/—	Rad50/Mre11/Xrs2	Rad50/Mre11/Nbs1
—	Sir2/Sir3/Sir4	Sir2A/—/—
YkoV	Dnl4	LigIV
—	Lif1, Lif2	XRCC4
—	Nej1	—

Neabejotinai Ku yra svarbiausi NGS baltymai, nes jie gaminami tiek bakterijų, tiek žmogaus ląstelėse (Doherty ir kt., 2001). Eukariotų Ku yra heterodimeras, kurio subvienetus koduoja du genai, atsiradę dėl geno pradininko duplikacijos. Žmogaus ląstelių Ku baltymų homologai kepimo mielėse vadinami Yku70 ir Yku80, nors abu yra apie 70 kDa dydžio. Mielių NGS taip pat reikia DNR ligazės, ku-

rią koduoja *DNL4* genas. Fermentas, matyt, atlieka tik šią vienintelę funkciją, kurią lemia jo gebėjimas prisijungti prie Ku-DNR galų komplekso. Žinduolių DNR ligazė IV tiesiogiai sąveikauja su XRCC4 baltymu. Mielėse šio baltymo homologas vadinamas Lif1 (Herrmann ir kt., 1998). XRCC4 savo sandara primena Rad50, nes turi sferos pavidalo galvą bei spiralės formos uodegą (Sibanda ir kt., 2001), kuria XRCC4 jungiasi prie ligazės. Nors XRCC4 ir Lif1 nelabai panašūs, centrinis Lif1 rajonas, kuris jungiasi prie Dnl4, yra panašios sandaros. Taip pat Lif1 C galo dalis sąveikauja su Xrs2 baltymu. Be to, atrastas ir Lif2 veiksnys, kuris sąveikauja su Lif1. Mutacija *LIF2* gene mažina DGT reparacijos aktyvumą maždaug tiek pat kaip ir mutacijos *LIF1* bei *DNL4* genuose. Efektyviam NGS mielėse dar reikalingas Nej1 (angl. *nonhomologous end joining regulator 1*). *NEJ1* geno mutantuose, palyginti su laukinio tipo ląstelėmis, NGS sumažėja aštuonis kartus. *dnl4/nej1* dvigubuose mutantuose galų sujungimo efektyvumas toks pat kaip ir pavieniuose mutantuose. Nej1 baltymas sąveikauja su Lif1 baltymo sferine „galva“. Tačiau tiksli baltymo funkcija nenustatyta (Daley ir kt., 2005).

Dar keletas mielių baltymų dalyvauja subrandinant DGT galus. Vienas iš jų – Pol4 polimerazė. Šis baltymas savo N gale turi BRCT domeną, kuriuo sąveikauja su Dnl4. Išsamesni tyrimai rodo, kad Pol4 dalyvavimas labai priklauso nuo DNR galų savybių (Daley ir kt., 2005). Pol4, kaip ir žinduolių Pol λ bei Pol μ , turi unikalią savybę užpildyti išsikišusius 3'galus. Tačiau DGT, turinčių išsikišusius viengrandžius 5'galus, reparacijai šis baltymas nereikalingas. Rad27, homologiškas žinduolių FEN1, endonukleolitiškai skaldo nukarusius 5'galus. Jis tiek fiziškai, tiek funkciškai sąveikauja su Pol4 ir Dnl4/Lif1. Rad27 ir Pol4, matyt, veikia subrandinant ir užpildant 5'galus NGS reakcijoje. Mielių 3' NGS nukleazės iki šiol nenustatytos. Žinduolių ląstelėse, manoma, šį darbą atlieka Artemis (Ma ir kt., 2002). Tačiau, atrodo, kad jai artimiausias mielių homologas Pso2/Snm1, susijęs tik su „segtuku“ ir skersinių sąsiuvų reparacija. Mre11 turi 3'→5' egzonukleazės aktyvumą, tačiau ar dalyvauja NGS subrandinant 3'galus, neaišku.

SIR2, *SIR3* ir *SIR4* dalyvauja nuslopinant genus mielėse. Jų delecijos taip pat sumažina NGS efektyvumą, tačiau šis poveikis netiesioginis. Kadangi šie baltymai aptinkami DNR pažaidų vietose ir sąveikauja su Ku baltymais, galima manyti, kad dėl jų geriau prie DNR galų prieina fermentai ir (arba) Yku70/80 kompleksas.



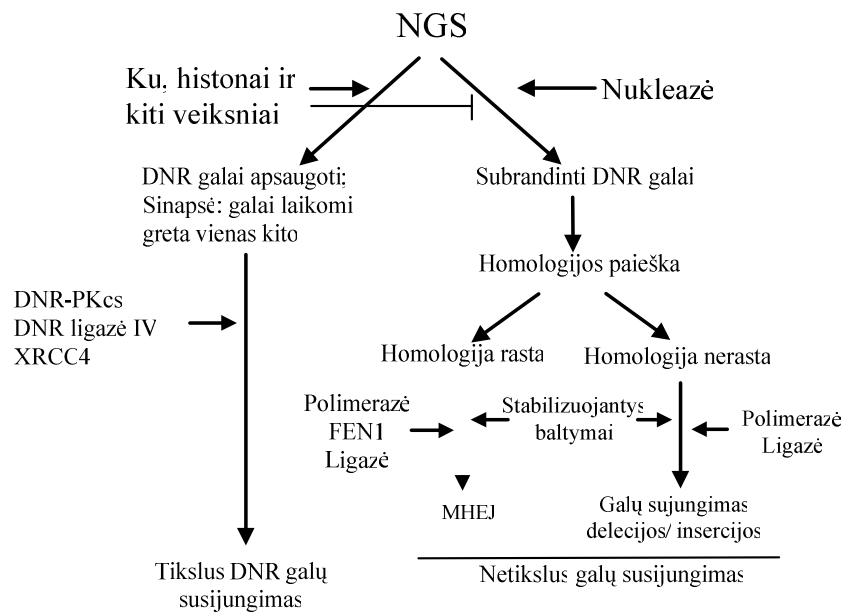
119 pav. *Saccharomyces cerevisiae* NGS modelis (Dudášová ir kt., 2004): A – paprastas DNR galų sujungimas NGS būdu; B – DNR galų subrandinimas prieš sujungimą. Jeigu galai nėra komplementarūs, prieš sujungimą jie subrandinami užpildant tarpus (Pol4) arba skaldant juos (Rad27)

6.3.4.1. Mielių NGS reakcijos modelis

Iškart po DGT susidarymo ir iki DNR 5'galo subrandinimo prie DNR molekulių galų jungiasi MRX baltymų kompleksas (119 pav.). Šiuo momentu Ku taip pat turi jungtis prie laisvų DNR galų iš abiejų trūkio pusių. Kokia minėtų baltymų prisijungimo tvarka, neaišku. MRX gali sudaryti tiltelį tarp DNR molekulės (-ių) fragmentų *in vitro* nebūtinai prisitvirtinęs prie jų galų, o Ku turi jungtis būtent prie jų. Po to Yku80 ir Xrs2 prisijungia atitinkamai: Dnl4 (Lig4) ir Lif1 (Daley ir kt., 2005) bei mobilizuoja Pol4. Susidaręs kompleksas turi būti lankstus, nes gali būti reikalinga DNR galų korekcija. Šį lankstumą, matyt, užtikrina Lif1 spiralinė uodega, Yku80 C galas ir Ku translokacijos. Toliau DNR galai sugretinami ir jų nukleotidai suporuojami, po to DNR grandys sujungiamos dalyvaujant ligazei. DGT vietoje būna dvi Dnl4 molekulės. Manoma, kad pradžioje sujungiama tik viena DNR duplekso grandinė, po to ir kita. Jeigu atkurti fosfodiesterinės jungties nepavyksta, tai Dnl4, matyt, gali mobilizuoti papildomus baltymus DNR galų subrandinimui.

6.3.5. Nehomologiškų DNR galų sujungimo būdai

NGS dažnai vertinamas kaip DGT ištaisymo būdas, palankus atsirasti mutacijoms. Ypač tais atvejais, kai galai susijungia mikrohomologijos sritimis. Tačiau NGS gali vykti ir be klaidų. Šiuo metu teigiama, kad galimi du NGS keliai (Liang ir kt., 2005). Pirmasis, kuriame dalyvauja Ku ir DNR-PKcs bei ligazės IV – XRCC4 kompleksas, vyksta be klaidų. DNR molekulių galai susijungia labai tiksliai. Eksperimentai rodo, kad šis kelias dažnesnis mielėse ir žinduolių ląstelėse (Budman ir kt., 2005). Pavyzdžiui, sujungiant išsikišusius 4 bp galus, neteisingo nukleotidų suporavimo tikimybė yra tik 1 proc. Jeigu vienu metu susidaro DGT keliose vietose, gali būti sujungiami netinkami DNR galai, susidaryti translokacijos. Tačiau ir šiuo atveju klaidos tikimybė – tik keletas nuošimčių. Tačiau egzistuoja ir jam alternatyvus kelias (120 pav.). Jis nustatytas stuburinių gyvūnų mutantinių ląstelių kamienuose. Pavyzdžiui, graužikų ląstelių, neturinčių Ku80 baltymo, linijoje *xrs6* taip pat vyksta DNR galų susijungimas, tik jis yra netikslus. Šis kelias aptiktas ir XRCC -/- ir ligazė IV -/- žinduolių ląstelių linijose. Tai rodo, kad egzistuoja nuo Ku nepriklausomas klaidas linkęs daryti DNR galų susijungimo mechanizmas.



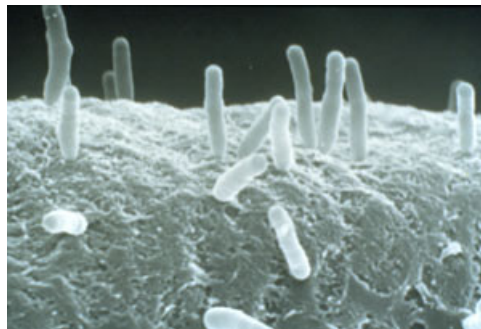
120 pav. Du NGS keliai (Liang ir kt., 2005)

Pagrindinė šio mechanizmo ypatybė – nukleotidų praradimas DNR galuose bei mikrohomologijos panaudojimas sujungiant DNR molekules. Todėl literatūroje jis apibūdinamas kaip su mikrohomologija susijęs galų susijungimas (angl. *microhomology mediated end joining, MHEJ*). Šiame procese, manoma, dalyvauja nukarusių vgdNR galų endonukleazė I (FEN1).

7. T-DNR rekombinacija

Augalų molekulinės biologijos ir biotechnologijos suklestėjimas labai susijęs su augalų transformacijos, kurią sukelia *Agrobacterium*, atradimu ir panaudojimu. Ši bakterija geba pernešti savose plazmidėse (Ti ar Ri) esančios DNR atkarpą į augalo ląstelių branduolio genomą. Pernešama DNR vadinama T-DNR (angl. *transferred DNA*). Ši savybė panaudojama genų inžinerijoje į augalą įterpiant naujus genus, taip pat tiriant augalo genų funkcijas jų išjungimo būdu. Rekombinacijos požiūriu T-DNR įsiterpimas į augalo genomą yra labai savitas reiškinys. T-DNR yra didelė (~ 200 kbp) pTi (angl. *tumour inducing plasmid*) plazmidėje. Atsakingi už jos pernešimą genai yra už T-DNR ribų. Pati T-DNR yra gana didelė ir gali talpinti dešimtis genų (Gelvin, 2003). Vieninteliai *cis* veikiantys elementai yra dvi 25 bp ilgio išsigimę pasikartojančios vienakryptės sekos, esančios iš abiejų pernešamos DNR ribų. Kadangi T-DNR nėra pernašai reikalingų genų, į ją gali būti įterpiami įvairūs transgenai ir reguliacinės sekos. Pati pernaša yra gana sudėtinga ir gali būti suskirstyta į bakterinį ir augalinį etapus. Bakterinis etapas tikriausiai kilęs iš konjugacijos, nes jų mechanizmas ir dalyvaujantys baltymai labai panašūs. Augalinis etapas apima įvykius nuo T-DNR patekimo į augalo ląstelę iki jos įsiterpimo į genomą.

Agrobacterium puola pažeistus augalo audinius, kurių žaizdos išskiria tam tikrus fenolinius junginius. Šios medžiagos sukelia bakterijos chemotaksi pažeisto audinio link. Bakterijos ląstelės prisitvirtina prie šeimininko ląstelių sienelės (121 pav.). Čia vyksta tarpusavio atpažinimas, kuriame dalyvauja tiek bakterijos, tiek augalo baltymai. Iš augalo receptorių paminėtinas vitronektino tipo baltymas.

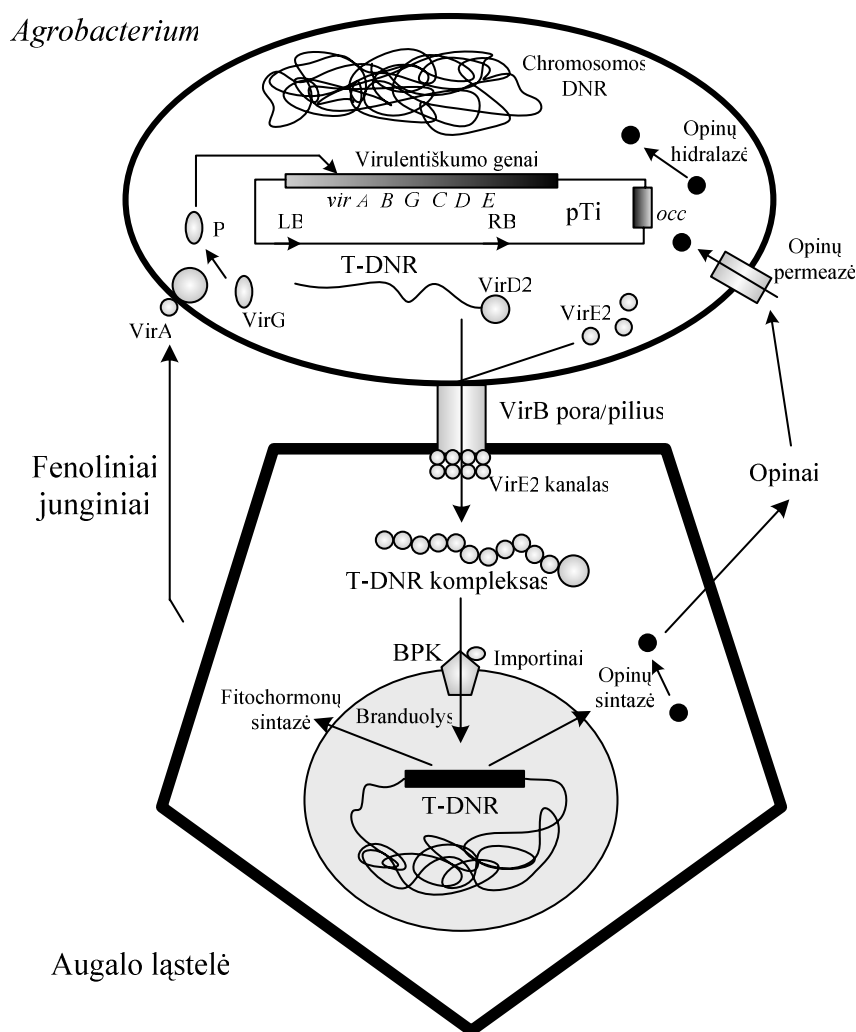


121 pav. *Agrobacterium tumefaciens* prisitvirtinusi prie augalo ląstelės.

<http://depts.washington.edu/agro/index> ; microbewiki.kenyon.edu/index.php/Agrobacterium

Įdomu tai, kad ji, kaip specifinį receptorių, naudoja ir daug žinduolių patogenų. Augalo išskiriamus fenolius bakterija atpažįsta, naudodama dviejų komponentų sistemą. Membranoje esantis VirA baltymas veikia kaip jutiminė kinazė, kuri, aktyvuojama augalo junginių, vykdo autofosforilinimą (122 pav.). Po to VirA fosforilina VirG. Šis atsako reguliatorius aktyvuoja įvairius *vir* genus. Augalo gaminami junginiai gali ne tik aktyvuoti, bet ir slopinti šią signalinę grandinę. Taip daugelis augalų rūšių apsisaugo nuo agrobakterijos infekcijos. *Vir* genų raiška sukelia T-DNR paruošimą, kanalėlio tarp bakterijos ir augalo ląstelės susidarymą ir DNR pernašą (122 pav.). T-DNR paruošimą pradeda

VirD2 ir VirD1 baltymai. Sąveikaudami tarpusavyje, jie veikia kaip sait-specifinė endonukleazė. Sukėlęs viengrandį trūkį, VirD2 kovalentiškai prisijungia prie vgT-DNR 5'galo. Susidaro dar nesubbrandintas T-DNR kompleksas. Jį nuo T-DNR rajono tikriausiai atskiria viena iš daugelio bakterijos helikazių. Todėl plazmidėje susidaro viengrandis tarpas. Jį greitai pašalina bakterijos reparacijos sistema. Mobilizuotą vgT-DNR molekulę subrandina (supakuoja) VirE2 į tuščiavidurės cilindro formos filamentines struktūras. VirE2 dengia vgT-DNR. Taip pastaroji apsaugoma nuo nukleazių ir tinka keliauti į šeimininko ląstelės branduolį.



122 pav. T-DNR pernešimo į augalo branduolį schema. LB, RB kairioji ir dešinioji T-DNR ribos; BPK – branduolio poros kompleksas (Ziemienowicz, 2001).

Tiksli T-DNR komplekso susidarymo vieta dar nežinoma (Tzfira ir Citovsky, 2002). T-DNR ir Vir baltymų pernaša vyksta dalyvaujant IV tipo sekrecijos sistemai. Ji sudaryta iš 12 baltymų, kurie suformuoja du funkcinius darinius: virulentišką pilių ir nešiklio kompleksą. Pastarasis substratus perneša per ląstelės membraną. Agrobakterijoje šį nešiklį sudaro *virD4* geno ir 11 *virB* operono genų koduojami baltymai. Iš pastarųjų VirB1, VirB2 ir VirB5, matyt, sąveikauja su šeimininko ląstelės receptoriais. Neatmetama galimybė, kad VirD2, VirE2 ir VirF gali būti pernešami nepriklausomai nuo *virB* operono.

Šeimininko ląstelėje T-DNR kompleksas turi patekti į branduolį. Tai aktyvus procesas, kuriame svarbūs VirE2 ir VirD2 baltymai. Su jais sąveikauja ciklofilino šaperono šeimos baltymai RocA, Roc4 ir CypA. Jeigu slopinama VirD2-CypA sąveika, agrobakterija praranda gebėjimą sukelti auglius (123 pav.). Galbūt augalo šaperonai padeda VirD2 baltymui išlaikyti tam tikrą erdvinę sandarą. VirE2 sąveikauja su kitais augalo baltymais VIP1 ir VIP2.



123 pav. *A. tumefaciens* sukeltas auglys ant pelargonijos stiebo
microbewiki.kenyon.edu/index.php/Agrobacterium

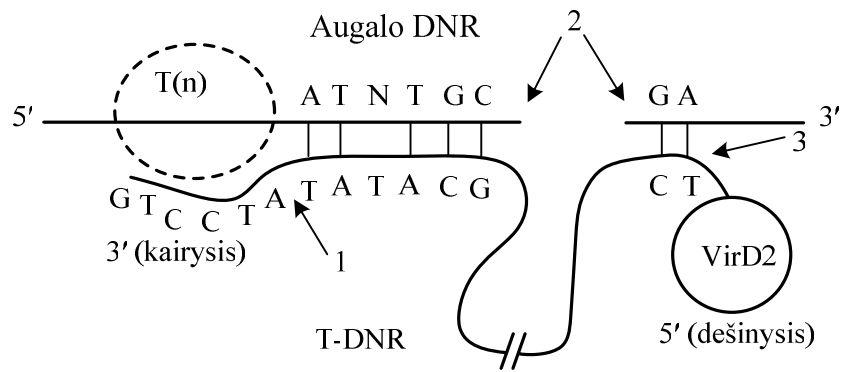
7.1. Įsijungimą skatinantys augalo veiksniai

Į augalo genomą įsijungia ne visos T-DNR molekulės, tačiau procentiškai daugiau nei kitais metodais įterpiant DNR. Galbūt tai nulemia T-komplekse esantys VirD2 ir VirE2 baltymai. Manoma, kad VirD2 gali daryti įtaką įsijungimo efektyvumui ir tikslumui. Laukinio tipo T-DNR raiška augalo ląstelėse nulemia auglių susidarymą, nes skatina hormonų (auksinų, citokininų) ir junginių, vadinamų opiniais, gamybą. Pastarieji yra aminorūgščių ir fosforilintų angliavandenių dariniai ir skirstomi į du tipus: oktopinus ir napalinius. Kadangi opinus gali įsisavinti tik agrobakterija, tai ji sau sukuria ekologinę nišą, kuri niekam daugiau negali priklausyti. *virF* lokusas būdingas tik oktopinus koduojančioms Ti plazmidėms. Manoma, jis sprendžia galimų šeimininkų ratą.

7.2. T-DNR įsijungimas į augalo ląstelės genomą

T-DNR subbrandinimas ir pernešimas į augalą neblogai ištirtas, tačiau jos įsiterpimo į augalo chromosomas mechanizmai iki šiol neaiškūs (Li ir kt., 2005; Loyter ir kt., 2005). T-DNR esanti informacija (pavyzdžiui, transgenai) patiria mažiau pokyčių integracijos į genomą metu nei naudojant kitus metodus (polietilenglikolį, elektroporaciją, liposomas, genų patranką) (Gelvin 2003). Todėl, dirbant šiuo metodu, šiek tiek mažesnė genetinio nestabilumo rizika. Visi ankstesni tyrimai, atlikti įvairiuose modeliniuose augaluose, rodo, kad T-DNR įsijungia nedėsningosios rekombinacijos būdu (Gheysen ir kt., 1991, Brunaud ir kt., 2002). *A. thaliana* tokių įsijungimo vietų analizė parodė, kad jos daugmaž pasiskirsčiusios tolygiai visose penkiose chromosomose, tačiau daug rečiau įsiterpimas vyksta centromerų srityse. Nustatyta apie 40 proc. įsiterpimų į genus. Intronuose įsiterpimai dažnesni, palyginti su egzonais. Tiriant T-DNR rekombinaciją atlikta nemažai eksperimentų, kurių rezultatus apibendrina du

modeliai (Mayerhofer ir kt., 1991). Kadangi neaišku, ar rekombinacijoje dalyvauja vgT-DNR ar dgT-DNR, tai vienas jų vadinamas dvigrandžių trūkių modeliu, kitas – vgDNR tarpo reparacijos modeliu. Pirmasis modelis teigia, kad vyksta dgT-DNR integracija į DGT vietą augalo genome. T-DNR galai šiek tiek išvyniojami ir jungiasi su augalo DNR iš abiejų trūkio pusių. Antrasis modelis teigia, kad rekombinacija prasideda viengrandžiu DNR trūkiu, po to augalo DNR susidaro viengrandis tarpas ir šioje vietoje įsijungia vgT-DNR. Manoma, kad abiem atvejais VirD2, sąveikaudamas su augalo baltymais, dalyvauja atpažįstant trūkių vietas. Šiuos modelius tobulino kiti mokslininkai. Pavyzdžiui, Tinlandas (Tinland) ir kolegos mano, jog rekombinacijos vieta labiausiai priklauso nuo T-DNR 3'galo. Pasak jų, rekombinacija prasideda, kai ši T-DNR vieta atpažįsta mažas homologijos sritis viršutinėje augalo DNR grandinėje (Tinland ir kt., 1995). Tada apatinėje augalo DNR grandinėje atsiranda viengrandis trūkis ir jo vietoje VirD2 prijungia vgT-DNR 5'galą. Nukaręs T-DNR 3'galo fragmentas (iki homologijos vietos) pašalinamas, o antrąją įterptos T-DNR grandinę sintetina augalo reparacijos sistema (124 pav.) (Tinland ir Hohn, 1995). Šie samprotavimai pagrįsti eksperimentų rezultatais: 1) T-DNR į augalo ląstelę pernešama vgDNR pavidalo (Tinland ir kt., 1994); 2) nukleotidų sekų tarp T-DNR 3'galo ir rekombinacijos vietos palyginimas rodo, kad tarp jų egzistuoja keleto nukleotidų ilgio homologijos sritis (Tinland ir kt., 1995; Brunaund ir kt., 2002). Pavyzdžiui, atlikę 9000 rekombinacijos vietų analizę, Brunaund ir kt. nustatė, kad T-DNR linkusi įsiterpti į geno rajonus, kurie turtingi A-T. Tarp vgT-DNR kairiojo (3') galo ir augalo DNR susidaro trumpas DNR dupleksas. Be to jame vyksta delecijos. Dešinysis vgT-DNR galas taip pat poruojasi su augalo DNR, sudarydamas kitą DNR dupleksą iš 2-3 bp (124 pav.); 3) VirD2 būna prisijungęs prie vgT-DNR 5'galo (Ward & Barnes, 1998; Young ir Nester, 1988), skaldo ir liguoja DNR *in vitro* (Panseqrou ir kt., 1993); 4) mutacijos *virD2* gene sukelia netikslų T-DNR 5'galo įsijungimą (Tinland ir kt., 1995). Tačiau šis modelis negali paaiškinti sudėtingų T-DNR įsiterpimo atvejų (Krizkova ir Hrounda, 1998) bei greitos T-DNR raiškos (Li ir kt., 2005). Tai lengviau būtų galima įsivaizduoti darant prielaidą, kad rekombinacijoje dalyvauja dgT-DNR. Kad egzistuoja tokia dgT-DNR, tiesiogiai įrodo eksperimentai su mielių endonukleaze I-SceI (Tzfira ir kt., 2003). Šie eksperimentai parodė, kad T-DNR pirmiausia jungiasi į endonukleazės sukeltų DGT vietas. Be to, pati T-DNR, kuri turėjo I-SceI atpažinimo seką, buvo dažniausiai įjungiamą į augalo genomą tik suskaldyta šio fermento. Kadangi I-SceI endonukleazė skaldo tik dgDNR, tai aki-vaizdu, kad prieš rekombinaciją vgT-DNR buvo paverčiama dgT-DNR.



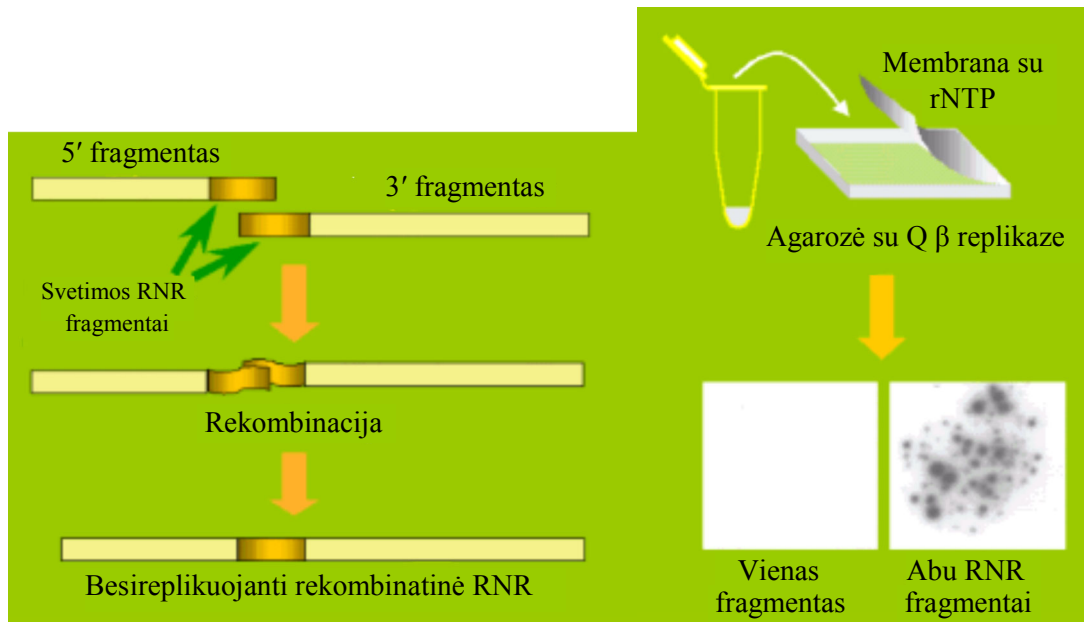
124 pav. T-DNR integracijos į augalo genomą modelis. Patogumo dėlei pavaizduota tik viršutinė augalo DNR molekulės grandinė, T(n) – T turtingas rajonas, kuris, manoma, yra tinkama vieta kairiojo (3') T-DNR galo rekombinacijai. Galbūt šis T-DNR galas ieško tinkamos vietos, kol randa nedidelę homologišką seką iškart už T turtingo rajono. Susidaro trumpas skirtingos kilmės DNR molekulių dupleksas; (2) šeimininko DNR molekulėje žemiau homologijos vietos sukeltas viengrandis trūkis. Dėl jo atsiradęs 3'-OH galas yra pradmuo DNR sintezei per T-DNR tol, kol pasiekiamas jos dešinysis (5') galas, prie kurio prisitvirtinęs VirD2 baltymas. Naujai susintetintos dgT-DNR įsiterpimas į augalo DNR dažniausiai susijęs su šeimininko DNR delecijomis. T-DNR rekombinacija su šeimininko DNR sukelia T-DNR 3'galo fragmento deleciją (1). Dešinysis T-DNR galas įsiterpia į šeimininko DNR labai tiksliai. (1) ir (3) – endonukleazių veikimo vietos (Brunaud ir kt., 2002)

Pati T-DNR rekombinacija augale, matyt, vyksta nedėsningosios rekombinacijos (NGS) būdu. Dabar jau pripažįstama, kad *Agrobacterium* baltymai negali vykdyti DNR reparacijos, todėl T-DNR integraciją aptarnauja šeimininko baltymai. Pavyzdžiui, mielėse T-DNR integracija vyksta HR ir NGS būdu (Van Attikum ir Hooykas, 2003). Kadangi augaluose dominuoja nehomologinė rekombinacija, tai šiuo būdu turėtų vykti T-DNR rekombinacija. Įrodyta, kad rekombinacijos metu prie dgT-DNR jungiasi augalo KU80 baltymas, kuris yra svarbus NGS (Li ir kt., 2005). *A. thaliana ku80* *-/-* mutanto somatinėse ląstelėse nevyksta T-DNR rekombinacija, o esant šio geno perraiškai, vairo augalai jautresni *Agrobacterium* infekcijai bei atsparesni DNR pažaidas sukeliantiems veiksniams.

8. RNR rekombinacija

1962 m. nustatyta, kad tarp giminiškų poliovirusų genomų vyksta apsikeitimas genetiniais žymenimis. Maždaug tuo pat metu atrasta RNR „replikazė“ – polimerazė, kuri gali sintetinti RNR ant RNR matricos. 1965 m. Q β replikazė buvo panaudota RNR pagausinimui neląstelinėje sistemoje. Nors tai ir buvo RNR rekombinacijos tyrimų pradžia, tačiau dar ilgai jos mechanizmai ir mastai buvo neaiškūs. Skirtingai nei DNR rekombinacijos atveju nenustatyta specifinių genų, valdančių šį procesą. Kadangi nebuvo neląstelių eksperimentams tinkamų sistemų, tai RNR rekombinacija buvo stebima tik *in vivo* ir visada egzistavo galimybė, kad ji vyksta ne tarp RNR molekulių, o tarp jų cDNR kopijų (Chetverin, 1999). Be to, ilgą laiką vyravo nuomonė, kad RNR rekombinacija vyksta tik replikacijos matricų kaitos būdu (Nagy ir Simon, 1998).

RNR rekombinacija buvo mįslė daugiau nei tris dešimtmečius po jos atradimo. Dabar padaryta didžiulė jos tyrimų pažanga ir jau aišku, kad šios rekombinacijos mechanizmai labai įvairūs. Vyraujantis RNR rekombinacijos tipas – nedėsningoji rekombinacija. Ji susijusi su keletu rūšių transesterifikacijos reakcijomis, kurias vykdo pačios RNR molekulės, arba šį procesą katalizuoja tam tikri baltymai. Kadangi homologinė rekombinacija vyksta molekulių homologijos vietose, tai šis rekombinacijos būdas saugo genomo sandarą, o nedėsningoji rekombinacija keičia ją. Kadangi viruso genomo didžiąją dalį sudaro jam „gyvybiškai“ svarbūs genai, dauguma nedėsningųjų (nehomologinių) rekombinantų paprasčiausiai „neišgyvena“. Dėl šios priežasties ilgai vyravo klaidinga nuomonė, kad RNR rekombinacija dažniausiai vyksta homologinės rekombinacijos būdu. Šios rekombinacijos dažnis labai skiriasi įvairiuose virusuose. Pavyzdžiui, kryžminantis įvairių serotipų koronavirusams ir pikornavirusams jis siekia 10^{-5} /nukleotidui (nt), tačiau RNR faguose jis labai mažas ir tesiekia 10^{-11} /nt. Nedėsningosios rekombinacijos dažnis daugelyje RNR virusų buvo panašus ir siekė 10^{-5} /nt (Chetverin, 1999). Kad nėra koreliacijos tarp homologinės ir nedėsningosios RNR rekombinacijos, rodo, jog tai visiškai skirtingi procesai. 1997 m. buvo sukurtos pirmosios neląstelinės sistemos RNR rekombinacijai tirti. Viena iš jų pasižymi išskirtinėmis savybėmis, nes procesą galima griežtai kontroliuoti nuo pradžios iki galo (Chetverin ir kt., 1997). Ši sistema sudaryta iš RNR bakteriofago Q β replikazės, tam tikros sandaros RNR molekulių fragmentų, turinčių specifines 5' ir 3' galines sekas, kuriose yra polimerazės atpažinimo saitai, ir rNTP. Q β replikazės gali pagausinti tik RNR molekulę, turinčią šias specifines 5' ir 3' sekas, ir taip sudaryti RNR molekulių koloniją (125 pav.). Pagal šią metodiką galima gauti atskiras molekulių kolonijas, užnešus tinkamą RNR ant agarozės gelio, kuriame yra replikazė ir rNTP.



125 pav. RNR rekombinacijos tyrimo sistema pagal Chetveriną. RNR kolonijos agarozės gelyje, turinčiame Q β replikazę ir rNTP. Kolonijos išryškintos panaudojus hibridizaciją su žymėtu zondų. http://rna.protres.ru/rus/#Molecular_proc.20Colony

Siekiant gauti kompaktiškas kolonijas, RNR molekulės užnešamos ant agarozės, turinčios replikazę ir padengiamos nailono membrana impregnuota rNTP (Chetverin ir kt., 1997). RNR rekombinacijai tirti substratais naudojami atskirti vienas nuo kito RQ (angl. *replicable by Q β*) RNR 5' ir 3' fragmentai. Molekulinę koloniją galima gauti tik tada, kai RNR fragmentai rekombinacijos būdu susijungs į vieną molekulę. Pagal susidarančias RNR kolonijas sprendžiama apie rekombinacijos dažnį šioje sistemoje tam tikromis sąlygomis, o ištyrus koloniją sudarančias molekules, galima nustatyti, koku būdu vyko rekombinacija. Kadangi RNR kolonijos susidarydavo, tai akivaizdžiai rodė, kad RNR rekombinacija gali vykti be DNR tarpininko. RNR rekombinacijos dažnis, naudojant Q β replikazę, lygus 10^{-5} – 10^{-4} /nt. Rekombinantų sekoskaita parodė, kad jie susidarė nehomologinės rekombinacijos būdu. Homologinės rekombinacijos būdu rekombinantai susidarydavo, kai į sistemą buvo įterpiama dNTP ir atvirkštinė transkriptazė. Šis fermentas vykdo homologinę rekombinaciją matricų kaitos būdu. RNR rekombinacijos mechanizmas, esant Q β replikazei, skiriasi nuo matricų kaitos mechanizmo. Tokių rekombinantų struktūros tyrimai parodė, kad jų susidarymas vyksta transesterifikacijos reakcijos metu. Šiuo atveju 5' RNR fragmento 3'-OH galas atakuoja 3' fragmento fosfodiesterines jungtis ir sudaro naujas. Ši reakcija nevykdavo, jeigu 5' fragmento 3'-OH grupė būdavo pašalinama (Chetverin, 1999; Chetverin, 2004). Kai reakcijoje nedalyvaudavo Q β replikazė ir rNTP, fragmentų rekombinacija buvo keletu eilių retesnė. Tai rodė, kad replikazė kažkokiu būdu katalizuoja RNR molekulių rekombinaciją. Savaiminės RNR rekombinacijos mechanizmas buvo visiškai kitoks. Šioje rekombinacijoje dalyvauja ne 3'-OH, o 2'-OH grupės. Panašios savaiminės reakcijos vyksta ir *in cis*, todėl RNR molekulėse buvo aptinkamos delecijos. RNR savaimė yra rekombinogeniška ir rekombinacijai be jos pačios tereikia Mg $^{2+}$ jonų. Tokios rekombinacijos dažnis labai mažas ir siekia $\approx 10^{-9}$ h $^{-1}$ vienai nukleotido jungčiai 37°C temperatūroje. Tokie spontaniški RNR persitvarkymai gali būti svarbūs RNR ir DNR genomų

evoliucijai. Jeigu ląstelės baltymai jų ir nepadidina, esamo dažnio pakanka, kad žmogaus ląstelėje kiekvieną minutę susidarytų nauja rekombinantinė RNR. Per visą žmogaus gyvenimą jo kūne gali susidaryti iki 10^{20} rekombinantinių RNR molekulių. Net nežymios jų dalies atvirkštinė transkripcija ir integracija gali sukelti žmogaus genomo pokyčius.

Rekombinacija gali didinti virusų patogeniškumą. Buvę ne tokie kenksmingi virusai po rekombinacijos gali tapti labai virulentišku kamieniu. Pavyzdžiui, taip atsirado labai virulentiškas „Hong Kongo“ tipo gripo virusas. Tokie persitvarkymai yra labai pavojingi. Aprašyti keli atvejai, kai poliomeilita sukėlė vakcinoje buvusių virusų neurovirulentiniai revertantai. Reversijas dažniausiai sukelia genetinės kelių poliovirusų serotipų, paprastai įeinančių į vakcinų sudėtį, rekombinacijos.

Literatūra

1. Adachi N, Ishino T, Ishii Y, Takeda S, Koyama H (2001) DNA ligase IV-deficient cells are more resistant to ionizing radiation in the absence of Ku70: implications for DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12109-12113.
2. Adams DE, Tsaneva IR, West SC (1994) Dissociation of RecA filament from duplex DNA by the RuvA and RuvB DNA repair proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9901-9905.
3. Adams MM, Carpenter PB (2006) Typing the loose ends together in DNA double strand break repair with 53BP1. *Cell Division* 1:19.
4. Agarwal S, Roeder GS (2000) Zip3 provides a link between recombination enzymes and synaptonemal complex proteins. *Cell* 102: 245-255.
5. Ajima J, Umezū K, Maiki H (2002) Elevated incidence of loss of heterozygosity (LOH) in an *sgs1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: roles of yeast RecQ helicase in suppression of aneuploidy, interchromosomal rearrangement, and the simultaneous incidence of both events during mitotic growth. *Mutat Res* 504: 157-172.
6. Anderson DG, Churchill JJ, Kowalczykowski SC (1997) Chi-activated RecBCD enzyme possesses 5'→3' nucleolytic activity, but RecBC enzyme does not: Evidence suggesting that the alteration induced by Chi is not simply ejection of the RecD subunit. *Genes Cells* 2:117-28.
7. Anderson LK, Hooker KD, Stack SM (2001) The distribution of early recombination nodules on zygotene bivalents from plants. *Genetics* 159: 1259-1269.
8. Arabidopsis-Genome-Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
9. Aravind L, Koonin EV. (2001) Prokaryotic homologs of the eukaryotic DNA-end-binding protein Ku, novel domains in the Ku protein and prediction of a prokaryotic double-strand break repair system. *Genome Res.* 11: 1365-74.
10. Assenmacher N, Hopfner KP (2004) MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. *Chromosoma* 113: 157-166.
11. Barbour SD, Nagaishi H, Templin A, Clark AJ (1970) Biochemical and genetic studies of recombination proficiency in *Escherichia coli*. II. *rec*⁺ revertants caused by indirect suppression of *rec*⁻ mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 67:128-135.

12. Bass HW, Riera-Lizarazu O, Ananiev EV, Bordoli SJ, Rines HW, Phillips RL, Sedat JW, Agard DA, Cande WZ (2000) Evidence for the coincident initiation of homolog pairing and synapsis during the telomere-clustering (bouquet) stage of meiotic prophase. *J Cell Sci* 113: 1033-1042.
13. Batzer MA, Deininger PL (2002) Alu repeats and human genomic diversity. *Nature* 3:370-379.
14. Bazemore LR, Folta-Stogniew E, Takahashi M, Radding CM (1997) RecA tests homology of both pairing and strand exchange. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11863-11868.
15. Beernink HT, Morrical SW (1999) RMPs: recombination/replication mediator proteins, *trends Biochem Sci* 24:385-9.
16. Bennett RJ, Keck JL (2004) Structure and function of RecQ DNA helicases. *Critical Rev Biochem Mol Biol* 39: 79-97.
17. Bettina M, Shawn A (2001) Checkpoints: Meiotic chromosome pairing takes an unexpected twist. *Current Biol* 11: R865-R868.
18. Biswas I, Maguin E, Ehrlich S D, Gruss A (1995) A 7-base-pair sequence protects DNA from exonucleolytic degradation in *Lactococcus lactis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2244-8.
19. Boeke JD (2003) The unusual phylogenetic distribution of retrotransposons: a hypothesis. *Genome Res* 13: 1975-1983.
20. Brandt VL, Roth DB (2002) A recombinase diversified: new functions of the RAG proteins. *Curr Opin Immunol* 14: 224-229.
21. Brandt VL, Roth DB (2003) Artemis: guarding small children and, now, the genome. *J Clin Invest* 111: 315-316.
22. Brown DD, Wensink PC, Jordan E (1972) *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: the evolution of tandem genes. *J Mol Biol* 63: 57-73.
23. Brunaud V, Balzergue S, Dubreucq B, Aubourg S, Samson F, Chauvin S et al. (2002) T-DNA integration into the *Arabidopsis* genome depends on sequences of pre-insertion sites. *EMBO Rep* 3: 1152-1157.
24. Budman J, Chu G (2005) Processing of DNA for nonhomologous end-joining by cell-free extract. *EMBO J* 24: 849-860.
25. Campbell AM (1962) Episomes. *Adv Genet* 11: 101-145.
26. Cardon LR, Bell JI (2001) Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2: 91-99.
27. Casals F, Cáceres M, Manfrin MH, González J, Ruiz A (2005) Molecular characterization and chromosomal distribution of *Galileo*, *Kepler* and *Newton*, three Foldback transposable elements of the *Drosophila buzzatii* species complex. *Genetics* 169: 2047-2059.
28. Chedin F, Noirot P, BiauDET V, Ehrlich SD (1998) A five-nucleotide sequence protects DNA from exonucleolytic degradation by AddAB, the RecBCD analogue of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 29:1369-1377.
29. Chen J-M, Férec C, Cooper DN (2007) Mechanism of *Alu* integration into the human genome. *Genomic Medicine* 1: 9-17.
30. Chetverin AB (1999) The puzzle of RNA recombination. *FEBS Lett* 460: 1-5.
31. Chetverin AB (2004) Replicable and recombinogenic RNA. *FEBS Lett* 567: 35-41.

32. Chetverin AB, Chetverina HV, Demidenko AA, Ugarov VI (1977) Nonhomologous RNA recombination in cell free system: evidence for a transesterification mechanism guided by secondary structure. *Cell* 88: 503-513.
33. Chua PR, Roeder GS (1998) Zip2, a meiosis-specific protein required for the initiation of chromosome synapsis. *Cell* 93: 349-359.
34. Churchill JJ, Anderson DG, Kowalczykowski SC (1999) The RecBC enzyme loads RecA protein onto ssDNA asymmetrically and independently of χ resulting in constitutive recombination activation. *Genes & Development* 13: 901-911.
35. Clark A J (1973) Recombination deficient mutants of *E. coli* and other bacteria. *Annu Rev Genet* 7: 67-86.
36. Clark A J, Sharma V, Brenowitz S, Chu CC, Sandler S, Satin L, Templin A, Berger I, Cohen A (1993) Genetic and molecular analyses of the C-terminal region of the *recE* gene from the *rac* prophage of *Escherichia coli* K-12 reveal the *recT* gene. *J Bacteriol* 175: 7673-7682.
37. Clark AJ, Margulies AD (1965) Isolation and characterization of recombination-deficient mutants of *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci USA* 53: 451-459.
38. Coates CJ, Jasinskiene N, Miyashiro L, James AA (1998) Mariner transposition and transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3748-3751.
39. Cobb JA, Bjergbaek L (2006) RecQ helicases: lessons from model organisms. *Nucleic Acids Res* 34: 4106-4114.
40. Connelly JC, de Leau ES, Leach DR (2003) Nucleolytic processing of a protein-bound DNA end by the *E. coli* SbcCD (MR) complex. *DNA Repair* 2: 795-807.
41. Connelly JC, Kirkham LA, Leach DR (1998), the SbcCD nuclease of *Escherichia coli* is a structural maintenance of chromosomes (SMC) family protein that cleaves hairpin DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7969-7974.
42. Cox MM (2003) The bacterial RecA protein as a motor protein. *Annu Rev Microbiol* 57: 551-577.
43. Craig NL (1997) Target site selection in transposition. *Annu Rev Biochem* 66: 437-474.
44. Critchlow SE, Jackson SP (1998) DNA end-joining: from yeast to man, *trends Biochem Sci* 23: 394-398.
45. D'Amours D, Jackson SP (2002) The Mre11 complex: At the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 3: 317-327.
46. Daley JM, Palmbo PL, Wu D, Wilson TE (2005) Nonhomologous end joining in yeast. *Annu Rev Genet* 39: 431-451.
47. Daley JM, Vander Laan RL, Suresh A, Wilson TE (2005) DNA joint dependence of Pol X family polymerase action in nonhomologous end joining. *J Biol Chem* 280: 29030-29037.
48. Daskalova SM, Scott NW, Elliott MC (2005) Folbos, a new foldback element in rice. *Genes Genet Syst* 80: 141-145.
49. Dawkins R *The blind watchmaker*. Penguin books. 2000
50. de Vries FA, de Boer E, van den Bosch M, Baarends WM, Ooms M, Yuan L, Liu JG, van Zeeland AA, Heyting C, Pastink A (2005) Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes Dev* 19: 1376-1389.

51. Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N et al. (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 380: 152-154.
52. Dillingham MS, Spies M, Kowalczykowski SC (2003) RecBCD enzyme is a bipolar DNA helicase. *Nature* 423: 893-897.
53. Dixon DA, Kowalczykowski SC (1993) The recombination hotspot χ is a regulatory sequence that acts by attenuating the nuclease activity of the *E. coli* RecBCD enzyme. *Cell* 73: 87-96.
54. Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, Hooper ML, Melton DW, Thompson S, Smithies O (1987) Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330: 576- 578.
55. Doherty AJ, Jackson SP, Weller GR (2001) Identification of bacterial homologues of the Ku DNA repair proteins. *FEBS Lett* 500: 186-188.
56. Downs JA, Nussenzweig MC, Nussenzweig A (2007) Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. *Nature* 447: 951-957.
57. Drouet J, Frit P, Delteil C, de Villartay J-P, Salles B, Calsou P (2006) Interplay between Ku, Artemis, and the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit at DNA ends. *J Biol Chem* 281: 27784-27793.
58. Dudášová Z, Dudáš A, Chovanec M (2004) Non-homologous end-joining factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 28: 581-601.
59. Duffy JB (2002) GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 34: 1-15.
60. Evans MJ, Kaufmann MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156.
61. Fanning E, Klimovich V, Nager AR (2006) A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic Acids Res* 34: 4126-4137.
62. Ferguson DO, Alt F W (2001) DNA double strand break repair and chromosomal translocation: lessons from animal models. *Oncogene* 20: 5572-5579.
63. Flint-Garcia SA, Thornsberry JM, Buckler IV ES (2003) Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annu Rev Plant Biol* 54: 357-374.
64. Franklin NC (1967) Deletions and functions of the center of the f80-1 phage genome. Evidence for a phage function promoting genetic recombination. *Genetics* 57: 301-318.
65. Fugmann SD, Lee AJ, Shockett PE, Villey IJ, Schatz DG (2000) The Rag proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu Rev Immunol* 18: 495-527.
66. Furth PA, Onge S, Boger H, Gruss P et al. (1994) Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9302-9306.
67. Gally DL, Bogan JA, Eisenstein BI, Blomfield IC (1993) Environmental regulation of the fim switch controlling type 1 fimbrial phase variation in *Escherichia coli* K-12: effects of temperature and media. *J Bacteriol* 175: 6186-6193.
68. Gellert M (2002) V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu Rev Biochem* 71: 101-132.
69. Gelvin SB (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the „gene-jockeying“ tool. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 16-37.

70. Gerton JL, Hawley RS (2005) Homologous chromosome interactions in meiosis: diversity amidst conservation. *Nat Rev Genet* 6: 477-487
71. Gheysen G, Villarroel R, Van Montagu M (1991) Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. *Genes Dev* 5: 287-297.
72. Ghosh SK, Hajra S, Paek A, Jayaram M (2006) Mechanisms of chromosome and plasmid segregation. *Annu Rev Biochem* 75: 211-241.
73. Gibson FP, Leach DR, Lloyd RG (1992) Identification of *sbcD* mutations as cosuppressors of *recBC* that allow propagation of DNA palindromes in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 174: 1222-1228.
74. Gilbert W (1986) Origin of life: the RNA world. *Nature* 319: 618.
75. Gill EE, Fast NM (2007) Stripped-down DNA repair in a highly reduced parasite. *BMC Mol Biol* 8: 24-37.
76. Glassberg J, Meyer RR, Kornberg A (1979). Mutant single-strand binding protein of *Escherichia coli*: genetic and physiological characterization. *J Bacteriol* 140: 14-19.
77. Goldman AS, Lichten M (2000) Restriction of ectopic recombination by interhomolog interactions during *Saccharomyces cerevisiae* meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9537-9542.
78. Golubovskaya IN, Harper LC, Pawlowski WP, Schichnes D, Cande WZ (2002) The *pamI* gene is required for meiotic bouquet formation and efficient homologous synapsis in maize (*Zea mays* L.). *Genetics*. 162: 1979-1993.
79. Grindley ND (1978) IS1 insertion generates duplication of a nine base pair sequence at its target site. *Cell* 13: 419-427.
80. Haber J (2000) Partner and pathways – repairing of double strand break, *trends Genet* 16: 259-264.
81. Haber JE (1998) Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 32: 561-599.
82. Hall SD, Kane MF, Kolodner RD (1993) Identification and characterization of the *Escherichia coli* *recT* protein, a protein encoded by the *recE* region that promotes renaturation of homologous single-stranded DNA. *J Bacteriol* 175: 277-287.
83. Hammarsten O, DeFazio LG, Chu G (2000) Activation of DNA dependent protein kinase by single-stranded DNA ends. *J Biol Chem* 275: 1541-1550.
84. Hanada K, Ukita T, Kohno Y, Saito K, Kato J, Ikeda H (1997) RecQ DNA helicase is a suppressor of illegitimate recombination in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3860-3865.
85. Haren L, Ton-Hoang B, Chandler M (1999) Integrating DNA: transposases and retroviral integrases. *Annu Rev Microbiol* 53: 245-281.
86. Hassold T, Hunt P (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2: 280-291.
87. Hawley RS (2002) Meiosis: how male lies do meiosis. *Curr Biol* 12: 1473-1483.
88. Hays JB, Boehmer S (1978) Antagonists of DNA gyrase inhibit repair and recombination of UV-irradiated phage λ . *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 4125-4129.
89. Henderson KA, Keeney S (2005) Synaptonemal complex formation: where does it start? *Bioessays* 27: 995-998.

90. Henderson SA, Edwards RG (1968) Chiasma frequency and maternal age in mammals. *Nature* 218: 22-28.
91. Herrmann G, Lindahl T, Schar P (1998) *Saccharomyces cerevisiae LIF1*: a function involved in DNA double-strand break repair related to mammalian XRCC4. *EMBO J* 17: 4188-4198.
92. Holmes SE, Dombrovski BA, Krebs CM, Boehm CD, Kazazian HH (1994) A new retrotransposable human L1 element from the LRE2 locus on chromosome 1q produces a chimeric insertion. *Nat Genet* 7: 143-148.
93. Houck CM, Rinehart FP, Schmid CW (1979) A ubiquitous family of repeated DNA sequences in the human genome. *J Mol Biol* 132: 289-306.
94. http://rna.protres.ru/rus/#Molecular_proc.20Colony
95. <http://www.lifesciences.ynu.edu.cn/wljc/xbswx/6/images/pic/pic0609s.gif>
96. Jackson SP (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23: 687-696.
97. Jeffreys A (1979) DNA sequence variants in the $G\gamma$ -, $A\gamma$ -, δ - and β -globin genes of man. *Cell* 18: 1-10.
98. Jessberger R, Wabl M, Borggreffe T (1996) Biochemical studies of class switch recombination. *Curr Top Microbiol Immunol* 217: 191-202.
99. Johnson FB, Marciniak RA, McVey M, Stewart SA, Hahn WC, Guarente L (2001) The *Saccharomyces cerevisiae* WRN homolog Sgs1p participates in telomere maintenance in cells lacking telomerase. *EMBO J* 20: 905-913.
100. Jones N, Ougham H, Thomas H (1997) Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytol* 137: 165-177.
101. Jung D, Giallourakis C, Mostoslavsky R, Alt FW (2006) Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol* 24: 541-570.
102. Kang J, Huang S, Blaser MJ (2005) Structural and functional divergence of MutS2 from Bacterial MutS1 and eucaryotic MSH4-MSH5 homologs. *J Bacteriol* 187: 3528-3537.
103. Karu, A E, Yoshiyuki E, Echols H, Linn S (1975) The γ protein specified by bacteriophage λ . *J Biol Chem* 250: 7377-7387.
104. Kataoka T, Kawakami T, Takahashi N, Honjo T (1980) Rearrangement of immunoglobulin γ 1-chain gene and mechanism for heavy-chain class switch. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 919-923.
105. Kawakami K, Shimata A, Kawakami N (2000) Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ line. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11403-11408.
106. Keeney S (2001) Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Curr Top Dev Biol* 52: 1-53.
107. Kleckner N (1996) Meiosis: how could it work? *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 8167-8174.
108. Kolodner R, Fishel RA, Howard M (1985) Genetic recombination of bacterial plasmid DNA: effect of *recF* pathway mutations on plasmid recombination in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 163: 1060-1066.
109. Komano T (1999) Shufflons: multiple inversion systems and integrons. *Annu Rev Genet* 33: 171-191.

110. Komori K, Miyata T, DiRuggiero J, Holley-Shanks R, Hayashi I, Cann I K O, Mayanagi K, Shinagawai H, Ishino Y (2000) Both RadA and RadB are involved in homologous recombination in *Pyrococcus furiosus*. J Biol Chem 275 (43): 33782-33790.
111. Kong A, Gudbjartsson DF, Sainz J, Jonsdottir GM, Gudjosson SA et al. (2002) A high-resolution recombination map of the human genome. Nature Genet 31: 241-247.
112. Kowalczykowski S, Dixon DA, Eggleston AK, Lauder SD, Rehrauer WM (1994) Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. Microbiol Rev 58: 401-465.
113. Kowalczykowski SC (1991) Biochemistry of genetic recombination: energetics and mechanism of DNA strand exchange. Annu Rev Biophys Biophys Chem 20: 539-575.
114. Kowalczykowski SC (2000) Some assembly required. Nature Struct Biol 7: 1087-1089;
115. Kowalczykowski SC (2005) Catalyst of catalyst. Nature 433: 591-592.
116. Kowalczykowski SC, Eggleston AK (1994) Homologous pairing and DNA strand-exchange protein. Annu Rev Biochem 63: 991-1043.
117. Krizkova L, Hroudá M (1998) Direct repeats of T-DNA integrated in tobacco chromosome: characterization of junction regions. Plant J 16: 673-680.
118. Krogh BO, Symington LS (2004) Recombination proteins in yeasts. Annu Rev Genet 38: 233-271.
119. Kurumizaka H, Aihara H, Ikawa S, Shibata T (2000) Specific defects in double-stranded DNA unwinding and homologous pairing of a mutant RecA protein. FEBS Lett 477: 129-134.
120. Kushner SR, Nagaishi H, Clark AJ (1972) Indirect suppression of *recB* and *recC* mutations by exonuclease I deficiency. Proc Natl Acad Sci USA 69: 1366-1370.
121. Kushner SR, Nagaishi H, Templin A, Clark AJ (1971) Genetic recombination in *Escherichia coli*: the role of exonuclease I. Proc Natl Acad Sci USA 68: 824-827.
122. Kuzminov A (1999) Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage λ . Microbiol Mol Biol Rev 63: 751-813.
123. Lam ST, Stahl MM, McMilin KD, Stahl FW (1974) Rec-mediated recombinational hot spot activity in bacteriophage lambda. II. A mutation which causes hot spot activity. Genetics 77: 425-433.
124. Lander ES, Scharf NJ (1994) Genetic dissection of complex traits. Science 265: 2035-2048.
125. Largaespada DA (2003) Generating and manipulating transgenic animals using transposable elements. Reprod Biol Endocrinol 1: 80-89.
126. Lawrence C, Woodgate R (1999) Translesion Replication In P.J. Smith and C.J. Jones (eds.), Frontiers in molecular biology: DNA recombination and repair. Oxford University Press, Oxford, England, pp. 38-65.
127. Leach DRF. Genetic recombination. London. Blackwell Science Ltd, 1996.
128. Lee JH, Ghirlando R, Bhaskara V, Hoffmeyer MR, Gu J, et al. (2003) Regulation of Mre11/Rad50 by Nbs1: effects on nucleotide-dependent DNA binding and association with ataxia-telangiectasia-like disorder mutant complexes. J Biol Chem 278: 45171-45181.
129. Li J, Vaidya M, White C, Vainstein A, Citovsky V, Tzfira T (2005) Involvement of ku80 in T-DNA integration in plant cells. Proc Natl Acad Sci USA 102: 19231-19236.

130. Li Z, Woo CJ, Iglesias-Ussel MD, Ronai D, Scharff MD (2004) The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination. *Genes & Development* 18: 1-11.
131. Liang L, Deng L, Chen Y, Li GC, Shao C, Tischfield J A (2005) Modulation of DNA end joining by nuclear proteins. *J Biol Chem* 280: 31442–31449.
132. Liu Y, Masson YJ, Shah R, O'Regan P, West SC (2004) Rad51C is required for Holliday junction processing in mammalian cells. *Science* 303: 243-246.
133. Lloyd RG (1991) Conjugational recombination in resolvase deficient *ruvC* mutants of *Escherichia coli* K-12 depends on *recG*. *J Bacteriol* 173: 5414-5418.
134. Lloyd RG, Buckman C (1991). Genetic analysis of the *recG* locus of *Escherichia coli* K-12 and of its role in recombination and DNA repair. *J Bacteriol* 173:1004-1011.
135. Lloyd RG, Buckman C (1991). Overlapping functions of *recD*, *recJ*, and *recN* provide evidence of three epistatic groups of genes in *Escherichia coli* recombination and DNA repair. *Biochimie* 73: 313-320.
136. Lonn U, Lonn S, Nylén U, Winblad G, German J (1990) An abnormal profile of DNA replication intermediates in Bloom's syndrome. *Cancer Res* 50: 3141-3145.
137. Lovett ST, Kolodner RD (1989) Identification and purification of a single-stranded DNA-specific exonuclease encoded by the *recJ* gene of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2627-2631.
138. Loyter A, Rosenbluh J, Zakai N, Li J, Kozlovsky SV, Tzfira T, Citovsky V (2005) The plant VirE2 interacting protein1. A molecular link between the *Agrobacterium* T-complex and the host cell chromatin? *Plant Physiol* 138: 1318-1321.
139. Luisi-DeLuca C, Lovett ST, Kolodner RD (1989) Genetic and physical analysis of plasmid recombination in *recB recC sbcB* and *recB recC sbcA* *Escherichia coli* K-12 mutants. *Genetics* 122: 269-278.
140. Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR (2002) Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108: 781-94.
141. Maizels N (1999) Immunoglobulin class-switch recombination: will genetics provide new clues to mechanism? *Am J Hum Genet* 64: 1270-1275.
142. Malkova A, Ivanov EL, Haber JE (1996) Double-strand break repair in the absence of *RAD51* in yeast: a possible role for break-induced DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7131–7136.
143. Mandal TN, Mahdi AA, Sharples GJ, Lloyd RG (1993) Resolution of Holliday intermediates in recombination and DNA repair: indirect suppression of *ruvA*, *ruvB*, and *ruvC* mutations. *J Bacteriol* 175: 4325-4334.
144. Manis JP, Tian M, Alt FW (2002) Mechanism and control of class-switch recombination, *Trends Genet* 23: 31-38.
145. Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7634-7638.
146. Matson SW (2003) Dual engines moving on antiparallel tracks. *Nature Structural Biol* 10: 499-500.

147. Mayerhofer R, Koncz-Kalman Z, Nawrath C, Bakkeren G, Cramer A, Angelis K, Redei GP, Schell J, Hohn B, Koncz C (1991) T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. *EMBO J* 10: 697-704
148. McClintock B (1950) The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 36: 344-355.
149. McGavin S (1977) A model for the specific pairing of homologous double stranded nucleic acid molecules during genetic recombination. *Heredity* 39: 15-25.
150. Mendonca VM, Klepin HD, Matson SW (1995) DNA helicases in recombination and repair: construction of a $\Delta uvrD \Delta helD \Delta recQ$ mutant deficient in recombination and repair. *J Bacteriol* 177: 1326-1335.
151. Menetski JP, Kowalczykowski SC (1989) Enhancement of *Escherichia coli* RecA protein enzymatic function by ATP. *Biochemistry* 28: 5871-5881.
152. Michel B, Flores MJ, Viguera E, Grompone G, Seigneur M, Bidnenko V (2001) Rescue of arrested replication forks by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8181-8188.
153. Mizuuchi K (1992) Transpositional recombination: mechanistic insights from studies of Mu and other elements. *Annu Rev Biochem* 61: 1011-1051.
154. Modesti M, Kanaar R (2001) Homologous recombination from model organisms to human disease. *Genome Biol* 2: I014.I-I014.5.
155. Moens PB, Marcon E, Shore JS, Kochakpour N, Spyropoulos B (2007) Initiation and resolution of interhomolog connections: crossover and non-crossover sites along mouse synaptonemal complexes. *J Cell Sci* 120: 1017-1027.
156. Moran JV, Holmes SE, Naas TP, DeBerardinis RJ et al. (1996) High frequency-retrotransposition in cultured mammalian cells. *Cell* 87: 915-927.
157. Müller U (1999) Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mechanisms of Development* 82: 3-21.
158. Munishkin AV, Voronin LA, Chetverin AB (1988) An in vivo recombinant RNA capable of autocatalytic synthesis by Q beta replicase. *Nature* 333: 473-475.
159. Muramatsu M, Sankaranand VS, Anant S, Sugai M, Kinoshita, K, Davidson NO, Honjo T (1999) Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem* 274: 18470-18476.
160. Nagy PD, Simon AE (1997) New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology* 235: 1-9.
161. Nakayama H, Nakayama K, Nakayama R, Irino N, Nakayama Y, Hanawalt PC (1984) Isolation and genetic characterization of a thymineless death-resistant mutant of *Escherichia coli* K-12: identification of a new mutation (recQI) that blocks the *recF* recombination pathway. *Mol Gen Genet* 195: 474-480.
162. Nash H A (1975) Integrative recombination of bacteriophage lambda DNA *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 1072-1076.
163. Nei M, Hughes AL (1992) Balanced polymorphism and evolution by the birth-and-death process in the MHC loci. In *11th Histocompatibility Workshop and Conference*, ed. K Tsuji, M Aizawa, T Sasazuki, pp. 27-38. Oxford, UK: Oxford Univ. Press.

164. Nishant KT, Rao MRS (2005) Molecular features of meiotic recombination hot spots. *BioEssays* 28: 45-56.
165. Niu H, Wan L, Baumgartner B, Schaefer D, Loidl J, Hollingsworth NM (2005) Partner chose during meiosis is regulated by Hop1-promoted dimerization of Mek1. *Mol Biol Cell* 16: 5804-5818.
166. Oakley TJ, Hickson ID (2002) Defending genome integrity during S-phase: putative roles for RecQ helicases and topoisomerase III. *DNA repair* 1: 175-207.
167. Onoda F, Seki M, Miyajima A, Enomoto T (2001) Involvement of SGS1 in DNA damage-induced heteroallelic recombination that requires RAD52 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* 264: 702-708.
168. Orr-Weaver T L, Szostak JW, Rothstein RJ (1981) Yeast Transformation: A Model System for the Study of Recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 6354-6358.
169. Ostertag EM, Kazazian HH (2001) Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu Rev Genet* 35: 501-538.
170. Page SL, Hawley RS (2004) The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 525-558.
171. Palas KM, Kushner SR (1990) Biochemical and physical characterization of exonuclease V from *Escherichia coli*. Comparison of the catalytic activities of the RecBC and RecBCD enzymes. *J Biol Chem* 265: 3447-3454.
172. Pansegrau W, Schoumacher F, Hohn B, Lanka E (1993) Site-specific cleavage and joining of single-stranded DNA by VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids: analogy to bacterial conjugation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11538-11542.
173. Paques F, Haber JE (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 349-404.
174. Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, Nanjangud G, Chaganti RS., Kupperts R, Dalla-Favera R (2001) Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 412: 341-346.
175. Passarge E. Color atlas of genetics. New York. Thieme, 1995.
176. Pastwa E, Blasiak J (2003) Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochimica Polonica* 50 (4) 891-908.
177. Paterson AH, Tanksley SD, Sorrells ME (1991) DNA markers in plant improvement. *Advances in Agronomy* 46: 39-90.
178. Petes TD, Hill CW (1988) Recombination between repeated genes in microorganisms. *Annu Rev Genet* 22: 147-168.
179. Poot M, Hoehn H, Runger TM, Marin GM (1992) Impaired S-phase transit of Werner syndrome clls expressed in lymphoblastoid cell lines. *Exp Cell Res* 202: 267-273.
180. Potter S, Truett M, Phillips M, Maher A (1980) Eucaryotic transposable genetic elements with inverted terminal repeats. *Cell* 20: 639-647.
181. Radding CM (1982) Homologous pairing and strand exchange in genetic recombination. *Annu Rev Genet.* 16: 405-437.
182. Rafalski A (2002) Application single nucleotide polymorphism in crop genetics. *Curr Opinion Plant Biol* 5: 94-100.

183. Rafalski A, Morgante M (2004) Corn and humans: recombination and linkage disequilibrium in two genomes of similar size. *Trends Genet* 20: 103-111.
184. Robertson MP, Ellington AD (1998) How to make a nucleotide. *Nature* 395: 223-225.
185. Roe SM, Barlow T, Brown T, Oram M, Keeley A, Tsaneva IR, Pearl LH (1998) Crystal structure of an octameric RuvA-Holliday junction complex. *Mol Cell* 2: 361-372.
186. Roeder GS (1997) Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes & Development* 11: 2600-2621.
187. Roman LJ, Eggleston AK, Kowalczykowski SC (1992) Processivity of the DNA helicase activity of *Escherichia coli* recBCD enzyme. *J Biol Chem* 267: 4207-4214.
188. Sadowski P (1993) Sait-specific genetic recombination: hops, lips, and slops. *FASEB J* 7: 760-767.
189. Sagi D, Tlusty T, Stavans J (2006) High fidelity of RecA-catalyzed recombination: a watchdog of genetic diversity. *Nucleic Acids Res* 34: 5021-5031.
190. Scherthan H (2001) A bouquet makes ends meet. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 621-627.
191. Schuermann D, Molinier J, Fritsch O, Hohn B (2005) The dual nature of homologous recombination in plants. *Trends Genet* 21: 172-181.
192. Seitz EM, Haseltine CA, Kowalczykowski SC (2001) DNA recombination and repair in the Archaea. *Advances in Applied Microbiol* 50: 101-169.
193. Shah R, Bennett RJ, West SC (1994) Genetic recombination in *E.coli*: RuvC protein cleaves Holliday junctions at resolution hotspots *in vitro*. *Cell* 79: 853-864.
194. Sharples GJ, Ingleston SM, Lloyd RG (1999) Holliday junction processing in bacteria: insights from the evolutionary conservation of RuvABC, RecG, and RusA. *J Bacteriol* 181: 5543-5550.
195. Shibata T, Nishinaka T, Mikawa T, Aihara H et al. (2001) Homologous genetic recombination as an intrinsic dynamic property of a DNA structure induced by RecA/Rad51-family proteins: a possible advantage of DNA over RNA as genetic material. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8425-8432.
196. Shida T, Iwasaki H, Saito A, Kyogoku Y, Shinagawa H (1996). Analysis of substrate specificity of the RuvC Holliday junction resolvase with synthetic Holliday junctions. *J Biol Chem* 271: 26105-26109.
197. Shiloh Y (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature Rev* 3: 155-168.
198. Shinkura R, Tian M, Smith M, Chua K, Fujiwara Y, Alt FW (2003) The influence of transcriptional orientation on endogenous switch region function. *Nat Immunol* 4: 435-441.
199. Sibanda BL, Critchlow SE, Begun J, Pei XY, Jackson SP et al. (2001) Crystal structure of an XRCC4-DNA ligase IV complex. *Nat Struct Biol* 8: 1015-1019.
200. Singer BS, Gold L, Gauss P, Doherty DH (1982) Determination of the amount of homology required for recombination in bacteriophage T4. *Cell* 31: 25-33.
201. Singleton MR, Dillingham MS, Gaudier M, Kowalczykowski SC, Wigley DB (2004) Crystal structure of RecBCD enzyme reveals a machine for processing DNA breaks. *Nature* 432: 187-193.
202. Skaar EP, Lazio MP, Seifert HS (2002) Roles of the *recJ* and *recN* genes in homologous recombination and DNA repair pathways of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 184: 919-927.

203. Sladek FM, Munn MM, Rupp WD, Howard-Flandres P (1989) *In vitro* repair of psoralen-DNA cross-links by recA, uvrABC, and the 5'-exonuclease of DNA polymerase I. *J Biol Chem* 264: 6755-6765.
204. Smith GCM, Jackson SP (1999) The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev* 13: 916-934.
205. Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS (1985) Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β -globin locus by homologous recombination. *Nature* 317: 230-234.
206. Snowden T, Acharya S, Butz Ch, Berardini M, Fishel (2004) hMSH4-hMSH5 recognizes Holliday junctions and forms a meiosis-specific sliding clamp that embraces homologous chromosomes. *Mol Cell* 15:437-451.
207. Sourice S, BiauDET V, El Karoui M, Ehrlich SD, Gruss A (1998) Identification of the Chi site of *Haemophilus influenzae* as several sequences related to the *Escherichia coli* Chi site. *Mol Microbiol* 27:1021-9.
208. Spies M, Kowalczykowski. Homologous recombination by RecBCD and RecF pathways. In: N. P. Higgins, Ed., *The Bacterial chromosome*. Washington DC, ASM Press, 2005.
209. Spradling AC, Rubin GM (1982) Transposition of cloned elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 218: 341-347.
210. Stasiak A (1992) Three-stranded DNA structure; is this the secret of DNA homologous recognition? *Mol Microbiol* 6: 3267-3276.
211. Stasiak A, DiCapua ED (1982) The helicity of DNA in complexes with RecA protein. *Nature* 299: 185-186.
212. Sturtevant AH (1913) The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. *Journal of Experimental Zoology* 14: 43-59.
213. Su TT (2006) Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices. *Annu Rev Genet* 40: 187-208.
214. Symington LS (2002) Role of the RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 630-670.
215. Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW (1983) The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33: 25-35.
216. Takahashi NK, Yamamoto K, Kitamura Y, Luo S-Q et al. (1992) Nonconservative recombination in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5912-5916.
217. Tenaillon MI, Sawkins MC, Long AD, Gaut RL et al. (2001) Patterns of DNA sequence polymorphism along chromosome 1 of maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.). *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9161-9166.
218. Thomas KR, Capecchi MR (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51: 503-512.
219. Tinland B, Hohn B (1995) Recombination between prokaryotic and eukaryotic DNA: integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA into the plant genome. *Genet Eng* 17: 209-229.
220. Tinland B, Hohn B, Puchta H (1994) *Agrobacterium tumefaciens* transfers single-stranded transferred DNA (T-DNA) into the plant cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8000-8004.

221. Tinland B, Schoumacher F, Gloeckler V, Bravo-Angel AM, Hohn B (1995) The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome. *EMBO J* 14: 3585-3595.
222. Tsubouchi H, Roeder GS (2003) Budding yeast Hed1 down-regulates the mitotic recombination machinery when meiotic recombination is impaired. *Genes & Dev* 20:1766-1775.
223. Tzfira T, Citovsky V (2002) Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*, *t Cell Biol* 12: 121-129.
224. Tzfira T, Frankmen L, Vaidya M, Citovsky V (2003) Site-specific integration of *Agrobacterium* T-DNA via double-stranded intermediates. *Plant Physiol* 133: 1011-1023.
225. van Attikum H, Hooykaas PJJ (2003) Genetic requirements for the targeted integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 31: 826-832.
226. Walbot V (2000) Saturation mutagenesis using maize transposons. *Curr Opin Plant Biol* 3: 103-107.
227. Walker JR, Corpina RA, Goldberg J (2001) Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412: 607-614.
228. Wang TCV, Chang HY, Hung JL (1993) Cosuppression of *recF*, *recR* and *recO* mutations by mutant *recA* alleles in *Escherichia coli* cells. *Mutat Res* 294: 157-166.
229. Ward E, Barnes W (1988) VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* very tightly linked to the 5' end of T-strand DNA. *Science* 242: 927-930.
230. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. Molecular biology of the gene. Pearson/Benjamin Cummings/CSHL Press 2004.
231. Weisberg R, Landy A (1983) Site-specific recombination in phage lambda, p. 211-250. *In* R. W. Hendrix, J. W. Roberts, F. W. Stahl, and R. A. Weisberg (ed.), *Lambda II*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
232. Weller GR, Kysela B, Roy R, Tonkin LM, Scanlan E, Della M, Devine SK, Day JP, Wilkinson A, di Fagagna F, Devine KM, Bowater RP, Jeggo PA, Jackson SP, DohertAJ (2002) Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria. *Science* 297: 1686-1689.
233. West SC (1992) Enzymes and molecular mechanisms of genetic recombination. *Annu Rev Biochem* 61: 603-640.
234. Wilson T E, Topper LM, Palmboos P L (2003) Non-homologous end-joining: bacteria join the chromosome breakdance, *TIBS* 28: 62-66.
235. Wyman C, Kanaar R (2006) DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet* 40: 363-383.
236. Xiong M, Guo S-W (1997) Fine-scale genetic mapping based on linkage disequilibrium: theory and applications. *Am J Hum Genet* 60: 1513-1531.
237. Xu L, Weiner BM, Kleckner N (1997) Meiotic cells monitor the status of the interhomolog recombination complex. *Genes & Dev* 11: 106-118.
238. Yamagata K, Kato J-I, Shimamoto A, Goto M, Furuichi Y, Ikeda H (1998) Bloom's and Werner's syndrome genes suppress hyperrecombination in yeast *sgs1* mutant: implication for genomic instability in human diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8733-8738.
239. Yang S, Yu X, Seitz E M, Kowalczykowski S C, Egelman E H (2001) Archaeal RadA protein binds DNA as both helical filaments and octameric rings. *J Mol Biol* 314: 1077-1085.

240. Yant SR, Ehrhardt A, Mikkelsen JG, Meuse L et al. (2002) Transposition from a gutless adenoviral transposon vector stabilizes transgene expression *in vivo*. *Nat Biotechnol* 16: 16.
241. Young C, Nester EW (1988) Association of the VirD2 protein with the 5' end of T-strands in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 170: 3367-3374.
242. Yu A, Zhao Ch, Fan Y, Jang W, Mungall A J et al. (2001) Comparison of human genetic and sequence-based physical maps. *Nature* 409: 951-953.
243. Yu K, Lieber MR (2003) Nucleic acid structures and enzymes in the immunoglobulin class switch recombination mechanism. *DNA Repair* 2: 1163-1174.
244. Zarrin A, Del Vecchio C, Tseng E, Gleason, Zarin P, Tian M, Alt FW (2007) Antibody class-switching mediated by yeast endonuclease-generated DNA breaks. *Science* 315: 377-381.
245. Zickler D, Kleckner N (1999) Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu Rev Genet* 33: 603-754.
246. Ziemienowicz A (2001) Odyssey of *Agrobacterium* T-DNA. *Acta Biochimica Polonica* 48: 623-635.